



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas

“Reprogramación de progenitores linfoides tempranos por estimulación de receptores tipo Toll en leucemia linfoblástica aguda infantil”

TESIS

**Que para optar por el grado de
Doctor en Ciencias Médicas**

Presenta

Elisa María Dorantes Acosta

Tutor

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Entidad: Facultad de Medicina de la UNAM

Comité tutorial:

Dra Sara Huerta Yopez

Entidad: Facultad de Medicina de la UNAM

Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré

Entidad: Facultad de Medicina de la UNAM

MÉXICO D.F. JUNIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reprogramación de progenitores linfoides tempranos por estimulación de receptores tipo Toll en leucemia linfoblástica aguda infantil

Dr. Onofre Muñoz Hernández
Responsable de la Entidad Académica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dra. Rosana Pelayo Camacho, Tutor
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Comité tutorial:

Dra Sara Huerta Yopez
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Alumna:

Elisa María Dorantes Acosta

Reprogramación de progenitores linfoides tempranos por estimulación de receptores tipo Toll en leucemia linfoblástica aguda infantil

Índice

Tema	Página
Resumen	7
Antecedentes	9
Cáncer en pediatría	9
Leucemias agudas	9
Cambios del linaje celular en la leucemia linfoblástica aguda	12
Proceso de producción de las células linfoides	14
Evidencia de modificación en el linaje celular	17
Diferenciación linfoide en la leucemia aguda linfoblástica	19
Planteamiento del problema	21
Justificación	22
Pregunta de investigación	23
Objetivos	24
Hipótesis	24
Metodología	24
Procedimientos y supuestos para el tamaño de muestra	28
Diseño del estudio	29
Población diana	29
Población accesible	29
Definición operativa de las variables y su escala de medición	29
Plan de análisis de los datos	30
Resultados	31
Discusión	47
Conclusiones	51
Perspectivas	51
Limitaciones del estudio	52

Reprogramación de progenitores linfoides tempranos por estimulación de receptores tipo Toll en leucemia linfoblástica aguda infantil

Tema	Página
Consideraciones éticas	52
Consideraciones de bioseguridad	53
Referencias	54
Anexos	
Anexo 1. Abreviaturas utilizadas	58
Anexo 2. Ensayos de laboratorio	62
Anexo 3. Carta de consentimiento informado	70

Índice de tablas y figuras

Tablas	Pág.
Tabla 1. Cambio de linaje en niños: casuística internacional reportada	13
Tabla 2. TLRs descritos en el humano: ligando, origen de los ligandos y localización de TLR	18
Tabla 3. Características de los pacientes incluidos en el estudio.	32
Figuras	
Figura 1. Anticuerpos monoclonales (fenotipo) comúnmente usados para tipificar las células de pacientes con Leucemia aguda.	11
Figura 2. Plasticidad del sistema hematopoyético	16
Figura 3. Diagrama de flujo experimental	25
Figura 4. Expresión variable de transcritos de TLR en precursores hematopoyéticos de LA pediátrica	33
Figura 5. Expresión relativa de transcritos de TLR en células precursoras de leucemias agudas: elevada expresión de TLR5 en leucemias de mal pronóstico	34
Figura 6. La estimulación con ligandos de TLR promueve la producción de factores hematopoyéticos a partir de células progenitoras CD34+ en LLA	35
Figura 7. La diferenciación de células B en leucemia aguda no es sustancialmente alterada por la estimulación de TLR de membrana	37
Figura 8. Producción celular en cultivos linfoides estimulados con ligandos de TLR membranales	38

Figura	Pág.
Figura 9. La estimulación de TLR9 en progenitores hematopoyéticos contribuye a la producción <i>in vitro</i> de células B en leucemia aguda de linaje mixto	39
Figura 10. Perfiles de producción emergente de linaje mieloide a partir de progenitores linfoides en leucemias agudas infantiles	41
Figura 11. Producción relativa de células mieloides CD14 ⁺ en co-cultivos linfoides sometidos a estimulación de TLR.	42
Figura 12. Las señales de TLR4 en progenitores linfoides de LLA-T promueven la diferenciación de células con fenotipo mieloide.	43
Figura 13. La estimulación de TLR conduce a la producción de células NK de fenotipo maduro en LLA.	44
Figura 14. Producción de células NK emergentes a partir de progenitores linfoides.	45
Figura 15. Las células NK emergentes son funcionales y su alta producción se asocia a un aumento de la transcripción de Id-2	46

Reprogramación de progenitores linfoides tempranos por estimulación de receptores tipo Toll en leucemia linfoblástica aguda infantil

Resumen

Las leucemias agudas son las neoplasias más frecuentes de la infancia en nuestro país y a nivel mundial, y continúan siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad de los pacientes que sufren recaídas. Además de progresos notables en la caracterización de las aberraciones genéticas que pueden controlar estos trastornos hematológicos, es cada vez más claro que las anormalidades en el microambiente de la médula ósea podrían tener impacto en las células precursoras y contribuir a la enfermedad. Sin embargo, las respuestas de las células precursoras leucémicas a condiciones inflamatorias o componentes microbianos durante o después de un proceso infeccioso, permanecen sin explorar. Un número creciente de investigaciones, incluyendo nuestro trabajo previo, indican que los receptores tipo Toll (TLR), expresados en las primeras etapas del desarrollo linfoide tanto en ratones como en seres humanos, constituyen un mecanismo importante para la producción emergente de células del sistema inmune innato. Con el objeto de explorar la respuesta de las células hematopoyéticas primitivas a la estimulación de los TLR, el presente estudio se fundamentó en modelos de diferenciación *in vitro* con células de médula ósea provenientes de diversas leucemias agudas, previo consentimiento informado. Nuestros hallazgos indican que los precursores linfoides de la médula ósea leucémica expresan TLR y responden a su estimulación cambiando los patrones de diferenciación celular. Aunque no fue registrada una aparente contribución de las señales de TLR a la progresión tumoral en alguna de las enfermedades investigadas, el reabastecimiento de las células innatas fue promovido constantemente tras la exposición *in vitro* a agonistas de TLR, lo que sugiere que el reconocimiento temprano de las moléculas asociadas a patógenos presumiblemente no impacta el proceso de carcinogénesis, pero podría estar implicada en la regulación hematopoyética de las decisiones tempranas de destino celular en la leucemia aguda infantil, y contribuir a los cambios de linaje leucémicos.

Abstract

Acute leukemias are the most common malignancy of children in our country and worldwide, and continue to be a major cause of morbidity and mortality of relapsed patients. While remarkable progress has been made in characterizing genetic aberrations that may control these hematological disorders, it has also become clear that abnormalities in the bone marrow microenvironment might impact stem and precursor cells and contribute to disease. However, responses of leukemic precursor cells to inflammatory conditions or microbial components during or upon infection are yet unexplored.

A growing number of studies, including our previous work, indicate that Toll-like receptors (TLR) expressed in early stages of lymphoid development in both mice and humans, are an important mechanism for the emerging production of the innate immune system. In order to explore the response of primitive hematopoietic cells to TLR stimulation, the present study was based on *in vitro* differentiation models with bone marrow cells from various acute leukemias, prior informed consent. Our findings indicate that lymphoid precursors of leukemic bone marrow express functional TLR and respond to their stimulation by changing cell differentiation patterns. Although not recorded an apparent contribution of TLR signals to tumor progression in any of the investigated conditions, the replenishment of innate cells was consistently promoted after *in vitro* exposure to TLR agonists, suggesting that early recognition of the pathogen-associated molecules presumably do not impact the process of carcinogenesis, but might be involved in the regulation of early hematopoietic cell fate decisions in childhood acute leukemia, and further contribute to changes in leukemic lineage.

Cáncer en pediatría

En la actualidad, el cáncer es la segunda causa de mortalidad infantil en el mundo ⁽¹⁾. De los diversos tipos de cáncer registrados, las leucemias representan los de más alta frecuencia, y constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias malignas caracterizadas por la proliferación monoclonal y/o oligoclonal de precursores hematopoyéticos dentro de la médula ósea. En México, la leucemia representa la cuarta causa de muerte en la población de 1 a 4 años, y la segunda causa de muerte en el grupo de 5 a 14 años de acuerdo a las cifras del INEGI ⁽²⁾.

Leucemias agudas

Las leucemias agudas se clasifican de acuerdo al precursor celular de donde provengan en dos linajes, el linaje linfoide y el linaje mieloide. Las leucemias linfoides o linfoblásticas (LLA) pueden subdividirse en LLA de células B o en LLA de células T, por otro lado están las leucemias mieloblásticas agudas.

De los diferentes tipos de leucemias, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia en todo el mundo, abarcando cerca del 85% de los casos de las leucemias aguda en pediatría ^(3,4) y ha demostrado un aumento gradual en los últimos años ⁽⁴⁾. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez se reportan anualmente alrededor de 100 casos nuevos de LLA y constituyen el 34.4% de todos los casos de cáncer tratados ^(5,6), mientras que en un estudio realizado entre 1996 y 2000 en el Hospital de Pediatría y el Hospital General “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social, la incidencia anual promedio fue de 44.9 por millón de niños ⁽⁷⁾.

La posible causa de la LLA es una alteración citogenética en la cual una serie de eventos mutagénicos presumiblemente determinan la pérdida de los mecanismos que regulan la división y diferenciación celular, ocasionando la expansión de células precursoras de la serie linfoide ⁽⁸⁾. A pesar de su alta frecuencia y de los numerosos estudios para el reconocimiento de factores implicados en la leucemogénesis, la etiología de esta neoplasia es aún desconocida.

La confirmación del diagnóstico se realiza principalmente mediante el estudio morfológico, citogenético y del inmunofenotipo (antígenos) de las células del aspirado de médula ósea. El análisis de la expresión de antígenos de superficie, citoplasmáticos y nucleares en las células leucémicas empleando anticuerpos monoclonales ha generado el conocimiento para su clasificación en función del linaje y la fase de maduración de la célula que se observa en proliferación. El linaje B, que representa 80 a 85% de las LLA de la infancia, se define por la expresión de CD19, CD10 y otros antígenos asociados a células B. Los principales subtipos de LLA de linaje B son: proB/pre B temprana, pre B, pre B transicional y B madura. Por su parte, las LLA de células T expresan los antígenos CD2, CD7, CD5 o CD3 y constituyen 15% de los casos de LLA en niños.

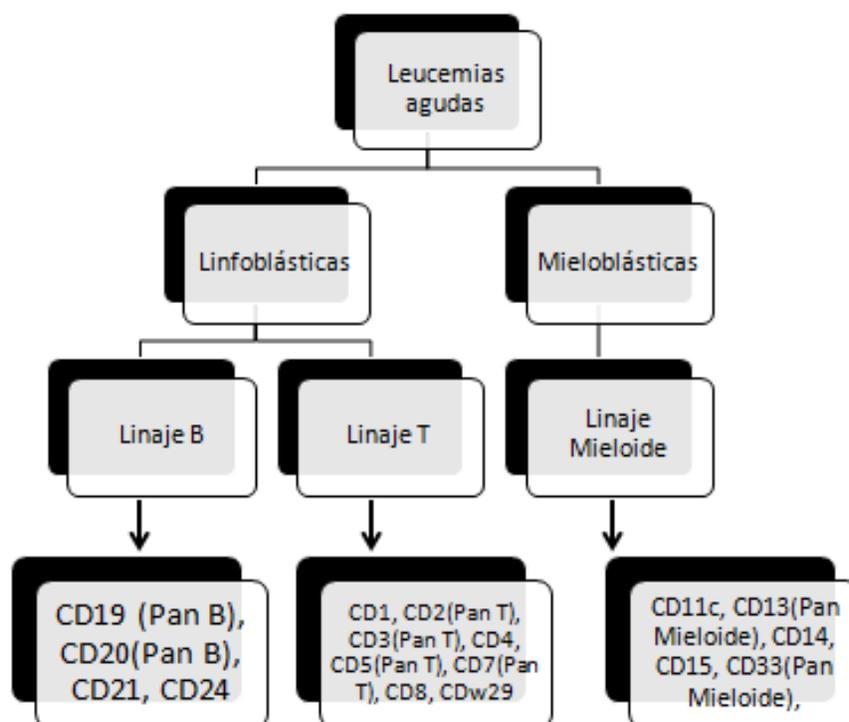


Figura 1. Anticuerpos monoclonales (fenotipo) comúnmente usados para tipificar las células de pacientes con Leucemia aguda. Pan=Universalmente encontrado en este tipo de leucemia. ⁽⁴¹⁾

Aunque la mayoría de los casos expresan marcadores que les identifican como de un linaje específico, existen situaciones en las que se expresan marcadores tanto de células T como B o puede coexistir expresión de marcadores linfoides y mieloides ⁽⁹⁾. El mecanismo biológico de este fenómeno se ignora, pero se sugiere, por un lado, que progenitores hematopoyéticos muy tempranos están implicados en el inicio de la enfermedad, y por otro, que existen estímulos intrínsecos o extrínsecos que podrían disparar la inestabilidad del linaje de origen.

Es indispensable conocer la expresión de los antígenos de superficie que identifican linaje, ya que de ello depende el tipo de tratamiento y el pronóstico del paciente.

Cambios del linaje celular en la leucemia linfoblástica aguda

Del 20-30% de los pacientes con leucemia sufren recaídas, comúnmente representadas por alteraciones en el mismo linaje celular (linfoide o mieloide) que las originó y con una pobre respuesta a las terapias de inducción a la remisión. Dentro de este grupo definido como de alto riesgo existe aún una variabilidad inexplicable en el curso clínico de algunos pacientes. En ocasiones se observa un fenómeno conocido en Oncología como “switch”, que describe el cambio de linaje celular que ha sido identificado al diagnóstico inicial por los criterios estándar del sistema FAB ‘French-American-British’, pero que a la recaída cumple criterios de un linaje distinto ⁽¹⁰⁾. La frecuencia del cambio de linaje en pacientes con leucemias agudas en la recaída se estima entre un 6-9% en algunos reportes ⁽¹¹⁾. La mayoría de los reportes son de Leucemia Linfoblástica Aguda hacia Leucemia Mieloide Aguda (LMA) ⁽¹²⁾, aunque se han publicado casos raros de LMA hacia LLA ^(13, 14). El pronóstico para estos pacientes es variable y no existe a la fecha un tratamiento estándar óptimo para ellos ⁽¹⁴⁾.

El ‘switch’ es un ejemplo de la heterogeneidad de linaje que existe en las leucemias agudas, y tratando de explicar la etiología de este fenómeno se han postulado varios posibles mecanismos, dentro de los que destaca la reprogramación y/o redirección del destino de los progenitores en la médula ósea. Al respecto, la evidencia de traslocación t(4:11) en células provenientes de LLA congénita que experimentó cambio de linaje en la recaída a LMA pero conservó la presencia de la traslocación, sugiere un alto nivel de plasticidad o que la misma clona celular es blanco de reprogramación ⁽¹⁵⁾. Por otro lado, la activación de algunas mutaciones en Notch1 se ha propuesto como posible mecanismo de switch de linaje de un paciente con LMA que cambió a LLA con fenotipo T ⁽¹⁶⁾. La estimulación por factores exógenos que pueden modificar la condición y los potenciales de diferenciación de las clonas leucémicas es de especial interés en los cambios de linaje relacionados a infección o sepsis y al uso de quimioterapia con inhibidores de la topoisomerasa II ⁽¹⁷⁾.

Una revisión reciente de la literatura sobre la casuística del “switch de linaje” (**Tabla 1**) en el mundo, nos indicó que el fenómeno se presenta con más frecuencia en la edad pediátrica que en adultos, y que aparentemente es independiente de las alteraciones intrínsecas (citogenéticas), lo que deja abierta la posibilidad de que existan otros mecanismos o factores “extrínsecos” que intervengan en dicho proceso biológico.

