



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO**

Posgrado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la salud.



Maestría en Investigación Clínica Experimental
en Salud.

Bioquímica Clínica "Facultad de Química"

**EL MICROAMBIENTE PRO-INFLAMATORIO DE
LA MÉDULA ÓSEA COMO FACTOR REGULADOR
DE LA HEMATOPOYESIS CENTRAL EN LA
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
INFANTIL.**

Tesis

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias:

QFB. Armando Vilchis Ordóñez.

Directora de Tesis:

Dra. Rosana Pelayo Camacho.



Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Oncológicas CMNSXXI, IMSS

México, D.F. Febrero del 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Linfopoyesis de la Unidad Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Departamento del Laboratorio Clínico del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la tutoría de la Dra. Rosana Pelayo.

Contó con la asesoría de:

Dra. Briceida López Martínez

Dra. Elisa Dorantes Acosta

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

CINVESTAV

Este trabajo estuvo financiado por fondos federales del Hospital Infantil de México Federico Gómez con el proyecto HIM/2013/018 y por la Comisión Nacional de investigación Científica del IMSS (R-2014-785-041).

Agradecimientos:

A mi futura esposa Tania Ángeles por su apoyo incondicional tanto en lo académico, profesional y personal, “te amo”.

A mi familia, en especial a mi mamá Irais por las bases morales inculcadas que guiaron mi camino profesional.

A la Dra. Rosana por brindar todo su conocimiento para mi formación académica, su apoyo para la realización de este proyecto personal y sobre todo ser ejemplo de perseverancia para alcanzar todos los objetivos.

A mis amigos la Dra. Briceida, el Q. Israel y Lety Barrera que siempre me apoyaron profesional y personalmente, me enseñaron el valor del trabajo y responsabilidad de nuestro hacer diario.

A mis compañeros del Laboratorio de Linfopoyesis, hicieron este recorrido muy agradable y en especial a los que me apoyaron técnicamente en la realización de este trabajo.

Y de forma muy especial a todos los niños y personas del Hospital que hicieron posible todo.

ABREVIATURAS:

LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
HSC	Hematopoietic stem cell
MPP	Multipotent progenitor
MO	Médula ósea
NF-kB	Nuclear factor kappa B
STAT3	Signal transducer and activator of transcription
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
Ph+	Cromosoma Filadelfia Positivo
FAB	Grupo franco-americano-británico
CMN's	Células mononucleares
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
SN no Inf	Sobrenadante no inflamatorio
SN Inf	Sobrenadante inflamatorio
SCU	Sangre de cordón umbilical
TLR's	Toll like receptors
DAMP	Damage-associated molecular pattern molecules
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
MSC	Mesenchymal stem cell

ABSTRACT

B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is a serious public health problem in the pediatric population worldwide, contributing to 85% of deaths from childhood cancers. Understanding the biology of the disease is crucial for its clinical management and the development of therapeutic strategies. In line with that observed in other malignancies, chronic inflammation may contribute to a tumor microenvironment resulting in the damage of normal processes, concomitant to development and maintenance of neoplastic cells. We report here that hematopoietic cells from bone marrow B-ALL have the ability to produce pro-inflammatory and growth factors, including $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-12 and GM-CSF , that stimulate proliferation and differentiation of normal stem and progenitor cells. Our findings suggest an apparently distinct $\text{CD13}^+\text{CD33}^+$ population of leukemic cells contributing to a pro-inflammatory microenvironment that may be detrimental to long-term normal hematopoiesis within B-ALL bone marrow.