Tabla 1. Cambio de linaje en niños: casuística internacional reportada

Caso	Edad	S	1º Dx	2º Dx (Recaída)	Hallazgos 1º Dx	Hallazgos recaída	Tiempo del Dx a la recaída	Resultado clínico	Referencia
1	RN	F	LLA L1	LMA -M5	46 XX t(1;6), t(4;11) CD19+ CD22+, CD 79a+, MPO-, CD 34-, CD 117-	46 XX t(1;6), t(4;11) CD 19-CD22-, CD 79a- CD 14+ CD 33+ CD13+	Día 100 después de la quimioterapia de inducción	Muerte	Jian JG et al.
2	RN	F	LMA M5	B-LLA L1	t(9;11)	Cariotipo NR	12 meses	Vivo	Shimizu H et al
3	RN	F	LMA M5	B-LLA	t(4;11) MPO-CD33+, CD13+ HLA-DR+, CD14+	t(4;11) CD34+, CD 19+ CD 22+ HLADR+, CD 10-	18 días	Muerte	Krawczuk-Rybak et al.
4	12 días	?	B-LLA	LMA M5	<i>Rearreglo MLL</i>	<i>Rearreglo MLL</i>	7 días	NR	Ridge SA et al.
5	21 días	M	pro-B ALL	LMA	t(4;11) MPOX-CD10 - CD19+ CD22+ CD34+ CD38+	t(4;11) CD20+ CD13+ CD14+ CD15+ CD33+ CD41+ CD61+	8 días	Muerte	Sakaki H,
6	3 m	F	pre-B I LLA L1	LMA M4	t(4;11) PAS+ MPO- ANBE- CD19+ CD34+ TdT+ CD33+	MLL por FISH MPO+ ANBE+ CD2+ CD13+ CD14+ CD33+ CD41+ CD65+	2 meses	Vivo después de TCPH	Park et al
7	9 m	M	LLA	LMA M5b	t(11;16)	t(11;16)	8 m	Muerte	Stasik C
8	15 m	M	pro-B LLA L1	LMA M0	46 XY. CD19+ HLA-DR+	46 XY t(9;11) MPO-CD33+ cyCD13+ cyCD33+ CD117+	76 m	Vivo después de TCPH	Park. M
9	25 m	?	LMA	LLA L1	46 XY (11q23) PAS+, MPO-	Cariotipo normal	1 año	Vivo	Bernstein ML
10	4 a	M	LMA M5	LLA pro B	Cariotipo normal PAX 5 negativo en MO durante la vigilancia	Cariotipo normal	9 m	Muerte	Dorantes A et al
11	4 a	F	LLA L1	LMA	Cariotipo normal MO:MPO - CD13+, CD19+ D22+ CD33+ CD38+ CD34+ HLA DR+	MO:MPO+	2 años después de remisión	Muerte	Ikarashi Y et al
12	6 a	M	B-común LLA L1	LMA M4	56 XY HLA-DR+, TdT+ CD10+ CD19 + CD22+	46 XY t(8;16) MPO+, ANBE+, HLA-DR+ CD13+, CD14+ CD33+	9 m	Vivo	Park M
13	7 a	F	B-LLA L2	T- ALL	46, XX MPO-, HLA-DR+, cyIgM+ CD33.+ PAS+ NSE-	Trisomía 13 CD2+ CD5+ CD7+ CD34+ HLA-DR+ CD33+	14 m	Muerte	Park M
14	8 a	M	LMA	LLA	Cariotipo NR	Cariotipo normal	13 m	Vivo	Emami A
15	9 a	M	LLA L1	LMA M4	56 XY	46 XY t(8;16)	9 m	Vivo	Chung HJ
16	13 a	F	B-Común-LLA	LMA M4/M5	t(12;21) Amplificación de RUNX1	Amplificación de RUNX1	5 a	Vivo	Podgornik H
17	16 a	F	T- LLA	LMA M0	46 XX MPO-, CD7+ CD4- CD8-, CD1-, TdT+	46 ~62, XX,+X, MPO -, CD19 + CD117+ CD33 + CD34+, CD56+	13 m	Muerte	Mantadakis
18	20 a	M	T-LLA	LMA	52 XY MPO-, cytCD3+, CD5+ CD2+ TdT+ CD7+ CD3- CD1a-, CD10- CD33- CD117- CD19- CD13 ^{+/}	MPO- CD117+, CD33+ CD13+ CD56+ TdT- CD7- cyCD3- CD2- CD5- CD19+	21 m	Muerte	van den Ancker Willemijn

a= años, m= meses, s= sexo, F= femenino, M= masculino, Dx.= diagnóstico, B-LLA= leucemia aguda linfoblástica de precursores B, T-LLA= Leucemia aguda linfoblástica de células T, LMA= leucemia mieloide aguda, NR= no reportado, MO= médula ósea, TCPH= trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. ⁽⁴²⁾

Proceso de producción de las células linfoides

Para el desarrollo de este trabajo, abordamos el fenómeno desde el origen de la formación de las células de la sangre y la plasticidad del sistema hematopoyético.

Las células sanguíneas maduras son tradicionalmente clasificadas en dos linajes o estirpes: linfoide y mieloide. El linaje linfoide consiste de células B, T y NK, mientras que el linaje mieloide incluye un número de categorías celulares que son morfológica, fenotípica y funcionalmente distintas, incluyendo diferentes subtipos de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos, megacariocitos y células cebadas. Las células dendríticas (DCs) se generan a partir de las vías de diferenciación linfoide o mieloide ^(18,19). Desde el nacimiento, el abastecimiento de las células del linaje linfoide es sostenido por células troncales hematopoyéticas, cuya diferenciación progresa gradualmente en la médula ósea desde progenitores muy primitivos con potenciales múltiples, hasta precursores restringidos que pierden opciones de diferenciación y adquieren funciones especializadas. Este proceso se denomina linfopoyesis temprana y depende de la acción concertada de factores intrínsecos y microambientales que guían el compromiso, proliferación y supervivencia de los progenitores linfoides ⁽²⁰⁾.

Los progenitores hematopoyéticos tempranos están confinados en la médula ósea humana a un compartimiento celular que no expresa en la superficie membranal marcadores de células sanguíneas maduras, pero expresa moléculas CD34 ⁽²¹⁾, lo que ha permitido su aislamiento y caracterización. Entre ellos, los caracterizados por un fenotipo $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^- / \text{CD10}^- \text{CD45RA}^+$ constituyen la fracción de células troncales multipotentes capaces de generar todos los linajes hematopoyéticos, mientras que los progenitores linfoides probablemente más tempranos son $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD10}^-$ y exhiben un potencial aún multipotente pero mayormente restringido a células de estirpe linfoide. Las células $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{IL-7R}^+ \text{CD10}^+$ se diferencian principalmente a linfocitos B ⁽²²⁾ y se han considerado las contrapartes de los progenitores linfoides comunes del ratón (CLPs), en tanto los progenitores con fenotipo $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD7}^+$ son altamente eficientes en la producción de células T y NK ⁽²³⁾.

Aún cuando el conocimiento de los eventos de transición a partir de los progenitores linfoides tempranos y los potenciales CLPs a los precursores de células B es muy limitado, se han identificado poblaciones funcionales que definen la vía de diferenciación río abajo, iniciando con las células B tempranas $CD34^+CD19^-CD10^+$, y continuando con pro-B/pre-BI $CD34^+CD19^+CD10^+$, pre-BII $CD34^-CD19^+CD10^+$, B inmaduras $CD34^-CD19^+CD10^+sIgM^+$ hasta la producción de células B maduras $CD34^-CD19^+CD10^-sIgM^+sIgD^+$, que eventualmente serán exportadas a los tejidos linfoides periféricos para cumplir su función de reconocimiento de antígeno, activación y producción de anticuerpos específicos. El rearreglo ordenado y funcional de los loci de genes de las inmunoglobulinas, dependiente de los genes RAG, es un evento crítico en el proceso del desarrollo temprano de las células B ^(24,25), y culmina en el desarrollo de un repertorio diverso de secuencias funcionales VDJH y VJL que codifican el receptor de las células B, cuya expresión es requisito para la sobrevivencia y la subsecuente maduración celular en la periferia. Además, la acción concertada de múltiples factores de transcripción y componentes del microambiente hematopoyético regulan positiva y negativamente el desarrollo de B (Figura 2).

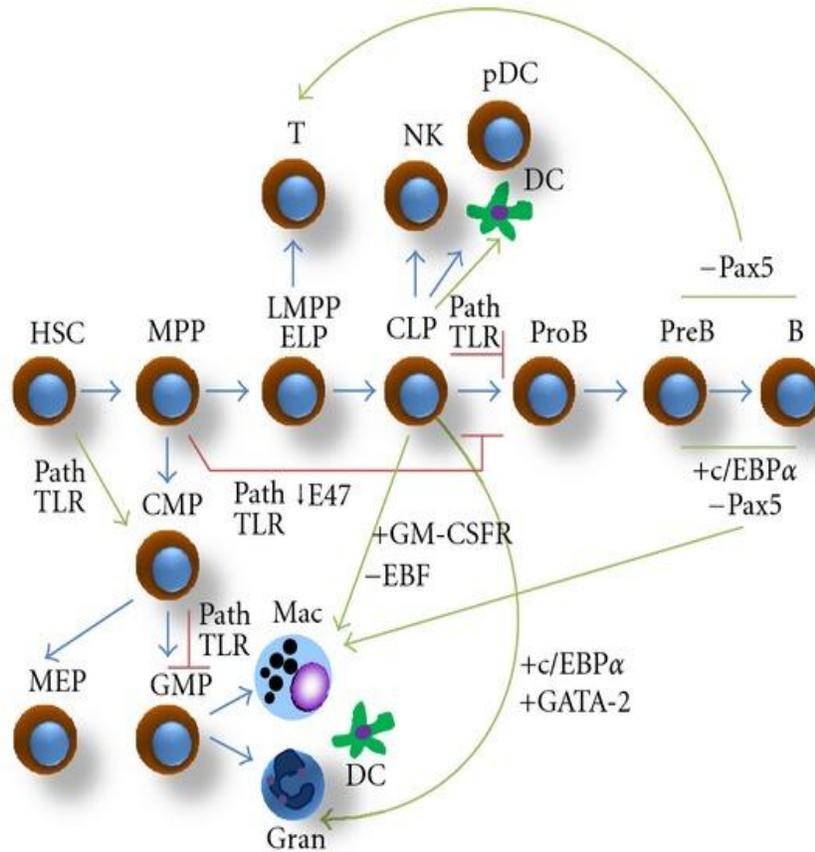


Figura 2. Plasticidad del sistema hematopoyético. Este sistema está organizado de manera jerárquica, en donde los distintos tipos celulares pierden de manera gradual su potencialidad de diferenciación y se comprometen a un linaje específico. La acción concertada de factores de transcripción, así como de los estímulos provenientes del microambiente hematopoyético y de factores solubles puede modificar el compromiso o incluso redirigir el destino de un linaje específico. Las flechas azules indican el proceso normal de hematopoyesis, mientras que las verdes ilustran vías alternas de plasticidad. Las líneas rojas indican el efecto del bloqueo en la diferenciación por patógenos o ligandos de TLR.

HSC: células troncales hematopoyéticas; MPP: progenitores multipotentes; LMPP: progenitores linfoides multipotentes; ELP: progenitores linfoides tempranos; CLP: progenitores linfoides comunes; TLR: Toll-like receptores; MEP: progenitores megacario eritroides; GMP: progenitores de granulocitos-monocitos; Mac: macrófagos; Gran: granulocitos; DC: células dendríticas; T, células T; NK: Células asesinas naturales; pDC: células dendríticas plasmocitoides; GM-CSFR: receptor del factor estimulador de colonias de los granulocitos-macrófagos.⁽⁴²⁾

Evidencia de modificaciones en el linaje celular

En esta era de Medicina Moderna, una interrogante es si la estabilidad de los distintos linajes celulares del sistema hematopoyético es perturbada por señales microambientales durante quimioterapia, inflamación y/o infecciones. Datos recientes señalan que algunos receptores tipo Toll (TLRs, toll-like receptors), los cuales están encargados de reconocer componentes virales y bacterianos en mamíferos, son expresados en la fracción de HSC/progenitores de médula ósea de ratón, y que la interacción de TLR2 y TLR4 con sus ligandos altera los patrones normales de diferenciación y promueve la producción de células mieloides ⁽²⁶⁾. Así mismo, son detectables niveles elevados de transcritos de TLR9 en las fracciones purificadas de progenitores linfoides, abriendo la posibilidad de que estas células directamente reconozcan productos bacterianos y virales ⁽²⁷⁾. Más aún, la generación de células dendríticas es fuertemente favorecida por la unión de DNA con motivos CpG (Citidina-fosfato-Guanina, ligando de TLR9) al TLR9 de los progenitores linfoides ⁽²⁷⁾. En concordancia, la infección por el virus de herpes simple 1 (HSV-1, cuyo DNA es rico en motivos CpG) genera reducción de los precursores de células B en médula ósea y polariza la diferenciación de células plasmacitoides dendríticas y células dendríticas convencionales en cultivo, sugiriendo que en circunstancias de infección viral o exposición a componentes microbianos, los progenitores linfoides tempranos pueden ser reprogramados o seleccionados a un destino de diferenciación distinto ⁽²⁷⁾.

En el humano, la evidencia de que algunas células dentro del compartimiento CD34 en la médula ósea expresan TLR7/8 y TLR9, y son capaces de responder a ellos a través de la diferenciación a linaje mieloides o la producción de IL-8, respectivamente, indica que algunas células hematopoyéticas primitivas están provistas de estos receptores ⁽²⁸⁾. En nuestro laboratorio hemos estado interesados en definir cómo es influenciada la diferenciación hematopoyética de las células troncales y los progenitores linfoides humanos por componentes microbianos que señalizan a través de receptores tipo Toll. Los datos muestran que dichos progenitores purificados expresan transcritos del gen *TLR9*, entre otros TLRs, y cuando son expuestos al ligando CpG se fortalece la producción de células del sistema inmune innato, incluyendo dendríticas y NK ⁽²⁹⁾. Esto sugiere que el sistema de

reconocimiento de componentes microbianos por los TLRs inicia en etapas muy tempranas del sistema linfo-hematopoyético.

Tabla 2. TLRs descritos en el humano: ligando, origen de los ligandos y localización de TLR.⁽⁴³⁾

TLR	Ligando	Origen	Localización
TLR1/2	Lipoproteína triacil polipéptido Pam ₃ CSK ₄	Bacterias y mycobacterias	Transmembranal
TLR2	Lipopéptido de micoplasma activador de macrófagos: MALP-2	Micoplasma	Transmembranal
TLR3	Polu inosina ácido plicitidílico. Poly I:C	Sintético (viral)	Endosomal
TLR4	Lopopolisacáridos: LPS	Bacterias Gram-negativas (Ej. E.coli, Salmonella)	Transmembranal
TLR5	Flagelina	Bacterias Gram-negativas	Transmembranal
TLR6/2	Lipopéptido de micoplasma activador de macrófagos: MALP-2	Mycoplasma	Transmembranal
TLR7	Imiquimod	Sintético	Endosomal
TLR8	Ácido poliuridílico	RNA no viral y RNA de cadena simple (ssRNA)	Endosomal
TLR9	CpG ODNs secuencias de oligodeoxinucleótidos Citidina-fosfato-Guanina	Sintético o viral	Endosomal
TLR10	Desconocido	-	-

Diferenciación linfoide en la leucemia aguda linfoblástica

Además del reconocimiento de antígenos y la producción de anticuerpos, las células B tienen atributos multi-funcionales en la iniciación de las respuestas de células T, presentación de antígenos, liberación de citocinas inmuno-moduladoras, regulación de organización de tejidos linfoides e inmunidad anti-tumoral, entre otros ⁽²⁵⁾. Indudablemente, el trastorno de las vías de su diferenciación temprana resulta en la desregulación de la homeostasis inmune, como es evidente en el desarrollo de las leucemias linfoblásticas. Los estudios en la interfase de la Inmunología y la Hematología han registrado en los últimos años un progreso importante en la investigación de las anormalidades genéticas, moleculares, cariotípicas y fenotípicas que prevalecen en esta enfermedad ^(25,30), pero la comprensión de los mecanismos de daño a los programas de desarrollo linfoide a través de estas anormalidades es a la fecha, muy deficiente. La principal manifestación es un cambio en el destino de los precursores linfoides, a partir de un proceso que es gobernado por el rearreglo funcional de los genes de receptores de antígeno y la respuesta apropiada a reguladores de crecimiento, a un proceso desorganizado con características de resistencia a la apoptosis y menor índice de división celular, e incapacidad de diferenciación competente ^(31,32). Los análisis de rearreglos y translocaciones génicas en pacientes con LLA indicaron por mucho tiempo que esta leucemia representa la expansión clonal de una sola célula transformada ⁽³³⁾. Sin embargo, el hallazgo de patrones diferentes de rearreglo de genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas a diferentes estadios de la enfermedad ha sugerido fuertemente la existencia de oligoclonalidad y oligolinealidad, dando inicio a la hipótesis de que algunas LLA surgen de uno o varios progenitores primitivos en desarrollo previo al inicio de dicho rearreglo ^(34,35). En soporte a esta idea, la detección de cariotipos específicos de leucemia en células primitivas CD34⁺ es sugerente de una transformación muy temprana en la ontogenia ^(36,37). Aunque los distintos subtipos inmunológicos de esta enfermedad reflejan transformación a estadios secuenciales de los linfocitos, estudios recientes demuestran con ensayos de repoblación de ratones quiméricos que solamente algunas células, de fenotipo CD34, son capaces de proliferar y mantener a la clona leucémica, sugiriendo que ellas -más que las células ya comprometidas al linaje- representan el inicio de la transformación ^(32,38),

y que estos progenitores pudieran ser susceptibles a estímulos microambientales y/o componentes microbianos (tales como ligandos de TLRs) que detonaran los cambios de linaje a menudo observados ⁽³⁹⁾.

Planteamiento del problema

La leucemia linfoblástica es una neoplasia maligna caracterizada por la proliferación descontrolada de células linfo-hematopoyéticas en la médula ósea. Es la causa más común de cáncer en la población infantil de México y del mundo, constituyendo un problema serio de salud pública. Aún cuando se ha demostrado una eficiencia relativamente alta de los agentes terapéuticos, el desarrollo de resistencia a fármacos por las células tumorales, así como la frecuente aparición de enfermedad mínima residual y el desarrollo de infecciones serias, ponen a menudo en riesgo el éxito del tratamiento y cambian el pronóstico de la enfermedad. Los mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno y la identidad de las poblaciones hematopoyéticas blanco no han sido totalmente definidos, en parte porque se desconoce el origen celular leucémico, y la susceptibilidad de las células primitivas a factores microambientales. Es posible que las células troncales hematopoyéticas y los progenitores más tempranos que dan inicio al programa de diferenciación linfoide que precede a los estadios de diferenciación del compromiso Pre-B, representen el inicio de la transformación y la inestabilidad del linaje podría tener implicaciones valiosas para el entendimiento de la enfermedad y el curso clínico de la enfermedad, así como en la práctica clínica.

Utilizando un modelo de diferenciación hematopoyética *in vitro*, este estudio constituye un acercamiento a la influencia de los componentes microbianos en las decisiones tempranas de linaje de los precursores en la médula ósea leucémica.

Justificación

El estudio de la hematopoyesis tanto normal como leucémica ha permitido entender a esta patología como un proceso aberrante parcialmente iniciado en células primitivas hematopoyéticas, sin embargo, aún existen importantes interrogantes acerca de los mecanismos responsables del origen, desarrollo y mal pronóstico asociado a cambios en el linaje celular durante las recaídas. El abordaje de la patogenia de la leucemia a nivel de diferenciación celular temprana y susceptibilidad a factores extrínsecos permitirá sentar bases que, sumadas al avance del conocimiento, sean aplicables al diseño de estrategias de manipulación biológica *in vitro* y/o en terapias que favorezcan la salud infantil.

Pregunta de investigación

¿Se pueden generar cambios de linaje a través de estimulación de los TLRs a través de componentes microbianos en la leucemia aguda infantil?

Pregunta específica

¿La activación de TLR por sus ligandos desestabilizará el linaje celular *in vitro*?

Objetivos

Objetivo General

Determinar si la activación de los TLRs promueve cambios de linaje en los progenitores linfoides de médula ósea en la Leucemia Aguda infantil

Objetivos Específicos

- Aislar poblaciones celulares de precursores linfoides hematopoyéticos de la médula ósea de pacientes pediátricos con LLA, LMA, leucemia de linaje mixto (M-LLA) y leucemia aguda congénita (C-LLA).
- Evaluar si la activación de los TLR en los precursores leucémicos puede cambiar el tipo de linaje *in vitro*.

Hipótesis

Las subpoblaciones de precursores hematopoyéticos provenientes de la médula ósea de pacientes pediátricos con leucemia aguda cambiarán su destino de linaje tras la estimulación de los receptores tipo Toll.

Metodología

Diseño del estudio

Este estudio se ha clasificado como un *experimento*, ya que analiza las relaciones entre una o varias variables independientes, y una o varias variables dependientes, y los efectos causales de las primeras sobre las segundas, es decir los efectos de la estimulación de TLRs en la redirección de los patrones de diferenciación de los precursores leucémicos de pacientes pediátricos con leucemia aguda.

Este estudio explora causalidad, y trata de entender un mecanismo biológico, para ello se estudia en condiciones controladas un fenómeno que pudiera ayudar a entender uno de los procesos que ocasionan el cambio de linaje en los pacientes con leucemia aguda linfoblástica.⁽⁴⁰⁾

Metodología experimental

La metodología experimental aplicada a este estudio es detallada en el Anexo 2. De forma general, el diagrama de flujo de las estrategias experimentales utilizadas, se muestra en la Figura 3.

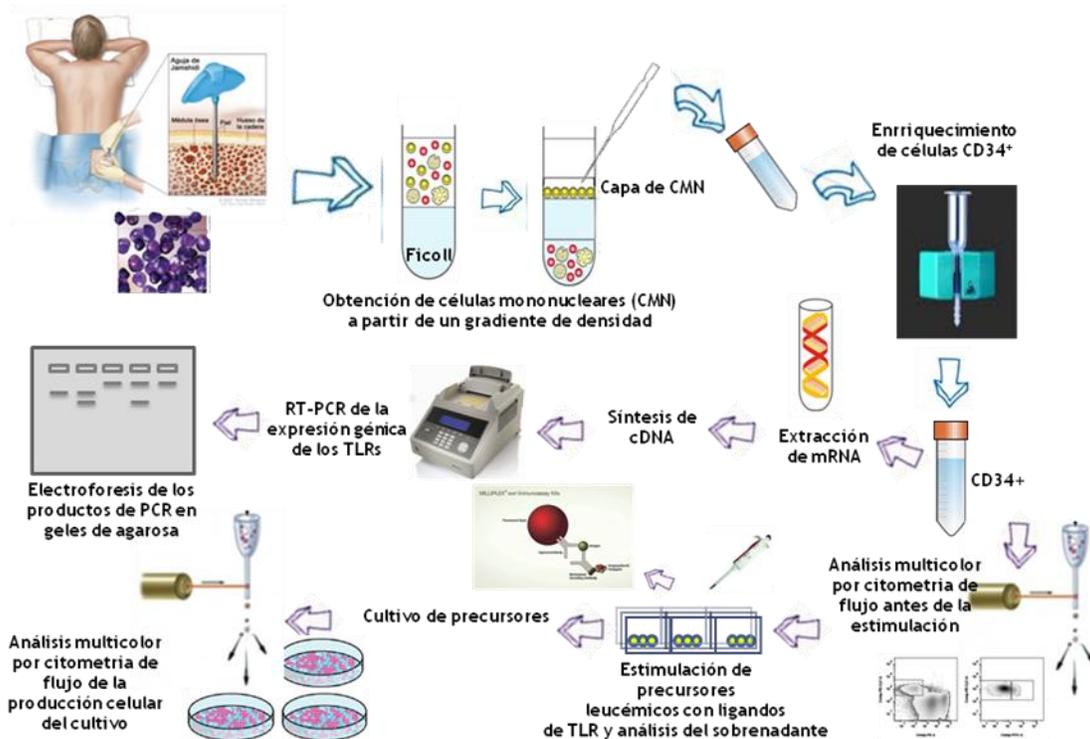


Figura 3. Diagrama de flujo experimental.

Brevemente, los aspirados de médula ósea de pacientes con sospecha de leucemia aguda, tomados tras la firma de consentimiento informado, fueron sometidos a procesos de purificación de las células mononucleares por gradiente de densidad (Ficoll) (Ver anexo 2). Las células mononucleares con fenotipo CD34⁺ fueron seleccionadas por medio de columnas inmunomagnéticas de selección positiva (Miltyne). Las células viables se contaron y analizaron por citometría de flujo para conocer el fenotipo antes de ser estimulado con ligandos de TLR.

Una alícuota se utilizó para extracción de mRNA y síntesis de cDNA y posteriormente realizamos RT-PCR punto final para la expresión de los transcritos de los TLR. (Ver anexo 2). Después de su selección, 150,000 células CD34+ fueron sembradas en pozos de cultivo con 150 microlitros de medio. La **intervención** se realizó a través de la estimulación con un ligando de TLR por pozo. Después de 48 horas el sobrenadante de cultivo fue colectado para la determinación de la concentración de citocinas por análisis de luminometría (Milliplex, Millipore). Las células se trasladaron a pozos con células estromales (Anexo 2) y se cocultivaron por 4 semanas a 37 grados centígrados con 5% de CO₂.

Se realizó cambio de medio con periodicidad semanal y la última semana de cocultivo se estimularon nuevamente con el mismo ligando inicial (Ver Anexo 2).

A las 4 semanas se cosecharon las células, se determinó el número celular, y el **desenlace** se midió por citometría de flujo a través de la determinación de fenotipo.

La inferencia de la causalidad se realizó en base a la comparación de los desenlaces observados en los grupos de células clasificados según la intervención que recibieron (la estimulación con cada ligando de TLR). En todos los casos contamos con un **grupo de células que denominamos control**, que no recibió ninguna maniobra activa, únicamente medio de cultivo sin tratamiento experimental.

Realizamos la comparación de los desenlaces observados (porcentaje de expresión de los marcadores de linaje) entre los grupos de células que recibieron diferentes intervenciones. Además, realizamos comparaciones intragrupos (**antes y después**) de los desenlaces observados antes y después de aplicar las intervenciones.

Criterios de inclusión:

- Células de pacientes menores de 18 años de edad, que cumplan con los criterios oncológicos para diagnóstico de leucemia aguda
- Sin tratamiento previo
- Que aceptaran participar en el estudio

Criterios de exclusión:

- Células de pacientes con leucemia linfoblástica aguda secundaria a quimioterapia
- Que no acepten participar en el estudio

Criterios de eliminación:

- Contaminación de la muestra del aspirado de médula ósea. Muestras de médula ósea con número celular insuficiente para los ensayos

Tamaño de muestra**Procedimientos y supuestos para el tamaño de muestra**

Dado que se estudiarán patrones de cambio en el linaje que se representan como proporciones o porcentajes de células obtenidas después de una maniobra experimental, se calculó un tamaño de muestra para comparar dos proporciones. Para esperar un cambio en el linaje en al menos 30% de los sujetos estudiados.

Obtuvimos una n de 9 pacientes por grupo, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$n = \frac{[2(\bar{p}\bar{q})][(Z\alpha+Z\beta)^2]}{(\Delta)^2}$$

Donde:

\bar{p} = $(p_1+p_2)/2$ proporción de respuestas en cada grupo

q = $1-p$

Δ = $p-r$

p = frecuencia relativa del resultado en el grupo 1

r = frecuencia relativa del resultado en el grupo 2

α = 0.05

β = 90%

Población diana

- Médula ósea de pacientes pediátricos recién diagnosticados con leucemia aguda.

Población accesible

- 10 muestras de médula ósea (MO) de pacientes con LLA (precursores B)
- 2 muestras de MO de pacientes con LLA (células T)
- 1 muestra de MO de paciente con leucemia aguda congénita
- 2 muestras de MO de paciente con leucemia de linaje mixto
- 1 muestra de MO de paciente con LMA

Tipos de variables y escalas de medición

Variable Independiente

Estimulación de precursores leucémicos por ligandos de TLRs

Cualitativa ordinal

Se considerará estimulación o no estimulación de las tres poblaciones de progenitores linfoides en células de pacientes con LLA

Variable Dependiente

Cambio de linaje (medido en categorías celulares)

Porcentaje o proporción de células de cada categoría celular. Las categorías son: células B o T, células mieloides, células NK. Cada tipo celular diferenciado se identifica por su fenotipo en un citómetro de flujo.

Análisis de los datos

Se analizaron los datos de manera inicial con estadística descriptiva y posteriormente estadística inferencial.

Se utilizó el programa Prism V3.02 (GraphPad, San Diego, CA) para analizar estadísticamente los resultados.

Para comparar las diferencias entre proporciones de las poblaciones celulares obtenidas de los cultivos, utilizamos la prueba de ji-cuadrada, que es considerada como una prueba no paramétrica que mide la discrepancia entre una distribución observada y otra teórica, indicando en qué medida las diferencias existentes entre ambas, de haberlas, se deben al azar en el contraste de hipótesis. También se utiliza para probar la independencia de dos variables entre sí, mediante la presentación de los datos en tablas de contingencia. Para este análisis se utilizaron los programas STATA y SPSS.

Resultados

Previa firma de consentimiento informado, se obtuvieron alícuotas de aspirados de médula ósea de reciente diagnóstico de 16 pacientes pediátricos sin tratamiento previo. Los pacientes incluidos cumplieron criterios para leucemia aguda de acuerdo a los lineamientos internacionales. De los 16 pacientes incluidos, 10 se diagnosticaron con leucemia aguda linfoblástica de precursores B (B-LLA), 1 con leucemia aguda congénita (C-LLA), 2 con leucemia aguda linfoblástica de células T (T-LLA) y 2 con leucemia aguda linfoblástica de linaje mixto (M-LLA). Como control se utilizó la alícuota de un aspirado de médula posea de un paciente pediátrico sin enfermedad hematológica sometido a una cirugía ortopédica. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez bajo el registro HIM/2009/033. Las características de los pacientes del estudio se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Paciente	Edad (años)	Sexo	Leuc/mm3	Dx. morfológico	Fenotipo	Porcentaje de infiltración de blastos a la médula ósea	Riesgo clínico asignado	Factores de riesgo
1	12	M	87,900	LLA-L2	B-LLA	88.9	AR	Leucocitosis Edad
2	2	F	12300	LLA-L1	B-LLA	80	RH	--
3	7	M	13800	LLA-L1	B-LLA	96	RH	--
4	7	F	157,000	LLA-L1	B-LLA	78.1	AR	Leucocitosis
5	10	M	70,700	LLA-L1	B-LLA	80	AR	Edad Leucocitosis
6	7	M	123,000	LLA-L2	B-LLA	98	AR	Leucocitosis
7	9	M	25,800	LLA-L2	B-LLA	98.5	RH	--
8	20	F	15,630	LLA-L1	B-LLA	80	AR	Edad
9	13	M	211,000	LLA-L2	B-LLA	98	AR	Edad Leucocitosis
10	4	M	34,220	LLA-L1	B-LLA	90	RH	--
11	4 meses	F	156,800	LLA-L1	C-LLA	94	AR	Edad Leucocitosis
12	7	M	17,400	LLA-L1	T-LLA	71.4	AR	Células T
13	3	M	75,800	LLA-L1	T-LLA	89	AR	Células T Falla a la respuesta esteroidea Leucocitosis LCR +
14	7	M	37,300	LLA-L2	M-LLA	94.2	AR	Falla a la respuesta esteroidea
15	13	M	200,000	LLA-2	M-LLA	6	AR	Edad Leucocitosis
16	15	M	144,600	LMA-M1	LMA	94	AR	Leucocitosis

Leu= cuenta de leucocitos, M=masculino, F=femenino, B-LLA= leucemia aguda linfoblástica de precursores B, T-LLA= Leucemia aguda linfoblástica de células T, M-LLA= leucemia aguda de linaje mixto, LMA= Leucemia mieloide aguda, C-LLA= leucemia congénita, AR= Alto riesgo, RH= Riesgo habitual.

Los precursores hematopoyéticos en las leucemias agudas expresan TLR funcionales y responden a su estimulación con la producción de citocinas

Para determinar la expresión de los transcritos de TLR, fueron realizados ensayos de reacción en cadena de la polimerasa de punto final (RT-PCR) en células CD34+ provenientes de médula ósea de pacientes pediátricos. Se investigaron 5 subtipos de leucemias: (B-LLA) leucemia aguda linfoblástica de precursores B, (T-LLA) Leucemia aguda linfoblástica de

células T, (M-LLA) leucemia aguda de linaje mixto, (LMA) Leucemia mieloide aguda, y (C-LLA) leucemia congénita.

De acuerdo a los resultados, los niveles de expresión de transcritos de TLR son variables en los precursores leucémicos, y los perfiles muestran heterogeneidad entre las diversas entidades leucémicas investigadas. De manera interesante, el transcrito de TLR3 no pudo ser detectado en B-LLA y su expresión fue extremadamente baja en los otros subtipos de leucemias (Figura 4).

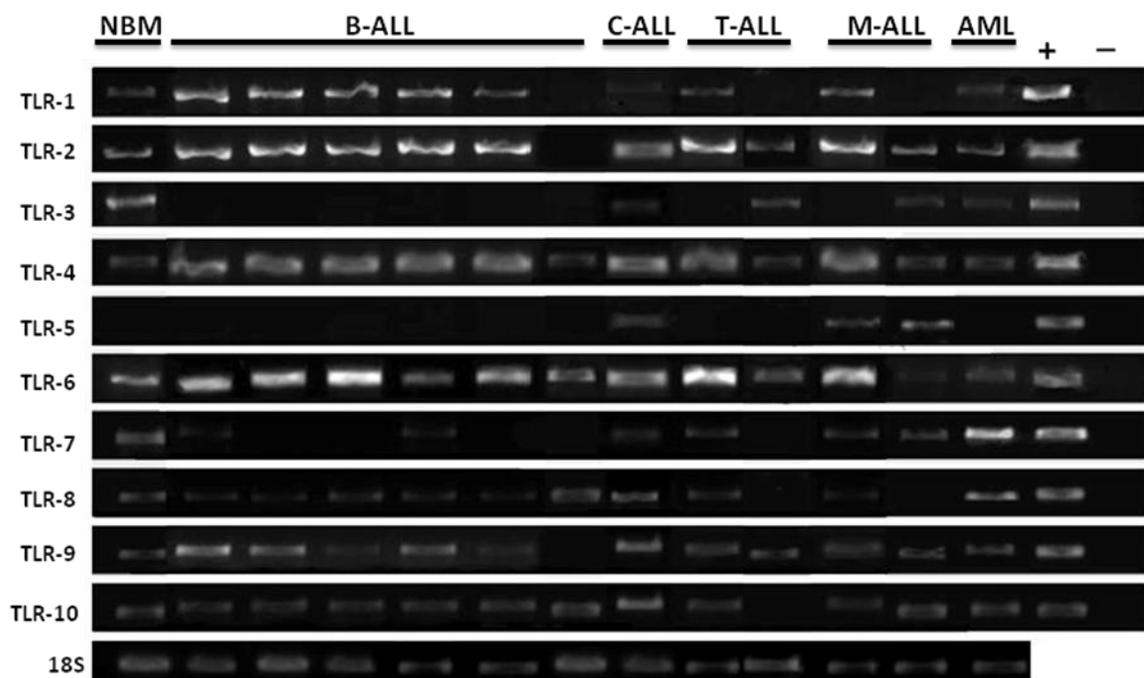


Figura 4. Expresión variable de transcritos de TLR en precursores hematopoyéticos de LA pediátrica. Células precursoras CD34+ de médula ósea de leucemias agudas fueron purificadas por separación magnética y su transcripción de TLR analizada por RT-PCR. Los controles positivos son plásmidos que expresan TLR, mientras que el control negativo fue H₂O DEPC. La subunidad 18s de rRNA se utilizó como gen constitutivo. NBM: médula ósea normal; B-ALL: precursor de células B de leucemia linfoblástica aguda; C-ALL: leucemia linfoblástica aguda congénita; LLA-T: leucemia linfoblástica aguda de células T; M-ALL: leucemia de linaje mixto; AML: leucemia mieloide aguda.