ÍNDICE:

Resumen	1
Marco teórico	2
• La leucemia linfoblástica aguda como problema de salud pública	2
• Biología de la leucemia linfoblástica aguda	2
• Sistema hematopoyético	5
• Inflamación y cáncer	10
Planteamiento del problema	12
Justificación	13
Preguntas de investigación	13
Hipótesis	14
Objetivos	14
Materiales y Métodos	15
• Recolección de muestras y características de los pacientes	15
• Inmunofenotipo	15
• Aislamiento celular y recolección de sobrenadantes	16
• Detección de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento.	16
• Microscopía confocal	17
• Purificación de progenitores hematopoyéticos	17
• Ensayo de proliferación por CFSE	18
• Cocultivos estromales	18
• Análisis de proliferación y diferenciación por citometría de flujo	19
• Análisis estadístico	19
Consideraciones éticas	20
Consideraciones de bioseguridad	21
Resultados	22
• Identificación de dos grupos de pacientes de LLA-B de acuerdo a la producción celular de citocinas en la MO	22
• El estado de activación de NF-kB y STAT3 coincide con un microambiente pro-inflamatorio en la médula ósea de con LLA-B	27
• El perfil inflamatorio en la LLA-B está relacionado con la co-expresión aberrante de marcadores mieloides	27
• Los progenitores tempranos son promovidos a ciclo celular en presencia de factores inflamatorios en la LLA-B	34
• Cambios en la diferenciación hematopoyética normal como resultado de la interacción de células primitivas con factores pro-inflamatorios	36
Análisis de resultados	38
Conclusiones	41
Bibliografía	43

FIGURAS:

FIGURA 1. Modelo propuesto por Greaves en la leucemogénesis.	4
FIGURA 2 Organización jerárquica del modelo actual de la hematopoyesis.	7
FIGURA 3 Microambiente hematopoyético en la normalidad y en la LLA-B	9
FIGURA 4 Producción de citocinas y quimiocinas por las células de la médula ósea de pacientes con LLA-B	24
FIGURA 5 Producción de citocinas pro-inflamatorias por un grupo de pacientes con LLA-B.	26
FIGURA 6 Activación de NF-kB y STAT3 en las células de la médula ósea de pacientes con LLA-B.	28
FIGURA 7 Ensayo de proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas en presencia de factores pro-inflamatorios.	35
FIGURA 8 Co-cultivo de progenitores hematopoyéticos en presencia de factores pro-inflamatorios	37
FIGURA 9 Mecanismo propuesto para el desarrollo hematopoyético normal en presencia de factores pro-inflamatorios.	49

TABLAS:

TABLA 1 Características clínicas de los pacientes.	29
TABLA 2 Expresión concomitante de marcadores linfoides en las células de la médula ósea de pacientes con LLA-B	33
TABLA 3 Expresión concomitante de marcadores linfoides en las células de la médula ósea de pacientes con LLA-B	33

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) es un problema de salud pública en la población pediátrica alrededor del mundo, que contribuye al 85% de las muertes en los cánceres infantiles. El entendimiento de la biología de la enfermedad es de gran importancia para el manejo clínico y el desarrollo de estrategias terapéuticas. En vista de lo observado en otras neoplasias, la inflamación crónica puede contribuir a la formación de un microambiente tumoral como resultado del daño de procesos naturales, concomitantemente al desarrollo y mantenimiento de células malignas. En este trabajo demostramos que las células hematopoyéticas de la médula ósea en la LLA-B, tienen la capacidad de producir factores pro-inflamatorios y de crecimiento, incluyendo $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-12$ y $GM-CSF$, los cuales estimulan la proliferación así como la diferenciación de células troncales y progenitoras hematopoyéticas normales. Nuestros hallazgos sugieren que una población de células leucémicas con expresión aberrante de $CD13$ y $CD33$ contribuye a la generación de un microambiente pro-inflamatorio que puede dañar la hematopoyesis normal de largo plazo.

MARCO TEÓRICO

La Leucemia Linfoblástica Aguda como problema de salud pública:

En la actualidad las leucemias agudas son la causa más común de cáncer en la población infantil alrededor del mundo. Están caracterizadas por una producción incontrolada y acumulación de células precursoras hematopoyéticas de la serie linfoide o mieloide en la médula ósea (MO), con resultados de inexorable daño a su diferenciación y funcionalidad.

Su competencia con las células hematopoyéticas normales por los nichos medulares y su relativa resistencia a la apoptosis, resultan en el casi total reemplazo de la MO por células malignas y su diseminación a sitios extramedulares [Khalid et al. 2010].