Los niveles de expresión de los transcritos fueron analizados por densitometría y comparados con su contraparte normal. Como se muestra en las gráficas resultantes, la expresión del transcrito de TLR5 fue elevada en las leucemias agudas de mal pronóstico, esto es, en C-LLA y M-LLA; en tanto que los transcritos de TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9 mostraron muy heterogéneos patrones de expresión con respecto a la contraparte no leucémica (Figura 5).

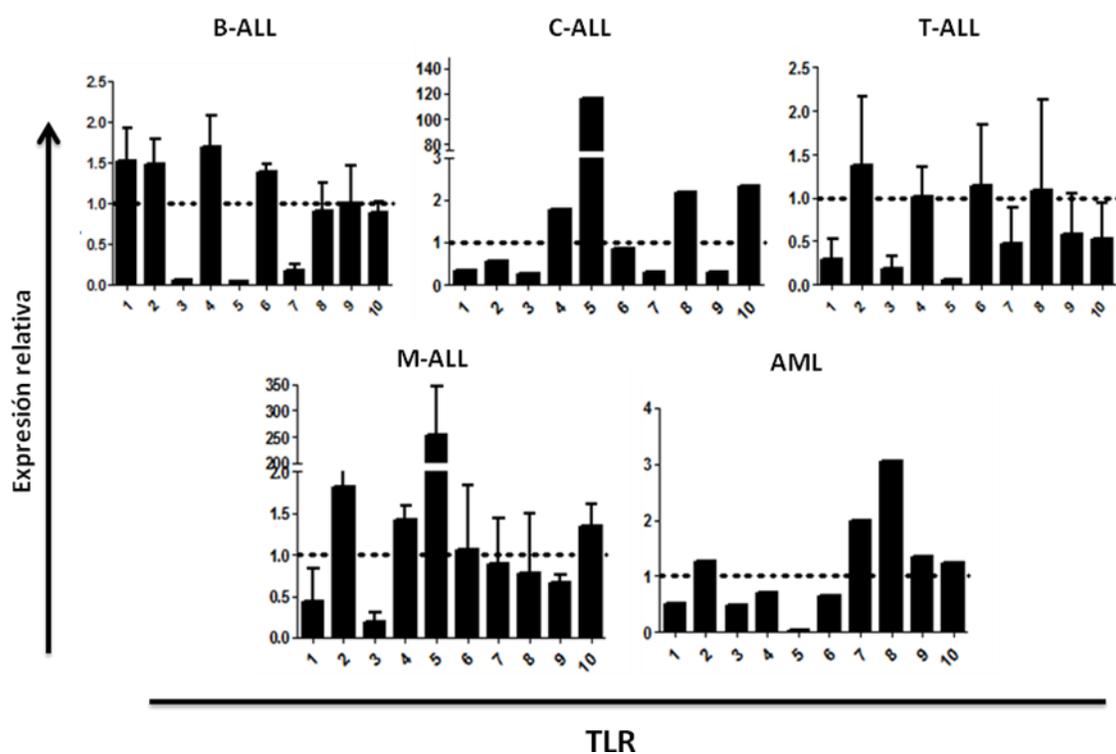


Figura 5. Expresión relativa de transcritos de TLR en células precursoras de leucemias agudas: elevada expresión de TLR5 en leucemias de mal pronóstico. Células precursoras CD34+ de médula ósea de leucemias agudas fueron purificadas por separación magnética y su transcripción de TLR analizada por RT-PCR. Los niveles de expresión del transcrito en diversos subtipos de leucemia aguda en relación con su contraparte normal se tabularon después de los análisis de densidad. Valores normalizados a 1.

Por otro lado, dado que los factores solubles del microambiente hematopoyético contribuyen a la selección de los linajes, su evaluación a través de ensayos de luminometría podría proporcionar información importante acerca de cambios mediados por señales de TLR. Así, en sobrenadantes (medios condicionados) de células CD34+ con y sin estimulación con ligandos de TLR, se midieron las concentraciones de un total de 28 citocinas y factores de crecimiento. Destacaron por su relativa elevada producción en general G-CSF, IL-6, GM-CSF, y MCP-1. De forma interesante, la producción de MCP-1 fue promovida por estimulación de TLR4, TLR5, TLR7/8 y TLR9 (Figura 6).

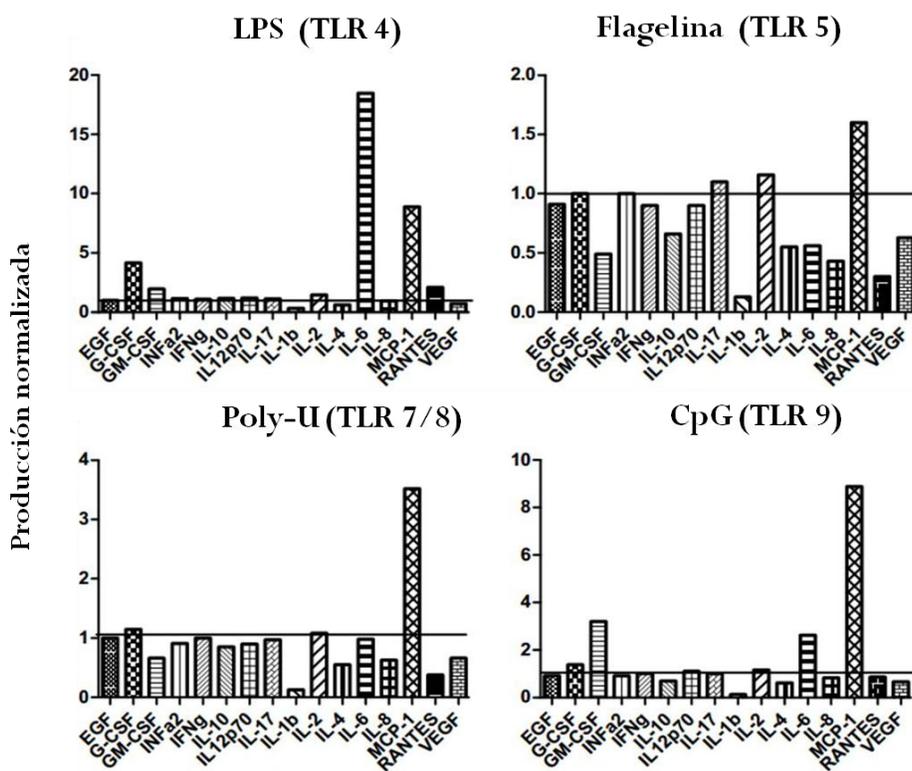


Figura 6. La estimulación con ligandos de TLR promueve la producción de factores hematopoyéticos a partir de células progenitoras CD34+ en LLA. Las CD34+ fueron estimuladas con agonistas de TLR durante 48 h. LPS se utilizó como agonista de TLR4, mientras que la flagelina como ligando de TLR5, PolyU de TLR7/8 y CpG de TLR9. Se recogieron los sobrenadantes a las 48h de estimulación y se ensayaron para 16 citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Producción normalizada de progenitores CD34+ de pacientes con leucemia aguda linfoblástica.

Los agonistas de TLR alteran los potenciales de diferenciación de los precursores hematopoyéticos en leucemias agudas: promoción del desarrollo de células NK y linaje mieloide.

Para determinar si la estimulación con ligandos de TLR puede influenciar cambios en la diferenciación de linajes de células precursoras provenientes de médulas óseas leucémicas, las fracciones celulares CD34+ purificadas fueron expuestas a ligandos de diversos TLR por 48 horas, al final de lo cual se cultivaron a largo plazo y se evaluó la producción celular. Es notable que la diferenciación de células B no es drásticamente alterada por la estimulación de los TLR de membrana TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6. En contraste, la producción y/o mantenimiento de células primitivas CD34+ es aparentemente promovida por dichas señales, específicamente por TLR2 y TLR4 en la leucemia congénita (Figuras 7 y 8), lo que sugiere que en algunas enfermedades como C-LLA, los TLR pueden contribuir a la auto-renovación de células primitivas. Lo mismo ocurrió cuando los progenitores B-ALL se expusieron a Poli(I:C). Finalmente, las células primitivas de leucemia aguda mixta mostraron una interesante tendencia a producir más células B que las contrapartes no estimuladas después de ser expuestas al tratamiento con flagelina.

Aunque la exposición de las células a ligandos de TLR intracelulares permitió constatar la estabilidad general de la producción del linaje B, su incremento en respuesta a los agonistas de TLR3 y TLR9, fue evidente en los progenitores en LLA Pre-B y en LLA mixta (M-ALL), respectivamente, al compararla con las fracciones celulares y patologías que no fueron estimuladas (Figura 9).

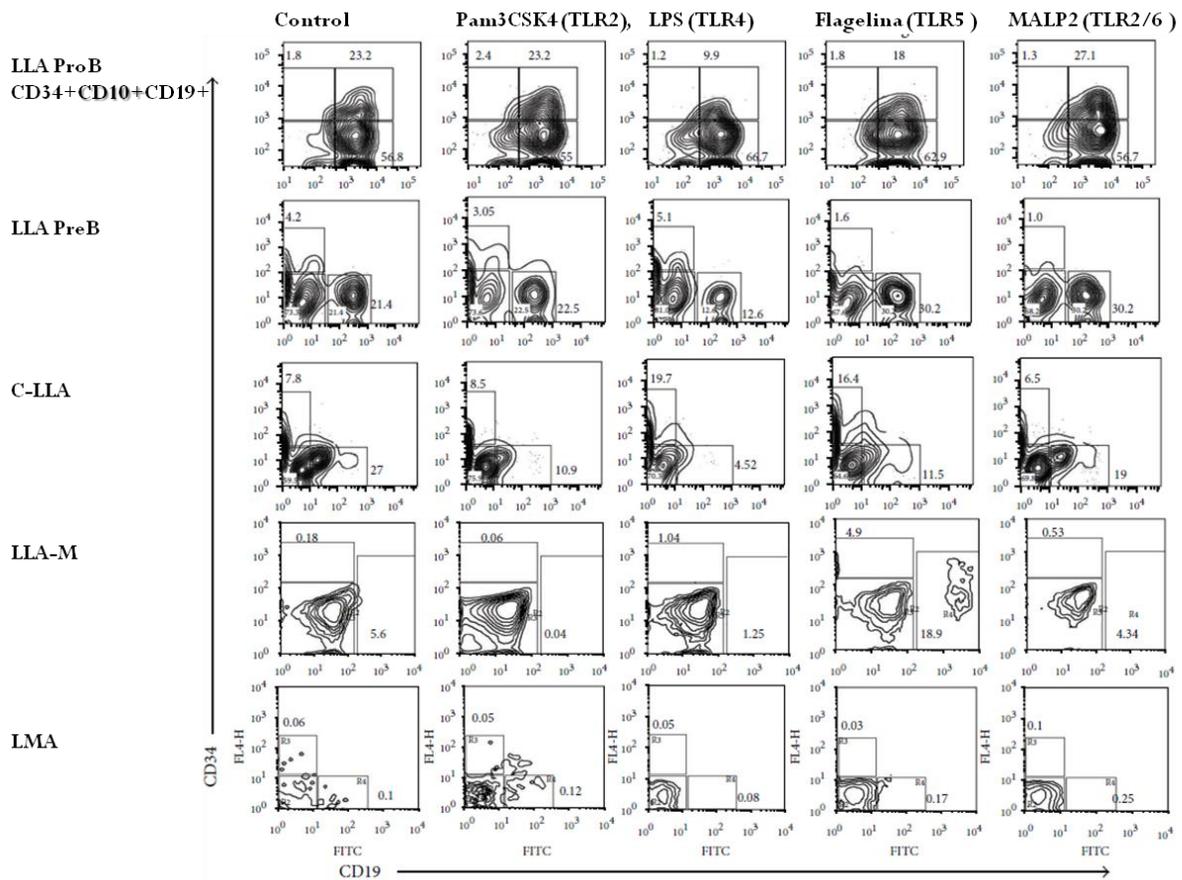
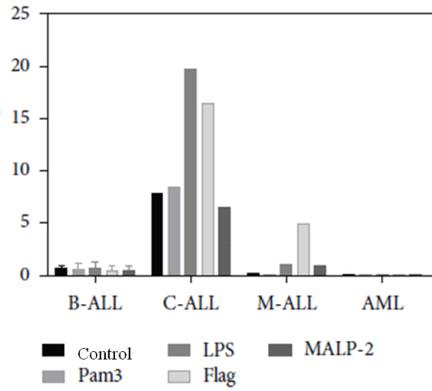


Figura 7. La diferenciación de células B en leucemia aguda no es sustancialmente alterada por la estimulación de TLR de membrana. Las células CD34+ de médula ósea de proB-LLA, preB-ALL, C-ALL, M-ALL y AML fueron purificadas y estimuladas con Pam3CSK4 (agonista de TLR2), LPS (agonista de TLR4), flagelina (agonista de TLR5) y MALP2 (agonista de TLR2/6) durante 48 h, seguido por el co-cultivo con células estromales durante 30 días. La identificación de células recién producidas de fenotipo CD34+ y CD19+ fue hecha por citometría de flujo multiparamétrica. Se muestran cultivos representativos y las frecuencias celulares de cada población. LLA Pro-B: leucemia de células B con predominio de células CD19+ CD10+ CD34+; LLA PreB: leucemia linfoblástica de precursores de células B con predominio de CD19+CD10+CD34-; C-LLA: leucemia linfoblástica aguda congénita; LLA-M: leucemia linfoblástica aguda de linaje mixto; LMA: leucemia mieloide aguda.

Frecuencias celulares para CD34⁺



Frecuencias celulares para CD19⁺

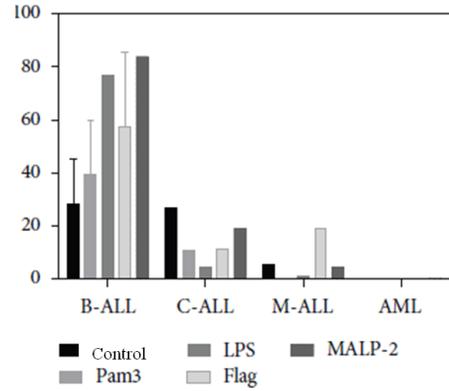
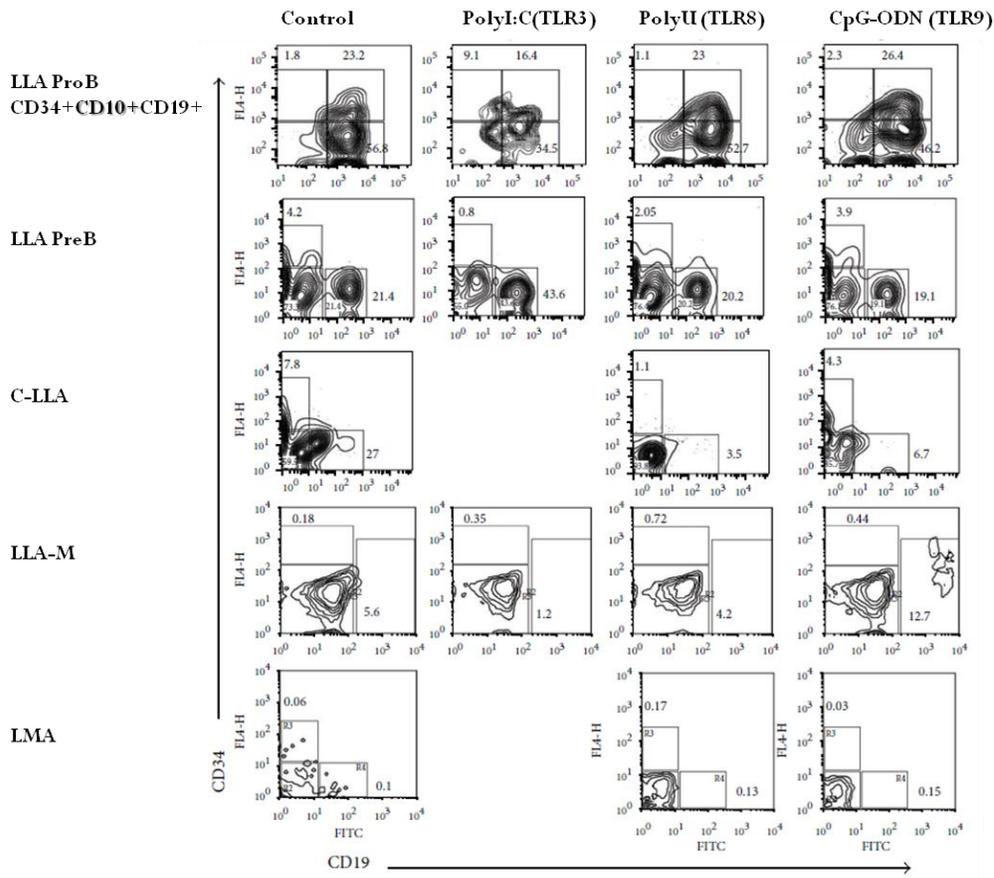


Figura 8. Producción celular en cultivos linfoides estimulados con ligandos de TLR membranales: aparente promoción del mantenimiento de células primitivas por TLR4 y TLR5 en LLA congénita. Las células CD34⁺ de médula ósea de B-LLA, C-ALL, M-ALL y AML fueron purificadas y estimuladas con Pam3CSK4 (agonista de TLR2), LPS (agonista de TLR4), flagelina (agonista de TLR5) y MALP2 (agonista de TLR2/6) durante 48 h, seguido por el co-cultivo con células estromales durante 30 días. La identificación de células recién producidas de fenotipo CD34⁺ y CD19⁺ fue hecha por citometría de flujo multiparamétrica. Se muestra la tabulación de las frecuencias celulares de cada población post cultivo.

A



B

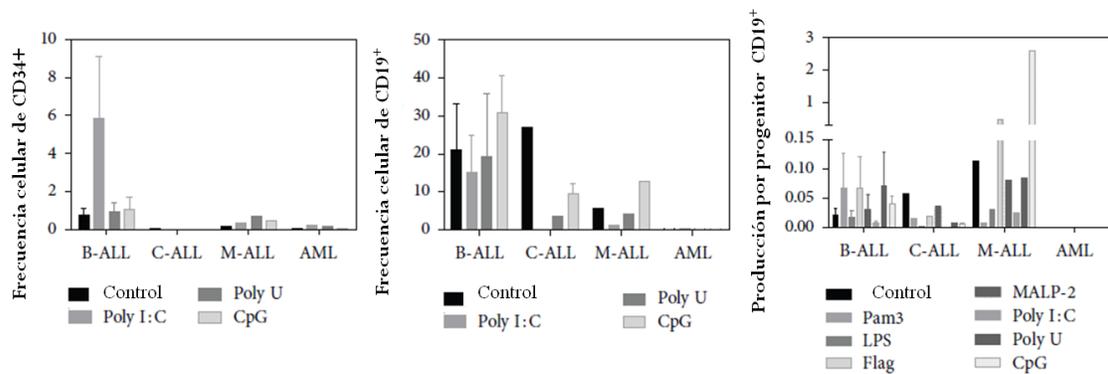


Figura 9. La estimulación de TLR9 en progenitores hematopoyéticos contribuye a la producción *in vitro* de células B en leucemia aguda de linaje mixto. Las células CD34+ de médula ósea de proB-LLA, preB-ALL, C-ALL, M-ALL y AML se estimularon con poli(I: C) (ligando de TLR3), PolyU (ligando de TLR8) y CpG-ODN (ligando de TLR9) durante 48h, seguido de su co-cultivo por 30 días en estroma. A través de citometría de flujo multiparamétrica se analizaron las poblaciones CD19+ y CD34+ recién producidas. Se

indican las ventanas de discriminación celular (A), así como las frecuencias celulares dentro del cultivo (B). Los números totales de células CD19+ recuperadas de cada condición de tratamiento se calcularon y son expresados como rendimientos por progenitor inicial (B, panel derecho). Pro-ALL: leucemia de precursores de células B con predominio de células CD19+ CD10+ CD34+; preB-ALL: leucemia de precursores de células B con predominio de CD34-CD10+CD19+, C-ALL: LLA congénita; M-ALL: LLA de linaje mixto; AML: leucemia mieloide aguda.

Se ha descrito en la hematopoyesis murina que las señales de TLR2 y TLR4 inducen la diferenciación mieloide, un fenómeno que también se puede lograr en los seres humanos cuando los progenitores hematopoyéticos se estimulan con Pam3CSK4 y con ligandos de TLR7/8. Para investigar si dentro de los cambios inducidos por las señales de TLR en progenitores hematopoyéticos, se encuentra la inducción de linajes mieloides dentro de un microambiente de diferenciación linfoide, procedimos a verificar las frecuencias de células CD14+ al término de los cultivos a largo plazo. En concordancia con lo observado en médula ósea de ratón, la aparición de células CD14+ marcó la tendencia de los progenitores linfoides de todas las patologías estudiadas a responder a la estimulación de TLR a través del robustecimiento de la producción mieloide (Figura 10). De especial interés resultó el incremento de la frecuencia de células CD14+ en la leucemia aguda de linaje mixto al enfrentamiento con MALP2 (agonista de TLR2/6) y de la leucemia congénita con el agonista de TLR9 CpG (Figuras 10 y 11). Como era de esperar, nuestras condiciones de cultivo controladas no promueven la mielopoyesis regular, y las células de médula ósea de LMA no mostraron un robusto potencial de diferenciación bajo el efecto de un microambiente linfoide. Cultivos en condiciones netamente mieloides deben llevarse a cabo para evaluar la sensibilidad de estos progenitores a los componentes microbianos en el contexto de enfermedad leucémica.

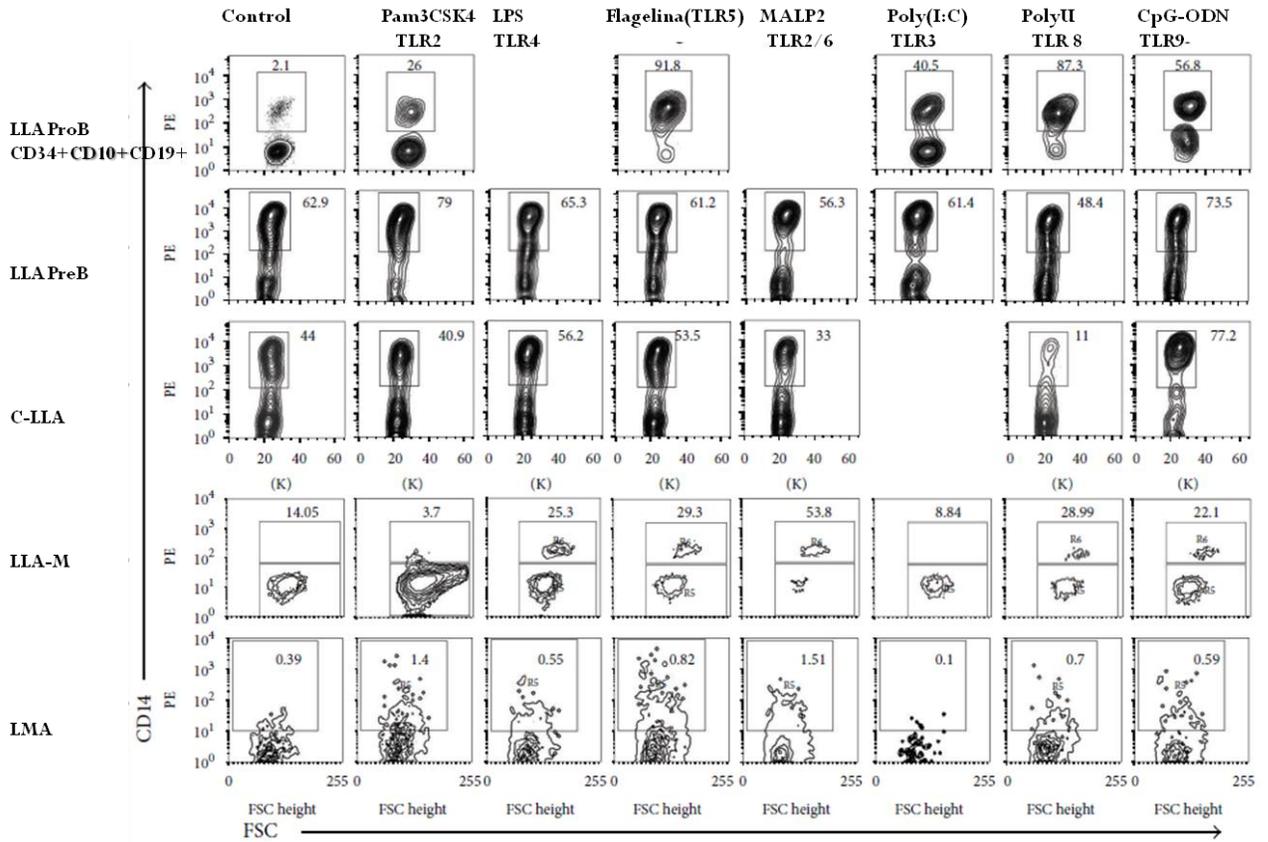


Figura 10. Perfiles de producción emergente de linaje mieloide a partir de progenitores linfoides en leucemias agudas infantiles. Células CD34+ fueron purificadas a partir de médula ósea de todos los subtipos de leucemia investigados, y estimuladas con Pam3CSK4 (ligando TLR2), LPS (ligando TLR4), flagelina (ligando TLR5), MALP2 (ligando TLR2/ 6), poli(I:C) (ligando TLR3), PolyU (ligando TLR8) y CpG-ODN (ligando TLR9) durante 48h, seguido por co-cultivo a 30 días. Las células CD14+ recién producidos se identificaron por citometría de flujo multiparamétrica, y las frecuencias fueron calculadas para cada ventana de identificación.

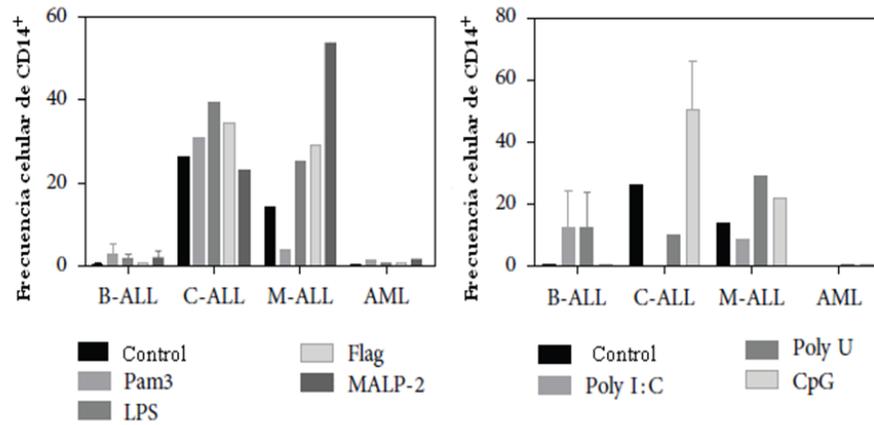


Figura 11. Producción relativa de células mieloides CD14⁺ en co-cultivos linfoides sometidos a estimulación de TLR. Las ventanas de identificación celular mostradas en la Figura 10 se utilizaron para determinar las frecuencias de células dentro del cultivo. Se muestran las tabulaciones resultantes. Bajo estas condiciones de cultivo linfoide, la leucemia mieloide aguda mostró potenciales de diferenciación muy pobres y ninguna influencia evidente por la exposición a agonistas de TLR.

De llamar la atención, el efecto más poderoso de LPS fue registrado en el comportamiento de los precursores de células de T-LLA bajo condiciones de cultivo linfoides, donde las células CD14⁺ surgieron rápidamente (Figura 12).

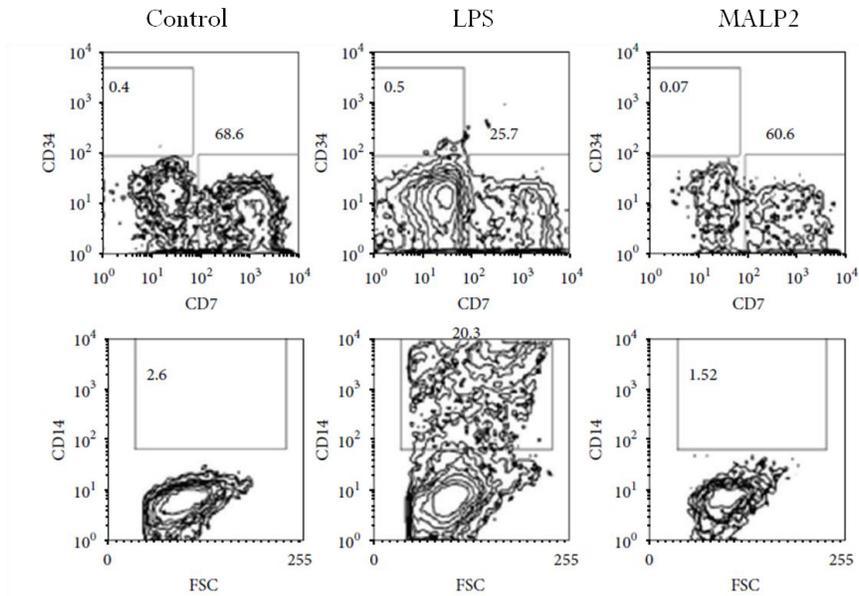


Figura 12. Las señales de TLR4 en progenitores linfoides de LLA-T promueven la diferenciación de células con fenotipo mieloide. Se evaluó la formación de células CD14+ por citometría de flujo tras co-cultivos de 30 días. El mantenimiento de las células CD7+ no fue modificado, mientras que las de fenotipo CD34-CD7-CD14+ tendió a aumentar con el tratamiento con LPS.

Observaciones previas de nuestro laboratorio han sugerido que tanto los progenitores multilinfoides CD45RA+, así como las células progenitoras linfoides más comprometidos de la médula ósea normal de adultos responden a la estimulación de TLR9 mediante la inducción del receptor de IL-15 (CD122) en la membrana de los precursores de células NK y la rápida producción de células NK funcionales, mientras que sus homólogos neonatales no muestran tal competencia (Vadillo et al., en revisión). En concordancia, nuestros resultados indican que la señalización inducida por los ligandos sintéticos PolyU, MALP2 y CpG resulta en la estimulación del desarrollo de las células NK CD56+ CD11c+ a partir de precursores en C-LLA y B-LLA, respectivamente. Tanto las frecuencias celulares, como los números absolutos de células NK recién formadas, indican que las neoplasias linfoides tienen excelente potencial de producción de dichas células innatas por esta vía de diferenciación emergente (Figuras 13 y 14).

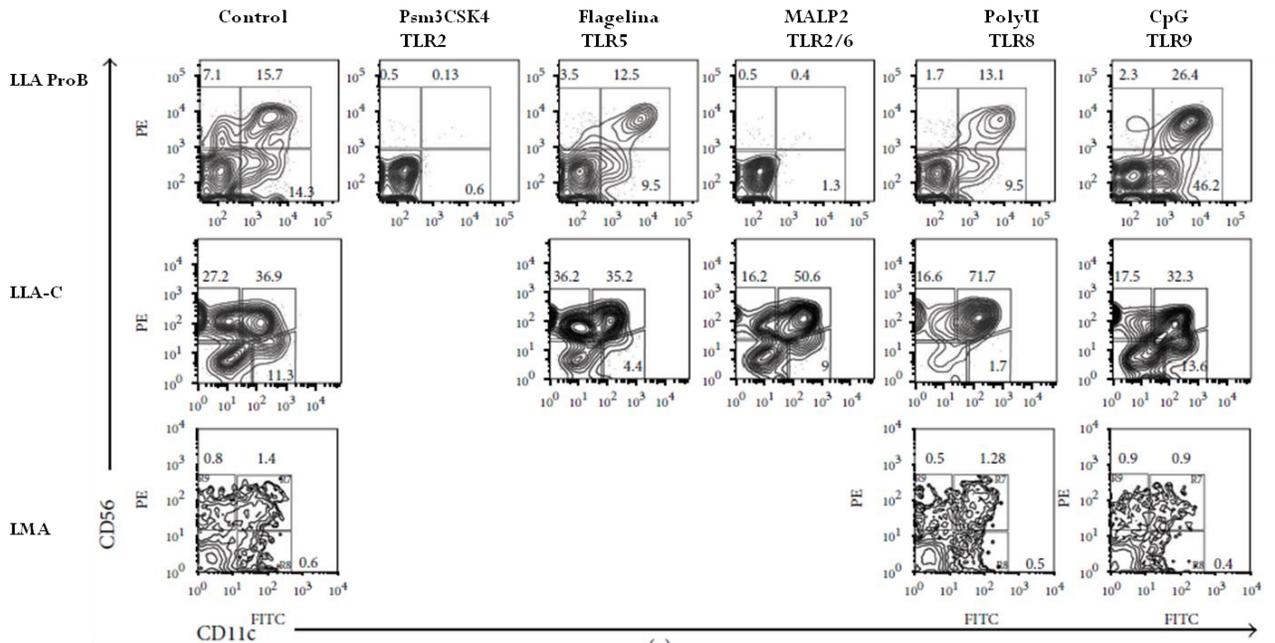


Figura 13. La estimulación de TLR conduce a la producción de células NK de fenotipo maduro en LLA. Las células CD34+ fueron purificadas de MO de LLA ProB, LLA-c y LMA, y estimuladas con Pam3CSK4 (agonista de TLR2), flagelina (agonista de TLR5), MALP2 (agonista de TLR2/6), PolyU (agonista de TLR8) y CpG-ODN (agonista de TLR9) durante 48 h. Después de 30 días de cultivo, las células CD56+ CD11c- y CD56+ CD11c+ de reciente producción fueron identificadas por citometría de flujo multiparamétrica. LLA-Pro-B: LLA de precursores de B con predominio de células CD19+CD10+CD34+; ALL-C: ALL congénita; LMA: leucemia mieloide aguda.