El subtipo de mayor frecuencia es la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la cual constituye el 85% de todos los casos presentados, mientras que la leucemia de estirpe mieloide contribuye con el 15% de ellos [Onciu et al 2009]. En nuestro país, la LLA representa la segunda causa de muerte en la población de 5 a 14 años, solo antecedida por los accidentes [Pérez Saldivar et al 2011]. El Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) reporta anualmente alrededor de 100 casos nuevos de LLA, los cuales constituyen el 34.4% de los casos de cáncer tratados [Medina et al. 2002]. En concordancia, la incidencia anual promedio registrada por otros hospitales de la Ciudad de México es alta, y observaciones recientes han sugerido que un mayor porcentaje de estas leucemias son de alto riesgo en comparación con el resto del mundo. Si ello correlaciona con el índice de mortalidad en la fase de inducción a la remisión o con el posible incremento en la prevalencia de rearrreglos genéticos de mal pronóstico, es una pregunta que prevalece y está siendo explorada por diversos grupos de investigación biomédica [Niel Cravioto et al. 2009] [Pérez Vera et

al. 2008]. Entre los factores de riesgo para esta patología se encuentran la exposición in-útero a radiaciones ionizantes, pesticidas y solventes, los síndromes de Down y de Bloom, la neurofibromatosis tipo I y la ataxia-telangiectasia. El tratamiento incluye quimioterapia intensiva a corto plazo seguida de una fase de consolidación y mantenimiento con poliquimioterapia [Díaz Trejo et al. 2009].

A pesar de la alta eficiencia de los agentes anti-neoplásicos de uso actual, escenarios tales como la resistencia a fármacos, la enfermedad mínima residual y el establecimiento de infecciones e inflamación, a menudo ponen en riesgo el éxito del tratamiento. Los mecanismos moleculares involucrados en estos fenómenos no han sido totalmente definidos, en parte porque se desconoce el origen preciso de la enfermedad y la vulnerabilidad de los precursores leucémicos a factores microambientales, así como la contribución del microambiente leucémico a la protección o mantenimiento de dichos precursores cancerosos.

Biología de la Leucemia Linfoblástica Aguda:

Aunque la última década ha registrado un progreso importante en el conocimiento de las anomalías genéticas, moleculares, cariotípicas y fenotípicas que prevalecen en la LLA infantil, la comprensión de los mecanismos de daño a los programas de desarrollo linfoide es aún deficiente [Frohling et al. 2005]. Aparentemente el arresto en las vías de diferenciación, proliferación celular incrementada, apoptosis disminuida y altos niveles de auto-renovación son alteraciones que resultan en la producción constante de clones de blastos leucémicos [Warner et al. 2004]. La expresión de antígenos de superficie, citoplasmáticos y nucleares en las células leucémicas ha permitido su clasificación en función del linaje y la fase de maduración celular. El linaje B representa 80 a 85% de las LLA en niños, mientras que las LLA de células T constituyen el 15% restante. Ambas malignidades a menudo se asocian a