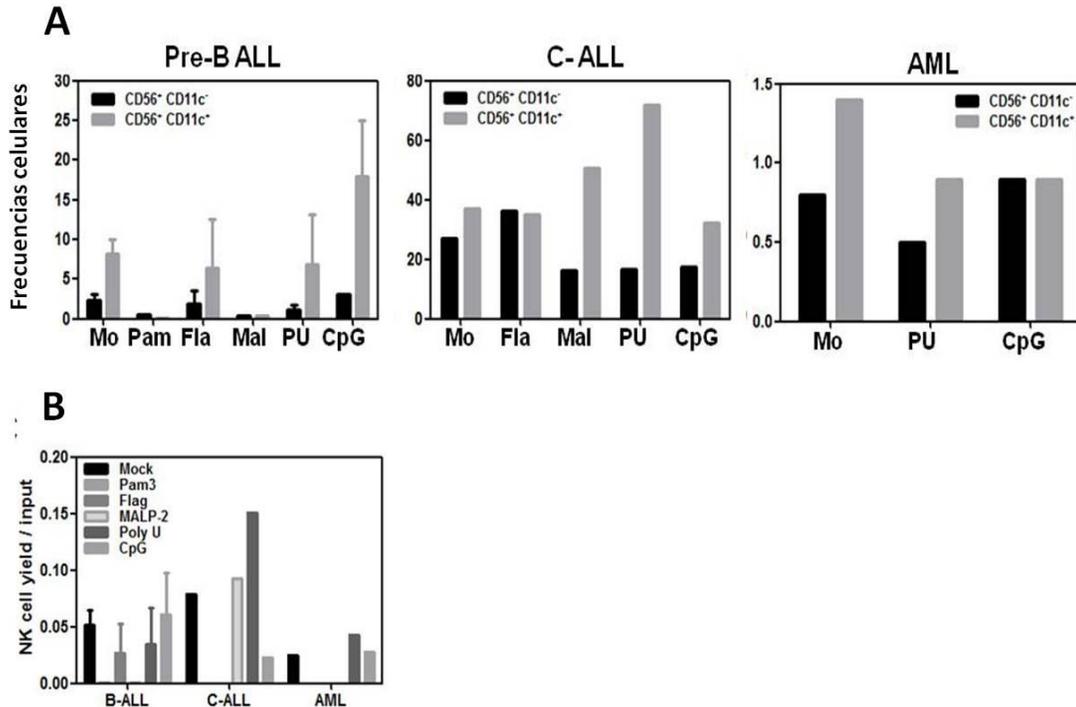


Figura 14. Producción de células NK emergentes a partir de progenitores linfoides. Las células CD34⁺ fueron purificadas de MO de LLA ProB, LLA-C y LMA, y estimuladas con Pam3CSK4, flagelina, MALP2, PolyU y CpG-ODN durante 48 h, de acuerdo a lo descrito previamente. Después de 30 días de cultivo, las células CD56⁺ CD11c⁻ y CD56⁺ CD11c⁺ de reciente producción fueron identificadas por citometría de flujo multiparamétrica. Los cuadrantes indicados en la Figura 13 se utilizaron para determinar las frecuencias celulares en cada subtipo de leucemia (A). Los números totales de células CD56⁺ se recuperaron a partir de las diversas condiciones de tratamiento, fueron calculados y expresados como rendimientos por progenitor sembrado inicialmente (B). LLA-Pro-B: LLA de precursores de B con predominio de células CD19⁺CD10⁺CD34⁺; ALL-C: ALL congénita; LMA: leucemia mieloide aguda.

La actividad citotóxica *in vitro* de las células NK producidas a partir de progenitores primitivos de leucemia fue demostrada utilizando métodos no radiactivos, lo que corroboró la capacidad funcional de las células NK derivadas de la vía de diferenciación emergente en LLA (Figura 15A). Además, se confirmó por citometría de flujo en estas células la expresión de la molécula de NKG2D, un potente receptor de activación de las células NK (Figura 15B). Finalmente, para probar el efecto del ligando de TLR9 en la transcripción de factores celulares que caracterizan linajes, y entender el mecanismo de este agonista para influir en

la producción de las células NK, abordamos la posibilidad de una actividad elevada de Id-2, un factor de transcripción esencial en la diferenciación de la vía NK. Además, fueron evaluados Pax-5 para la vía de diferenciación de linaje B, y EBP-a para el linaje mieloide. Interesantemente, se encontraron diferencias sustanciales al comparar los niveles de transcripción de Id-2 de los controles simulados y las células estimuladas con CpG (Figura 15B). Id-2 es un antagonista natural de las proteínas E, y su incremento puede conducir al subóptimo desarrollo de T, B y pDC, mientras se promueve la producción de células NK. Este efecto se observó también en LLA-C al estímulo con agonistas de TLR7/8. En contraste, no se registraron cambios aparentes en la transcripción de Pax-5 y EBP-a (Figura 15B).

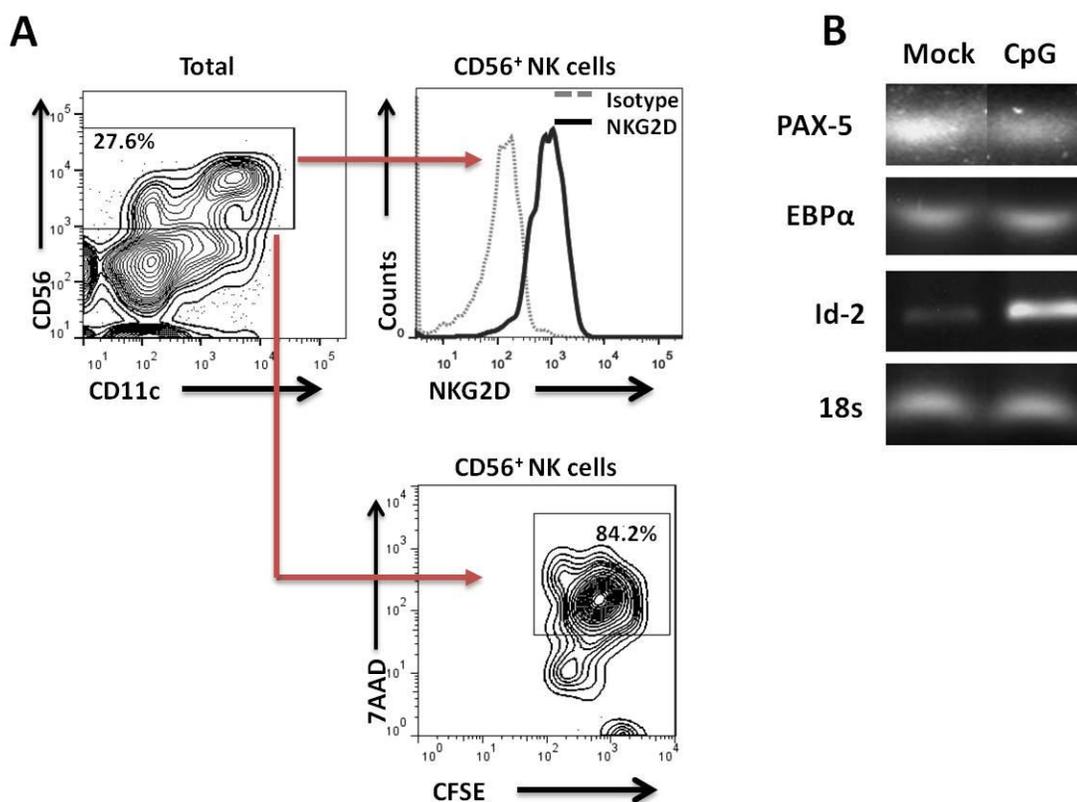


Figura 15. Las células NK emergentes son funcionales y su alta producción se asocia a un aumento de la transcripción de Id-2. La capacidad citotóxica de las células NK fue evaluada usando células blanco K562 marcadas con CFSE. La citotoxicidad fue evaluada por incorporación 7AAD en las células muertas, mientras que la expresión del receptor de activación NKG2D se analizó por citometría de flujo (A). La expresión de los factores de transcripción Pax-5, EBPα e Id-2 se analizó por RT-PCR a 48 h de estimulación con CpG (B). Mo: control; Pam: Pam3CSK4; Fla: flagelina; Mal: MALP2; PU: PolyU.

Discusión

El reconocimiento de patógenos por las células del sistema inmunológico se lleva a cabo por una lista creciente de receptores de reconocimiento de patrones microbianos, incluyendo los receptores de tipo Toll, que dan inicio a las respuestas inmunes innatas mediante la inducción de la producción de citocinas pro-inflamatorias y la expresión de moléculas co-estimuladoras ⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾. El reciente descubrimiento de la regulación de las vías de desarrollo hematopoyéticas por TLRs sugiere que éstos están involucrados en las decisiones del destino celular temprana y contribuyen a la reposición emergente de células inmunes innatas durante las infecciones ^(48-50,51-53). El presente trabajo contribuye al conocimiento de las respuestas celulares a señales microambientales, como los componentes de patógenos en el contexto de las neoplasias malignas hematológicas. Se demuestra que el potencial de diferenciación de las células B de los precursores linfoides de la mayoría de los subtipos de leucemias agudas es estable a la estimulación de TLR. En contraste, estas células primitivas aumentan eficazmente la producción de células mieloides y NK innatas como resultado de la activación de esta vía emergente.

Tanto nuestro grupo de investigación, como otros laboratorios, han reportado previamente determinadas discrepancias cualitativas y cuantitativas en la expresión de TLR dentro del compartimiento primitivo en médula ósea y cordón umbilical, lo que sugiere una heterogeneidad sustancial basada en la fuente de la muestra y en la categoría de los progenitores hematopoyéticos tempranos en estudio ^(54,55,56). Por otra parte, los patrones de transcripción y expresión de TLR pueden variar conforme progresa la diferenciación ^(50,57). En congruencia, los resultados de esta investigación sugieren que los subtipos de leucemia también poseen diferentes patrones de expresión de transcritos de TLR (Figuras 4 y 5). Aunque un posible papel de los patrones de TLR en la patogénesis de estas enfermedades todavía no está claro, las variaciones observadas podrían explicarse por el predominio de un tipo conspicuo de progenitoras dentro de cada muestra, lo que permite la posibilidad de tener habilidades variables para luchar contra las enfermedades infecciosas y neoplásicas.

La producción de citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, incluyendo TNF α , IL-12, IL-3, IL-6, IL-8, GM-CSF y MCP-1, como un resultado de la señalización de la vía de los TLR en las células hematopoyéticas primitivas normales ha sido previamente documentado (43,56,58-59). Como parte del microambiente hematopoyético, estos factores solubles contribuyen a las decisiones del destino celular linaje en condiciones específicas. En este estudio, G-CSF, IL-6, GM-CSF y MCP-1 resultaron aumentados al momento de la estimulación de TLR en diversas patologías leucémicas (Figura 6), lo que confirma que, como en los progenitores hematopoyéticos normales, las células precursoras leucémicas están dotadas de TLR funcionales y responden a sus agonistas con la producción de citocinas. Notablemente, la MCP-1 fue altamente producida. Es ampliamente conocido que la MCP-1 es una quimiocina con efectos supresores sobre la hematopoyesis normal, que atrae monocitos a las células leucémicas sin la promoción de efectos positivos sobre la citotoxicidad de monocitos. Su regulación al alza como consecuencia de la exposición a TLR, posiblemente promueva la supervivencia, la proliferación y la adhesividad de las células de leucemia y puede representar una posible explicación de los desequilibrios microambientales en neoplasias hematológicas. Además, durante tratamientos con quimioterapia, la MCP-1 está regulada positivamente en el líquido cefalorraquídeo, lo que sugiere que la destrucción celular y la liberación de DAMPs pueden activar el programa de TLR, resultando en la liberación crítica de MCP-1.

Los cultivos celulares a 30 días, revelaron que la producción y mantenimiento de las células CD34⁺ fueron promovidos de manera importante en las células de leucemia congénita siempre y cuando se agregaran al medio de cultivo ligandos de los TLR de membrana. En contraste, la producción de células de linaje B permaneció estable durante la estimulación con los ligandos de TLR al compararla con los controles sin estimulación.

Las células primitivas de la leucemia de linaje mixto tuvieron tendencia a producir células de linaje B. En general, al final de los cultivos, los precursores linfoides de todas las leucemias linfoblásticas cambiaron su patrón de diferenciación hacia la producción de células CD14⁺ (marcador de linaje mieloide). Este efecto fue más marcado al estimular a las células provenientes de leucemias de células T al estimularlas con LPS (ligando de TLR4).

Nuestros resultados indican que en los cultivos, tras la estimulación con PolyU (ligando de TLR8) o CpG (ligando de TLR9) las frecuencias de células NK inmaduras ($CD56^+CD11c^-$) disminuyeron de manera significativa, mientras que la población de células NK maduras ($CD56^+CD11c^+$), tuvo un discreto incremento, sobre todo en las leucemias de precursores B y LLA congénita, lo cual podría tener en un futuro un impacto clínico al promover la proliferación de células de la respuesta inmune innata. Entonces, las células primitivas en la médula ósea leucémica reconocen patrones asociados a moléculas que promueven la diferenciación de células precursoras de la respuesta inmune innata, implicando posiblemente una regulación de las decisiones en el linaje celular en la leucemia a través de ligandos de TLR.

Por otro lado, se ha demostrado recientemente que la flagelina participa en la radioprotección y en la reducción de la enfermedad injerto contra huésped después del trasplante, a través de la promoción de las funciones de las células T reguladoras⁽⁶⁰⁾. A pesar de los cambios discretos en las frecuencias de células B en los cultivos estimulados con dicho agonista, ninguna de las enfermedades hematológicas probados mostró signos de mantenimiento o progresión tumoral.

Serán necesarios experimentos adicionales para comprender cómo los factores de transcripción influyen en la restricción de linaje en la enfermedad, y para probar la capacidad funcional de las células NK derivadas de leucemias agudas como resultado de la señalización de TLR. El conocimiento de los efectos citotóxicos y las propiedades reguladoras de las células NK que se producen cuando las señales de TLR se dan en las neoplasias hematológicas, puede tener un impacto clínico crucial.

Durante neoplasias hematológicas, incluyendo las leucemias agudas, los receptores de tipo Toll proporcionan un mecanismo para la producción de células del sistema inmune innato de etapas tempranas del desarrollo hematopoyético. Hasta donde sabemos, esta es la primera investigación que se realiza en torno a las respuestas de los precursores linfoides a ligandos agonistas de TLR en el contexto de las leucemias agudas. Los hallazgos sugieren que el desarrollo linfóide B está poco influenciado por agentes infecciosos, que contrasta con la promovida producción de los linajes mielóide y NK en respuesta a las infecciones, o el daño

celular asociado a la enfermedad. Por tanto, la exposición a ligandos de TLR en células progenitoras linfoides podría ser explotada como una estrategia complementaria para mejorar la vigilancia anti-neoplásica natural en la leucemia infantil.

Conclusiones

Las células primitivas de las leucemias agudas reaccionan ante la estimulación con ligandos de TLR de manera heterogénea, modificando sus potenciales de diferenciación celular hacia la diferenciación de células precursoras de la respuesta inmune innata NK y mieloides.

Los precursores linfoides de las leucemias agudas, expresan transcritos de TLR y algunos (TLR5) son aparentemente asociados a entidades de mal pronóstico clínico.

Las células leucémicas parecen estar inmersas en un microambiente inflamatorio y aberrante, en el que se incluyen niveles incrementados de MCP1, que suprime la hematopoyesis normal.

Mientras la diferenciación de células B en general no es alterada, el mantenimiento de células CD34⁺ puede ser promovido por ligandos de TLR.

Perspectivas y preguntas por resolver

- ¿Los distintos subtipos de leucemias tienen diferentes capacidades cualitativas y cuantitativas ante las infecciones?
- ¿La activación con ligandos agonistas de TLR está implicada en la leucemogénesis y el mantenimiento de la leucemia?
- ¿Qué fenómenos genéticos y epigenéticos están relacionados con el cambio en los potenciales de diferenciación celular?
- ¿Podría tener impacto clínico al promover la proliferación de células de la respuesta inmune innata en LA?

Limitaciones del estudio

El presente estudio no exploró *in vivo* el fenómeno de reprogramación. Sin embargo, permitió abordar un mecanismo que contribuye potencialmente a dicho fenómeno.

Consideraciones éticas

Se consideró investigación con riesgo mayor a mínimo.

Sin embargo en cuanto a los pacientes con LA se tomó una alícuota de la misma toma de muestra necesaria para el diagnóstico. En ningún momento tomamos aspirados de médula ósea sólo para el protocolo de investigación.

Todos los procedimientos realizados fueron autorizados bajo una carta de consentimiento informado que se adjunta en el **anexo 3**.

Nota importante: Este protocolo de investigación fue sometido a la consideración de Comisiones de Investigación, Ética y Bioseguridad del Hospital Infantil de México Federico Gómez, y autorizado su desarrollo bajo el registro HIM/2009/033. Desde un inicio se planteó con fines académicos para obtención de grado de la aspirante a Doctorado.

Consideraciones de bioseguridad

El presente protocolo se basó en la obtención y manejo de muestras biológicas provenientes de Médula Ósea Normal y Leucémica, para lo cual en el Laboratorio donde realizamos los ensayos se tienen estandarizados todos los protocolos para su transporte, obtención, procesamiento y desecho, así como las instalaciones necesarias para el manejo de dichas muestras. A continuación se realiza una breve descripción de cada procedimiento:

La toma de las muestras, fue realizada por la Oncóloga-Pediatra Elisa María Dorantes Acosta, quien fraccionó una alícuota del aspirado de médula ósea que ella misma tomó como parte de los procedimientos del diagnóstico y seguimiento de cada paciente. Para la muestra de médula ósea normal, la Dra. Dorantes se presentó al servicio de ortopedia del Hospital Infantil de México y recibió del ortopedista la muestra al momento de realizar la cirugía ósea.

Las muestras biológicas fueron transportadas al laboratorio de investigación en contenedores cerrados herméticamente y rotulados con la leyenda de material biológico, a 4°C de temperatura (empleando congelantes), en un tiempo no mayor a 60 minutos.

Una vez en el laboratorio, la muestra fue colocada en una campana de flujo laminar clase II para su procesamiento y manipulación, lo cual consiste en la obtención de la subpoblación hematopoyética CD34+, por medio de selección positiva.

Antes de desechar el material utilizado (biológico, material de plástico (tubos, pipetas, puntas y desechos líquidos), éste fue inactivado con cloro en el cual permanecieron por al menos 24 horas, para posteriormente eliminarse y depositarse en los contenedores específicos para desechos biológicos infecciosos con naturaleza líquida y/o punzo cortante (dependiendo del tipo de desecho). El destino final de los desechos fue su destrucción mediante incineración, proceso que se realizó fuera del laboratorio, pero bajo las normas generales del Hospital de Oncología del CMN Siglo XXI, las cuales se rigen por las Normas Oficiales Mexicanas y los Reglamentos oficiales vigentes en la materia, previa aprobación de la Secretaría de Salud.

Referencias

1. Xie Y, Davies SM, Xiang Y, Robison LL, Ross JA. Trends in leukemia incidence and survival in the United States (1973-1998). *Cancer* 2003 May 1;97(9):2229-35.
2. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/continuas/vitales/BD/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
3. McNeil DE, Cote TR, Clegg L, Mauer A. SEER update of incidence and trends in pediatric malignancies: acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 2002 Dec;39(6):554-7.
4. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Martínez-Avalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L, Flores-Chapa Jde D, Amador-Sánchez R, Peñalosa-González JG, Alvarez-Rodríguez FJ, Bolea-Murga V, Flores-Lujano J, Rodríguez-Zepeda Mdel C, Rivera-Luna R, Dorantes-Acosta EM, Jiménez-Hernández E, Alvarado-Ibarra M, Velázquez-Aviña MM, Torres-Nava JR, Duarte-Rodríguez DA, Paredes-Aguilera R, Del Campo-Martínez Mde L, Cárdenas-Cardos R, Alamilla-Galicia PH, Bekker-Méndez VC, Ortega-Alvarez MC, Mejía-Arangure JM. *BMC Cancer*. 2011 Aug 17;11:355.
5. Medina-Sanson A, Martínez-Avalos A, Gallegos-Castorena S, Juárez-Villegas LE, González-Montalvo P, Perales-Arroyo A, et al. Pediatric oncology at Hospital Infantil de México: fifty-five years of accomplishment. *Pediatr Hematol Oncol* 2002 Sep;19(6):383-7.
6. Dirección General de Información en Salud. Estadísticas de salud en niños y adolescentes. México, D.F.: Bol Med Hosp Infant Mex; 2004. Report No.: 4.
7. Mejía-Aranguré JM, Bonilla M, Lorenzana R, et al. Incidence of leukemia in children from El Salvador and Mexico City between 1996 and 2000: population-based data. *BMC Cancer* 2005, 5:33.
8. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 1997 Feb 1;349(9048):344-9.
9. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985 Sep;103(3):460-2.
10. Gagnon, G.A., Childs, C.C., LeMaistre A., et al, Molecular heterogeneity in acute leukemia lineage switch *Blood* **74**,2088-2095 (1989)
11. Stass S, Mirro J, Melvin S, Pui C-H, Murphy SB, Williams D: Lineage switch in acute leukemia. *Blood* **64**:701, 1984
12. Zarrabi MH, Rosner F, Grunwald HN: Second neoplasms in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* **52**:1712, 1983
13. Simpson EM, Matt MG: Hybrid leukemia of T cell and myeloid lineages: Cytogenetic distinction from second (induced) malignancy. *Br J Haematol* **65**:401, 1987
14. Dorantes-Acosta ED, Arreguin-González F, Rodríguez-Osorio CA, et al., Acute myelogenous leukemia switch lineage upon relapse to acute lymphoblastic leukemia: a case report. *Cases Journal* 2:154, 2009
15. Jiang JG, Roman E, Nandula SV, et al., Congenital MLL-positive B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) switched lineage at relapse to acute myelocytic leukemia (AML) with persistent t(4;11) and t(1;6) translocations and JH gene rearrangement *Leuk & Lymphoma*, **46**: 1223, 2005

16. Palomero T., McKenna J., O-Neil I et al., Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. *Leukemia* **20**: 1963–1966, 2006
17. Stasik C, Ganguly S, Cunningham MT, et al. Infant acute lymphoblastic leukemia with t(11;16)(q23;p13.3) and lineage switch into acute monoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **168**:146, 2006
18. Pelayo R, Welner R, Perry SS, Huang J, Baba Y, Yokota T, et al. Lymphoid progenitors and primary routes to becoming cells of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2005 Apr;17(2):100-7.
19. Pelayo R, Welner RS, Nagai Y, Kincade PW. Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol* 2006 Feb;18(1):2-11.
20. Welner RS, Pelayo R, Kincade PW. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat Rev Immunol* 2008 Feb;8:95.
21. Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 2006;24:287-320.
22. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995 Oct;3(4):459-73.
23. Haddad R, Guardiola P, Izac B, Thibault C, Radich J, Delezoide AL, et al. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood* 2004 Dec 15;104(13):3918-26.
24. LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000 Jul 1;96(1):9-23.
25. LeBien TW & Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008, 112:1570-1580.
26. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, Akira S, Takatsu K, Kincade PW. 2006. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 24:801-812
27. Welner RS, Pelayo R, Nagai Y, Garrett KP, Wuest TR, Carr DJ, Borghesi LA, Farrar MA, Kincade PW. 2008. Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood*. PMID 18552210.
28. Kim JM, Kim NI, Oh YK, et al. CpG oligodeoxynucleotides induce IL-8 expression in CD34+ cells via mitogen-activated protein kinase-dependent and NF- κ B-independent pathways. *International Immunol* 2005, 17:1525-1531.
29. Vadillo E, Arriaga L, Reyes E, et al. La exposición de progenitores linfoides tempranos al ligando del receptor tipo Toll-9 promueve la diferenciación de células del sistema inmune innato. *Foro Nacional de Investigación en Salud 2009, Tesis de Maestría en Ciencias 2010, y manuscrito en preparación.*
30. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007, 446:758-764.
31. Campana D & Janossy G. Proliferation of normal and malignant immature lymphoid cells. *Blood* 1988, 71:1201-1210.
32. Purizaca J, Dorantes E, Vadillo E, et al. Diferenciación hematopoyética de progenitores linfoides tempranos en la leucemia linfoblástica aguda. *Foro Nacional de Investigación en Salud 2009, Tesis de Maestría en Ciencias 2009, y manuscrito en preparación.*
33. Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, et al. Immunoglobulin gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasm. *N Engl J Med* 1983, 309:1593.
34. Davi F, Gocke C, Smith S, Sklar J. Lymphocytic progenitor cell origin and clonal evolution of human B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 1996, 88:609-621.

35. Stankovic T, Weston V, McConville CM, et al. Clonal diversity of Ig and T-cell receptor gene rearrangements in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 2000, 36:213-224.
36. Quijano CA, Moore D, Arthur D, et al. Cytogenetically aberrant cells are present in the CD34+CD33-CD38-CD19- marrow compartment in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 1997, 11:1508-1515.
37. George AA, Franklin J, Kerkof K, et al. Detection of leukemic cells in the CD34+CD38- bone marrow progenitor population in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 2001, 97:3925-3930.
38. Cox CV, Evely RS, Oakhill A, et al. Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* 2004, 104:2919-2925.
39. Chiron D, Bekeredjian-Ding I, Pellat-Deceunynck C, et al. Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood* 2008, DOI 10.1182/blood-2008-02-140673
40. Hulley, S.B. y Cummings, S.R. *Diseño de la investigación clínica*. Ed. Doyma, Barcelona, 1993.
41. Dorantes Acosta E., Medina Sanson A., Dávila Ornelas K., López Martínez B., Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 2013;12(3): 136-142.
42. Dorantes-Acosta E, Pelayo R. Lineage switching in acute leukemias: a consequence of stem cell plasticity? *Bone Marrow Res.* 2012;2012:406796
43. Vadillo E., Pelayo R., Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético. *Rev Invest. Clin* 2012;64(5): 461-76
44. T. Kawai and S. Akira, "TLR signaling," *Seminars in Immunology*, vol. 19, no. 1, pp. 24–32, 2007.
45. C. Pasare and R. Medzhitov, "Control of B-cell responses by Toll-like receptors," *Nature*, vol. 438, no. 7066, pp. 364–368, 2005.
46. A. Iwasaki and R. Medzhitov, "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses," *Nature Immunology*, vol. 5, no. 10, pp. 987–995, 2004.
47. L. Cervantes-Barragán, C. Gil-Cruz, R. Pastelin-Palacios et al., "TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to Salmonella typhi antigens," *European Journal of Immunology*, vol. 39, no. 1, pp. 126–135, 2009.
48. Y. Nagai, K. P. Garrett, S. Ohta et al., "Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment," *Immunity*, vol. 24, no. 6, pp. 801–812, 2006.
49. R. S. Welner, R. Pelayo, and P. W. Kincade, "Evolving views on the genealogy of B cells," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 2, pp. 95–106, 2008.
50. R. S. Welner, R. Pelayo, Y. Nagai et al., "Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection," *Blood*, vol. 112, no. 9, pp. 3753–3761, 2008.
51. R. S. Welner, B. L. Esplin, K. P. Garrett et al., "Asynchronous RAG-1 expression during B lymphopoiesis," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 12, pp. 7768–7777, 2009.
52. M. T. Baldrige, K. Y. King, and M. A. Goodell, "Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells," *Trends in Immunology*, vol. 32, no. 2, pp. 57–65, 2011.

53. J. R. Boiko and L. Borghesi, "Hematopoiesis sculpted by pathogens: toll-like receptors and inflammatory mediators directly activate stem cells," *Cytokine*, vol. 57, no. 1, pp. 1–8, 2012.
54. K. De Luca, V. Frances-Duvert, M.-J. Asensio et al., "The TLR1/2 agonist PAM3CSK4 instructs commitment of human hematopoietic stem cells to a myeloid cell fate," *Leukemia*, vol. 23, no. 11, pp. 2063–2074, 2009.
55. J. M. Kim, N. I. Kim, Y.-K. Oh, Y.-J. Kim, J. Youn, and M.-J. Ahn, "CpG oligodeoxynucleotides induce IL-8 expression in CD34+ cells via mitogen-activated protein kinase-dependent and NF- κ B-independent pathways," *International Immunology*, vol. 17, no. 12, pp. 1525–1531, 2005.
56. M. Sioud, Y. Fløisand, L. Forfang, and F. Lund-Johansen, "Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitor cells along the myeloid lineage," *Journal of Molecular Biology*, vol. 364, no. 5, pp. 945–954, 2006.
57. M. A. Schmid, H. Takizawa, D. R. Baumjohann, Y. Saito, and M. G. Manz, "Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes," *Blood*, vol. 118, no. 18, pp. 4829–4840, 2011.
58. M. Sioud and Y. Fløisand, "TLR agonists induce the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitors into CD11c+ CD80/86+ DC capable of inducing a Th1-type response," *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 10, pp. 2834–2846, 2007.
59. S.-A. Lee, S.-M. Kim, Y.-H. Son et al., "Peptidoglycan enhances secretion of monocyte chemoattractants via multiple signaling pathways," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 408, no. 1, pp. 132–138, 2011.
60. M. S. Hossain, D. L. Jaye, B. P. Pollack et al., "Flagellin, a TLR5 agonist, reduces graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients while enhancing antiviral immunity," *Journal of Immunology*, vol. 187, no. 10, pp. 5130–5140, 2011.

Anexo 1. Abreviaturas utilizadas en esta tesis

APC	Alofococianina
CD	Grupo de Diferenciación, del inglés <i>Cluster of Differentiation</i>
cDC	Célula Dendrítica Convencional, del inglés <i>conventional Dendritic Cell</i>
cDNA	DNA complementario
CLP	Progenitores Linfoides Comunes, del inglés <i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CMN	Células Mononucleares
CpG	Citidina-fosfato-Guanina
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño, del inglés <i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DC	Célula Dendrítica, del inglés <i>Dendritic Cell</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Deoxirribonucleótido Trifosfato
dsRNA	Ácido Ribonucleico de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELP	Progenitores Linfoides Tempranos, del inglés <i>Early Lymphoid Progenitor</i>
FAB	Franco-Americano-Británico
Fc	Fracción cristalizable
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína

Flt3L Ligando de Tirosina Cinasa 3 Relacionado a Fms, del inglés *Fms-like tyrosine kinase receptor 3*

G-SCF Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos, del inglés *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

GM-SCF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos, del inglés <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HSC	Células Troncal Hematopoyética, del inglés <i>Hematopoietic Stem Cell</i>
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IFN	Interferón
LC	Leucemia Congénita
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de precursores de células B
LLA-T	Leucemia Linfoblástica Aguda de precursores de células T
LLM	Leucemia de Linaje Mixto
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LP	Progenitor Linfoide, del inglés <i>Lymphoid Progenitor</i>
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
MLP	Progenitor Multilinfoide, del inglés <i>Multi-Lymphoid Progenitor</i>
MO	Médula Ósea
MON	Médula Ósea Normal
MPP	Progenitor Multipotente, del inglés <i>Multi-Potent Progenitor</i>
mRNA	RNA mensajero
MyD88	Gen de respuesta primaria de diferenciación Mieloide 88
NF-κB	Factor nuclear kappa B, del inglés <i>Nuclear Factor kappa B</i>
NK	Célula Asesina Natural, del inglés <i>Natural Killer</i>

PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
pDC	Célula Dendrítica Plasmacitoide, del inglés <i>plasmacytoid Dendritic Cell</i>
Pre-B	Precursor de Células B en estadio Pre-B
Pro-B	Precursor de Células B en estadio Pro-B
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrones, del inglés <i>Pattern Recognition Receptor</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa
SCF	Factor para Células Troncales, del inglés <i>Stem Cell Factor</i>
SFB	Suero Fetal Bovino
SPM	Sangre Periférica Movilizada
ssRNA	Ácido Ribonucleico de cadena sencilla
TBE	Amortiguador de Tris-Boratos-EDTA
TIR	Toll/receptor de IL-1
TLR	Receptor tipo-Toll, del inglés <i>Toll-like Receptor</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa, <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TPO	Trombopoyetina
TRAM	Molécula Adaptadora Relacionada a TRIF, del inglés <i>TRIF-Related Adaptor Molecule</i>
TRIF	Adaptador Inducido por Interferón beta que contiene un dominio TIR, del inglés <i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>

Anexo 2. Ensayos de laboratorio

Obtención de células mononucleares

A partir de muestras de médula ósea (MO) se separaron las células mononucleares (CMN) por un gradiente de densidad con Ficoll/Hypaque $\rho=1.077$ mezclando la muestra con un volumen de amortiguador salino de fosfatos pH 7.3 (PBS) para pasarla con extremo cuidado en otro tubo conteniendo otro volumen de Ficoll, finalmente se centrifugó durante 30 minutos a 350 *g*. Pasado este tiempo con una pipeta pasteur se retiró la capa de células mono-nucleares y se llevó a cabo una cuenta viable por exclusión de azul de tripano.