alteraciones en la función de factores de transcripción linfóide (principalmente Ikaros, E2A, EBF1 y PAX5), así como a un número de lesiones genéticas, en su mayoría traslocaciones cromosomales [Purizaca et al. 2012]. Usualmente las traslocaciones resultan en proteínas de fusión con funciones anormales y potentes propiedades oncogénicas. La fusión génica ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) que resulta de la traslocación t(12;21)(p12;q21) es la aberración genética más común en LLA infantil, Sin embargo, esta traslocación confiere buen pronóstico ya que se asocia a celularidad de pre B y a cuentas leucocitarias por debajo de 50, 000 leucocitos/ μ L. Por otro lado, el gen MLL participa en más de 50 fusiones génicas; entre ellas, la fusión MLL-AF9 está asociada con leucemia mieloide aguda, mientras que la fusión MLL-AF4 (t(4;11)(q21;q23)) ha sido documentada hasta en el 80% de las LLA neonatales y alrededor del 2% de LLA de niños mayores de 1 año, y la fusión BCR/ABL1 (t(9;22)(q34;q11)) en el 5% de las LLA pediátricas. A pesar de que dichas aberraciones potencialmente contribuyen a la leucemogénesis, el origen celular de la LLA es un tema fundamental en investigación. Los cultivos celulares y los modelos humano-ratón de xenotransplante y reconstitución leucémica sugieren que las células iniciadoras de la leucemia tienen características de células troncales o progenitoras primitivas capaces de recapitular el fenotipo leucémico en animales inmunodeficientes [Cox et al. 2009], y que éstas están sujetas a estímulos extrínsecos que potencialmente disparan la inestabilidad de linaje [Dorantes et al. 2012]. Estudios recientes han mostrado propiedades troncales también en las poblaciones de blastos leucémicos, así como una insospechada diversidad genética intratumoral, dando soporte a la evolución multiclonal de la leucemogénesis [Heidenreich et al. 2009] [Dick et al. 2007]. De acuerdo a la hipótesis original de la leucemogénesis de Greaves, la ocurrencia de múltiples lesiones consecutivas en las células hematopoyéticas puede detonar la transformación maligna, abriendo la posibilidad de que no solo los daños oncogénicos intrínsecos en etapas tempranas del desarrollo, sino factores microambientales anómalos pudieran contribuir a la generación y/o mantenimiento de precursores leucémicos emergentes [Greaves et al. 2006]. (Figura 1)

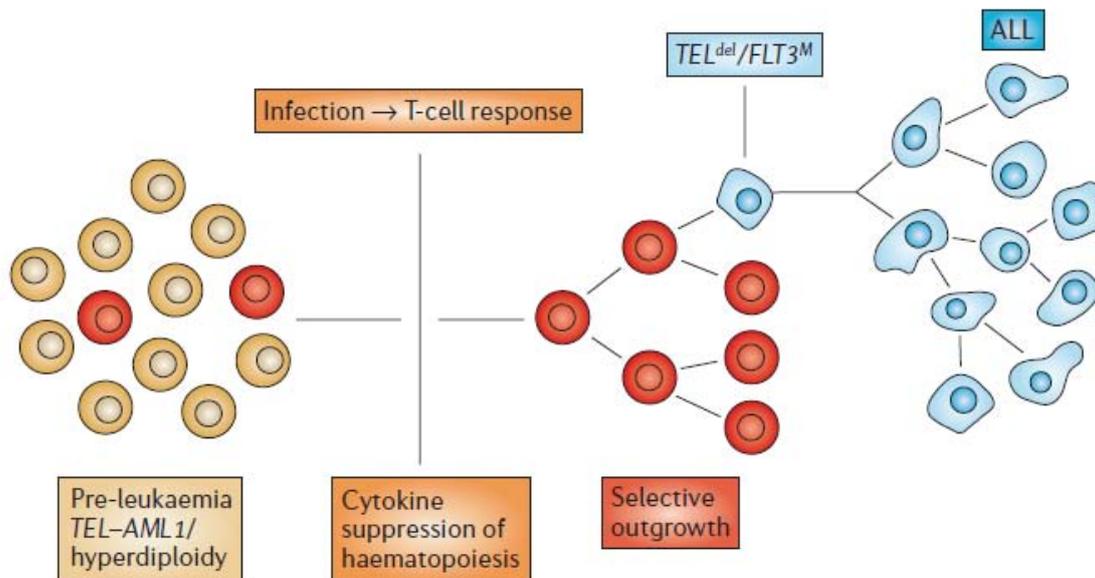


Figura 1

Figura 1. Modelo propuesto por Greaves, en el cuál el estrés derivado de una infección produce estados de proliferación y selección de células pre-leucémicas (Rojas). Una respuesta exacerbada de células T da una respuesta inflamatoria potente con liberación de citocinas y quimiocinas, que transitoriamente suprimiera la hematopoyesis e indujera a apoptosis. Una clona pre-leucémica podría tener una supervivencia distinta o ventajas sobre las normales. La expansión podría generar mutaciones secundarias a causa de un contexto inflamatorio o estrés oxidativo, y facilitar la aparición de células leucémicas (Azules). Donde TEL-AML1 es la aberración genética más frecuente en la LLA. Referencia tomada de [Greaves 2006]

Sistema Hematopoyético.