Cuenta de células viables por exclusión de azul tripano en cámara de Neubauer.

Se diluyó la suspensión de células 1:1 tomando 10 μL de la muestra previamente homogenizada y añadiendo 10 μL de azul de tripano, se mezcló cuidadosamente y se colocó entre el portaobjetos y la cámara de Neubauer para que se llenara por capilaridad. Se contaron las células que no integraron al colorante en los cuatro cuadrantes externos y se realizó el siguiente cálculo para conocer el total de células:

$$\text{total de células} = \frac{\text{células contadas}}{4} \times \frac{9 \times 2}{0.9} \times 10,000 \times \text{vol}(\text{mL})$$

Donde *células contadas* es la suma de los cuatro cuadrantes y *vol* el volumen de la suspensión de células en mililitros.

Aislamiento de células CD34+ a partir de células mononucleares de médula ósea o sangre periférica movilizada

Se bloquearon los receptores Fc de las células mono-nucleares con 1mL de suero fetal bovino (SFB) durante 30 min a 4°C. Conocido el número de células se colocaron 15 μL de perlas magnéticas acopladas a anti-CD34 humano (Miltenyi Biotec) por cada millón de

células mononucleares. Las células que expresan CD34 estarán sujetas a un proceso de selección positiva por columna magnética. Una vez recuperadas las células de la columna se llevó a cabo una cuenta viable por exclusión de tripano.

Extracción de RNA

Con la finalidad de aislar el mRNA, las células CD34+ provenientes de los pacientes pediátricos con LA en trizol y almacenadas a -80°C se descongelaron a temperatura ambiente, se añadieron 200 μL de cloroformo y se homogenizaron durante 15 s posteriormente incubándose 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 22,500 g durante 15 min y a 4°C . La fase acuosa fue colocada en un tubo nuevo y se añadieron 500 μL de isopropanol incubándose 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 22,500 g durante 10 min a 4°C . Se decantó y se adicionaron 750 μL de etanol al 75% para homogenizar. Se centrifugó por 5 min a 8800 g a 4°C , se decantó y se eliminó el sobrenadante totalmente dejando secar el tubo. El material se resuspendió en 20 μL de H_2O DEPC, se incubó a 50°C - 65°C por 5 minutos, posteriormente se incubó a 4°C durante 5 min. Se cuantificó el RNA y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1%.

Consideraciones generales:

Se trabajó siempre en condiciones de asepsia, limpiándose la superficie de trabajo antes de comenzar con alcohol al 70%/RNase away y utilizando puntas estériles sin filtro. Con el objeto de evitar errores de colocación de reactivos, no se trabajaron más de 3 genes a la vez y se etiquetaron bien los tubos. Al terminar se limpió el lugar de trabajo nuevamente y se colocaron los desechos en los contenedores correspondientes.

Cuantificación del RNA

Se hizo una dilución 1:50 de cada muestra (49 μL de H_2O DEPC + 1 μL de RNA). En el espectrofotómetro se seleccionaron los parámetros de longitudes de onda para cuantificar RNA y se insertó una celda con 50 μL de H_2O DEPC como blanco,

posteriormente se colocaron una tras otra las diluciones de las muestras a determinar y se anotaron los resultados de cada una de las lecturas.

Gel de agarosa al 1%

Se preparó una solución de agarosa al 1% colocando 0,3 g en 30 mL de TBE 1x, se calentó la solución un poco para favorecer la disolución con ayuda de un microondas convencional. Finalmente se colocó en el molde correspondiente con el respectivo peine para definir los pozos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Buffer de carga para electroforesis de ácidos nucleicos

Se realizó una dilución 1:400 colocando 200 μ L de H₂O DEPC, 1 μ L de GelRed® Nucleic Acid Stain 10,000X y 200 μ L de TrackIt Cyan/Orange Buffer invitrogen®, la cual fue utilizada para colocar muestras en gel de agarosa.

Electroforesis para verificar la integridad del ácidos nucleicos

Se llenó la cámara de electroforesis con TBE 1x y se cargaron las muestras en los pozos del gel de agarosa al 1% colocando 1 μ L - 4 μ L de ácidos nucleicos y 4 μ L de buffer de carga.

Síntesis de cDNA

Una vez cuantificado el RNA de cada muestra, se realizó una normalización a 2500 ng a partir de la concentración obtenida del DNA. El volumen calculado se completó a 10 μ L con H₂O DEPC. A cada tubo de reacción se le agregó 1 μ L de random primers y 1 μ L de dNTP mix, evitando la formación de burbujas. Los tubos fueron incubados a 65°C durante 5 min y después 1 min a 4 °C. Por otra parte en un tubo nuevo, se mezclaron 4 μ L de buffer 5X, 2 μ L de DTT (0,1 M) y 1 μ L de RNAsa (40 U/L) por cada tubo. Se adicionaron 7 μ L de la mezcla anterior a cada uno de los tubos y se incubaron a 37 °C durante 2 min. Pasado este tiempo se colocó 1 μ L de la enzima M-MLV y colocaron los tubos en el termociclador según el siguiente programa de temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
25	10
37	50
40	15
4	∞

Una vez terminada la reacción, se almacenaron los tubos con cDNA en el congelador para su posterior uso en la RT-PCR.

Análisis por RT-PCR de la expresión génica de TLR 1-10

Por cada tubo de reacción se preparó la siguiente mezcla colocando 2,5 µL de buffer 10X, 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL dNTPs mix, 0,1 µL de los pares de oligonucleótidos comerciales para la amplificación de secuencias de los TLR1-10 humanos (InvivoGen®, San Diego, CA), 0.2 µL de DNA polimerasa ampli-Taq (TaKaRa, Japan) y 18,85 µL de H₂O DEPC. Al finalizar se tuvieron 23 µL por tubo a los que se les colocaron 2 µL de cDNA proveniente de la correspondiente conversión a partir del RNA mensajero aislado de cada una de las muestras. El termociclador fue utilizado con el siguiente programa de temperaturas:

Temperatura (°C)	Tiempo
95	2 min
95	30 seg
55	30 seg
72	2 min
72	5 min
4	∞

} 60 ciclos

Análisis semi-cuantitativo de la expresión génica de TLR por densitometría

Se determinó el valor de la expresión de cada uno de los TLR con ayuda del *software AlphaEase® FluorChem Imagin System*. Este analizador de imágenes nos permitió evaluar la intensidad de cada banda generada por electroforesis en geles de agarosa al 1% por densitometría, por escaneo individual de cada banda y cuantificación de acuerdo al número de píxeles detectados. El programa sugiere que para mejores resultados se utilicen imágenes invertidas en blanco y negro, y el *software* calcula el área bajo la curva de los picos de detección por cada carril analizado, representando la intensidad de la banda. Estos datos se utilizaron para calcular la intensidad relativa de cada TLR obtenido por cada paciente con respecto al sujeto control.

Purificación de poblaciones de progenitores por citometría de flujo a partir de células mononucleares

Se realizó una tinción con los siguientes anticuerpos monoclonales acoplados a distintas moléculas fluorescentes para permitir la separación de las células por citometría de flujo: se utilizó anti-CD34-PE-Cy7, anti-CD38-FITC, antiCD45RA-Texas Red y anti-marcadores de linaje (CD19, CD20, CD56, CD3, CD8, TCR, CD33, CD13, CD14, CD11b, CD11c y glicoforina A) conjugados a PE. El cocktail de anticuerpos se incorporó en una dilución 1:50 con PBS al 3% de suero fetal bovino. Las células se incubaron con SFB a 4°C durante 30 min, pasado este tiempo el contenido de cada tubo se transfirió a un tubo de citometría de 5 mL filtrando con una malla de 100 µm para eliminar grumos, se centrifugaron los tubos por 5 min a 350 g y se decantó el sobrenadante. Se colocaron los 50 µL del cocktail de anticuerpos por cada reacción y se incubó a 4°C durante 30 min cuidando el contacto con la luz. Posteriormente se añadió 1 mL de PBS al 3% de SFB para retirar el exceso de anticuerpo centrifugando durante 5 min a 350 g, se decantó el sobrenadante y se colocaron 100 µL de PBS al 3% de SFB en cada tubo para poder realizar la respectiva separación en el equipo de citometría de flujo FACSaria (Becton Dickinson) de las cuatro poblaciones de progenitores a probar de acuerdo a su fenotipo: células troncales hematopoyéticas (HSC) Lin-CD34+CD38-CD45RA-, progenitores multilinfoides (MLP) Lin-

CD34+CD38+CD45RA-, progenitores linfoides (LP) CD34+CD38+CD45RA+ y progenitores multipotentes (MPP) CD34+CD38+CD45RA-.

Estimulación con ligandos de TLR

Con el objeto de representar la interacción de células progenitoras con una variedad de componentes microbianos que son reconocidos por TLR, en nuestro modelo serán utilizados ligandos de TLR sintéticos ultrapuros libres de endotoxinas para la estimulación de dichas células, a saber: Pam3CSK4 (ligando de TLR1/2), HKLM (ligando de TLR2), Poly(I:C) (ligando de TLR3), LPS de *E. coli*, K12 (ligando de TLR4), Flagelina de *S. typhimurium* (ligando de TLR5), Imiquimod (ligando de TLR7/8), ssRNA40 (ligando de TLR7/8), ODN 2216, ODN 2006 y ODN M362 (oligodeoxinucleótidos CpG tipos A, B y C, respectivamente, ligandos de TLR9). Las secuencias ODN carentes de motivos CpG serán utilizadas como control. La estimulación de TLR6 y TLR10 no fueron consideradas en este trabajo debido a que no existe disponible en el mercado el ligando sintético de TLR6 homodimérico, y porque aún no se ha descubierto el ligando de TLR10, respectivamente. Las poblaciones purificadas de progenitores serán expuestas a los ligandos según su perfil de expresión durante 48 h, en medio completo pero en ausencia de factores de crecimiento, citocinas y estroma.

Co-cultivo de progenitores hematopoyéticos con estroma murino

En placas de 96 pozos se sembraron 2000 células MS-5 por cada pozo destinado al cultivo para tener una confluencia del 70-80% suficiente para dar soporte a las células hematopoyéticas y se llevaron a un volumen de 200 μ L con medio α -MEM al 10% de SFB, se dejaron incubar a 37 $^{\circ}$ C por 48 horas. Al término de la estimulación con ligandos agonistas de TLR, las células hematopoyéticas fueron sembradas en estas monocapas de células estromales de médula ósea (línea MS-5) en condiciones definidas para la diferenciación de linaje linfoide: *Stem Cell Factor* (SCF) 2 ng/mL, *Fms-like tyrosine kinase 3* (Flt3) 1 ng/mL, Interleucina 7 (IL7) 5 ng/mL e interleucina 15 (IL15) 10 ng/mL.

Los cultivos fueron mantenidos durante 3-6 semanas y para evaluar la respuesta de los precursores hematopoyéticos a la estimulación de sus TLR, se evaluó por citometría de flujo multiparamétrica la generación de células B, NK, monocitos, células dendríticas convencionales linfoides y células plasmacitoides dendríticas.

Cosecha celular

Una vez cumplido el tiempo de co-cultivo las células fueron recuperadas de los pozos de cultivo. Los 200 μ L del sobrenadante de cada pozo se colocaron en un tubo vial, se añadió PBS-E.D.T.A. y se incubó a 37°C durante 10 minutos, posteriormente se hizo un lavado extensivo para tratar de despegar todas las células adheridas. Una vez transferido todo el contenido, las células se lavaron dos veces con PBS y centrifugaron durante 5 minutos a 350 *g*. Se decantó el sobrenadante y se dejaron en 100 μ L de PBS para su conteo.

Tinción para análisis de células linfoides

Conocido el número de células, a cada tubo se añadió suero fetal bovino para bloquear los receptores Fc, incubando a 4°C por 30 min. Por otro lado, se preparó un cocktail en PBS al 3% con los siguientes anticuerpos monoclonales acoplados a moléculas fluorescentes para análisis por citometría de flujo multiparamétrica: anti-CD19-FITC (1:50) como marcador de células B, anti-CD-56-PE (1:50) como marcador de células NK, anti-CD11c-APC (1:50) como marcador de células dendríticas convencionales y anti-CD123-PECy5 (1:70) como marcador de células dendríticas plasmacitoides. Pasado el tiempo de incubación con SFB el contenido se pasó a un tubo para citometría filtrando con una malla de 100 μ m, se centrifugaron los tubos por 5 min a 350 *g* y se decantó el sobrenadante. Se colocaron los 50 μ L del cocktail de anticuerpos en cada tubo y se incubaron a 4°C durante 30 min cuidando el contacto con la luz. Posteriormente se añadió 1 mL de PBS al 3% de SFB para retirar el exceso de anticuerpo, centrifugando durante 5 min a 350 *g*, se decantó el sobrenadante y se colocaron 100 μ L de PBS al 3% de SFB en cada tubo para poder realizar su respectiva adquisición en el equipo de citometría de flujo.

Análisis por citometría de flujo multiparamétrico

El análisis de los resultados arrojados por el citómetro de flujo se realizó en el programa *FlowJo*®. Por cada condición de cultivo se realizó el siguiente análisis: Se generó un gráfico de puntos (*dot plot*) que nos permitió analizar tamaño relativo (FSC) y complejidad relativa (SSC), se seleccionó la región de células aislándola de todas las células muertas según estos dos parámetros. Partiendo de esta región se creó un nuevo gráfico con los parámetros de área (FSC-A) y altura (FSC-H) para seleccionar únicamente los eventos sencillos (*singletes*) para tener un análisis más preciso. De esta región se generó otro gráfico para analizar la expresión de CD19 y CD56. La molécula CD19 se expresa en células B y el marcador CD56 en las células NK. De la región de células negativas para ambos marcadores se derivó otro gráfico para evaluar la producción de células dendríticas, analizando CD11c y CD123, moléculas de superficie expresadas en células dendríticas convencionales y células dendríticas plasmacitoides, respectivamente. El *software* genera automáticamente una tabla dónde se muestran los porcentajes y los números de células por cada población analizada. Con estos datos y el número de progenitores sembrados, los resultados de la influencia de la señalización por TLR en el potencial de diferenciación son reportados como el rendimiento (# de células o colonias producidas de cada categoría) por cada unidad de progenitor inicial (input) con y sin previa estimulación.

Anexo 3. Carta de consentimiento informado

Hospital Infantil de México Federico Gómez



México DF a _____ de _____ del año 2011

Protocolo: HIM/2009/33, titulado “Reprogramación de progenitores linfoides tempranos por estimulación de receptores tipo Toll en leucemia linfoblástica aguda infantil”

Estimado padre/madre de familia:

Por medio de la presente lo invitamos a participar en un protocolo de investigación que consiste en lo siguiente:

En el Departamento de Oncología estamos tratando de encontrar sustancias que nos permitan hacer que las células de los pacientes con leucemia cambien sus características que las hacen cancerosas y se diferencien o cambien hacia otras células con características diferentes, incluso que no sean malignas.

Por medio de esta carta se le invita atentamente a participar de manera voluntaria en este estudio, permitiendo tomemos algunas células de la muestra de aspirado de médula ósea que le realizaron el día de hoy a su hijo/a para poder establecer si su hijo/a presentaba o no leucemia.

La médula ósea es la sangre que se encuentra dentro de los huesos y la cantidad a tomar es de 3ml, lo cual no es riesgoso para la salud de su hijo/a y no afecta el proceso del diagnóstico.

Aunque ni usted ni hijo/a su serían directamente beneficiados por este proyecto de investigación, al participar, estarían ayudando a que en un futuro se conozcan cuales son las sustancias que hacen diferentes a las células cancerosas de las normales y con ello podremos desarrollar tratamientos para niños enfermos con leucemia infantil.

Las muestras de la médula de su hijo/a se congelarán y no podrá ser conocido el nombre o identidad de los pacientes por otras personas.

Por favor siéntase en confianza de ponerse en contacto cuantas veces lo necesite con la Investigadora principal, la Doctora Elisa Dorantes Acosta, al teléfono 52289917, a la extensión 1238, para conocer mas detalles de la investigación o aclarar dudas al respecto.

Su firma significa que usted ha entendido el objetivo del estudio y está dispuesto a aceptar que su hijo/a participe en el estudio de manera voluntaria, sin embargo, si posteriormente usted o su hijo/a reconsideren y decidan que no quieren participar a pesar de haber firmado, tenga la seguridad que esto no afectará la atención que el niño/a merece y podrán retirarse del estudio en cuanto lo decidan.

Nombre y firma del responsable legal del menor

Nombre y registro del paciente

Nombre y firma del testigo 1

Dra Rosana Pelayo Camacho.
Investigadora de la unidad de
investigación médica en enfermedades
oncológicas CMNS XXI

Tel 56276900 ext 22704

Nombre y firma del responsable de la investigación

Dra Elisa Dorantes Acosta. Oncóloga
Pediatra del Hospital Infantil de México
Federico Gómez. Tel 52289917 ext 1238 y
1128

Nombre y firma del testigo 2

Dra Aurora Medina Sanson

Jefe del Departamento de Oncología del
Hospital Infantil de México Federico
Gómez Tel Tel 52289917 ext 1239