La hematopoyesis es el mecanismo por medio del cual se forman todas las células sanguíneas maduras que se encuentran en circulación. Este proceso se lleva a cabo en la médula ósea, e inicia a partir de una célula troncal hematopoyética (HSC, por sus siglas en inglés), la cual se caracteriza por poseer potencial de autorrenovación y de diferenciación [Friedman et al.2007]. La HSC da origen al progenitor multipotente (MPP), el cual pierde la capacidad de autorrenovación y adquiere potencial de proliferación. El progenitor multipotente tiene la capacidad de producir células tanto de linaje mieloide (eritrocitos, megacariocitos, granulocitos, monocitos, células dendríticas), como linfoide (linfocitos B, linfocitos T, células NK y células dendríticas) y para ello necesita establecer su compromiso de linaje, lo que se logra a través del encendido y apagado de genes que intrínsecamente controlan este proceso de diferenciación, en el contexto de citocinas y factores de crecimiento y de transcripción presentes en el microambiente [Seita et al. 2002] [Baker 2007]. La decisión de compromiso de linaje por lo tanto, es jerarquizada y se presenta más que como una serie de opciones binarias excluyentes e independientes, como una secuencia gradual y estrictamente regulada de eventos de diferenciación y proliferación que dependen de factores genéticos, epigenéticos y microambientales [Mayani et al. 2007] (Fig.2).

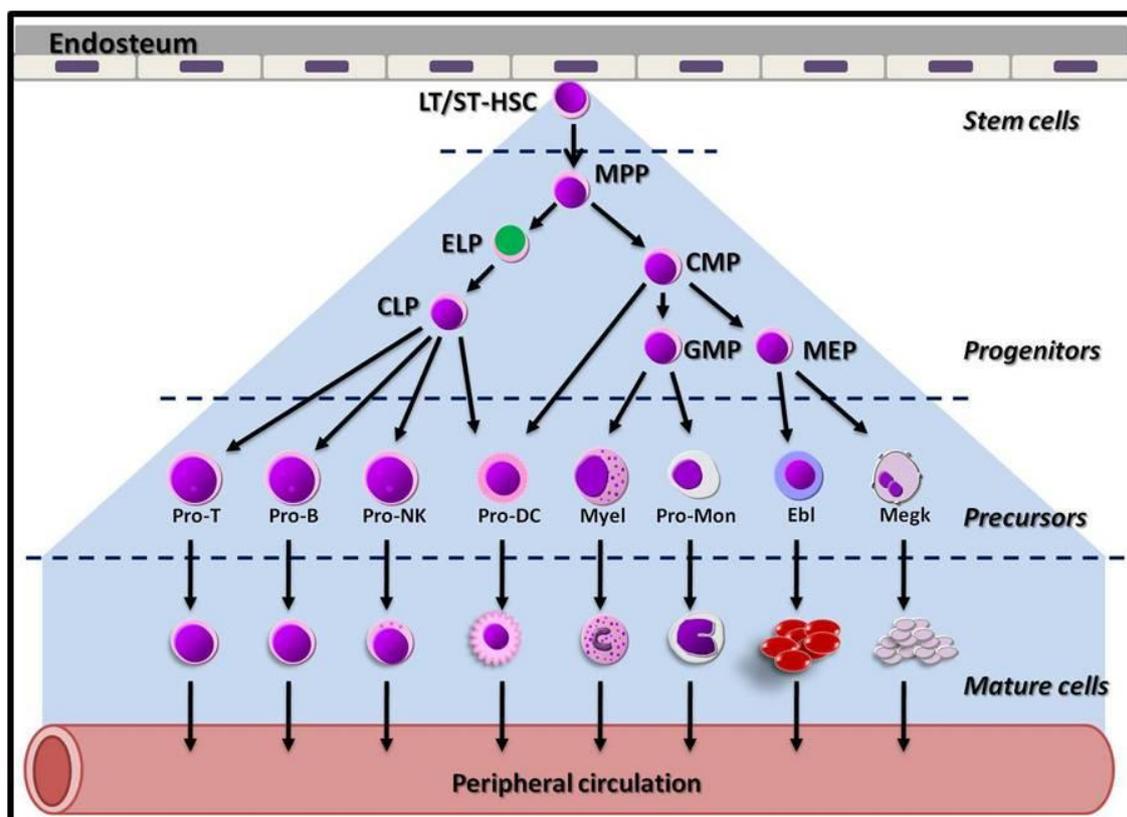


Figura 2. En el ratón, las células troncales hematopoyéticas (LT / ST-HSC) se pueden localizar cerca del endosteo en un estado de reposo. Después de varias rondas de mitosis algunas células se diferencian para dar lugar a los progenitores multipotentes (MPP) que tienen la capacidad de producir progenitores linfoides tempranos (ELP) e iniciar el programa linfóide. Las células maduras T, B y NK se originan a partir de los progenitores linfoides comunes linaje-comprometido (CLP). La vía mieloide comienza con la diferenciación de progenitores mieloides comunes (CMP) en progenitores de granulocitos y macrófagos (GMP) o progenitores de megacariocitos-eritroides (MEP). Las células precursoras generan granulocitos, monocitos, eritrocitos y plaquetas. El linaje dendrítico puede derivar de programas linfoides o mieloides. Finalmente las células funcionales son exportadas a la sangre periférica. Referencia tomada de [Vadillo 2009]

El microambiente hematopoyético en la MO está constituido por una red celular (células mesenquimales, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, macrófagos, células endoteliales, etc.) y sus productos (moléculas de la matriz extracelular, citocinas y quimiocinas), que forman una estructura tridimensional altamente organizada para dar soporte a la hematopoyesis [Nagazawa et al. 2011]. En condiciones de normalidad, el desarrollo de los progenitores hematopoyéticos no es autónomo, sino dependiente de nichos especializados (osteoblástico, vascular y reticular) que los proveen de señales regulatorias esenciales para su proliferación y diferenciación. Además, factores solubles como CXCL12 (SDF-1), Flt3L, IL-7 y SCF han mostrado ser críticos en los estadios más tempranos del programa linfoide; así como el contacto de precursores de células B con células estromales vía VLA-4 y VCAM-1 [Tokoyoda et al. 2004]. El modelo más actual del microambiente linfopoyético incluye dos nichos celulares específicos de estadio, de acuerdo al cual los progenitores más tempranos de células B requieren la interacción con células que expresan CXCL12/SDF1, mientras que río abajo, los precursores comprometidos al linaje requieren IL-7 y se movilizan hacia un nicho de células estromales productoras de dicha citocina [Purizaca et al. 2012]. Subsecuentemente, las células pre-B independientes de IL-7 dejan este nicho y se diferencian en células B inmaduras, que completarán su maduración en periferia.

Indudables esfuerzos se han llevado a cabo para determinar el papel del microambiente en la patogénesis de la leucemia, sugiriéndose 3 posibles mecanismos: competencia de las células tumorales por nichos de células troncales normales lo que permitiría su mantenimiento y supervivencia, manipulación del microambiente que promovería la progresión neoplásica, y la pérdida de comunicación de las células progenitoras con el nicho hematopoyético [Raaijmakers et al. 2011]. El trabajo seminal de Sipkins y colaboradores ha mostrado que el microambiente tumoral derivado de las células leucémicas daña la biología de las células hematopoyéticas normales [Colmone et al. 2008]. Además, se han registrado algunas alteraciones genéticas en las células troncales mesenquimales de la MO de LLA, como la expresión anormal de CXCR4, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y la

presencia de algunas citocinas pro-inflamatorias [Menendez et al. 2009] [Juarez et al. 2009]. El aprendizaje de la biología de los nichos leucémicos será central para entender la patogénesis de la leucemia y para el desarrollo de nuevas terapias (Figura 3).

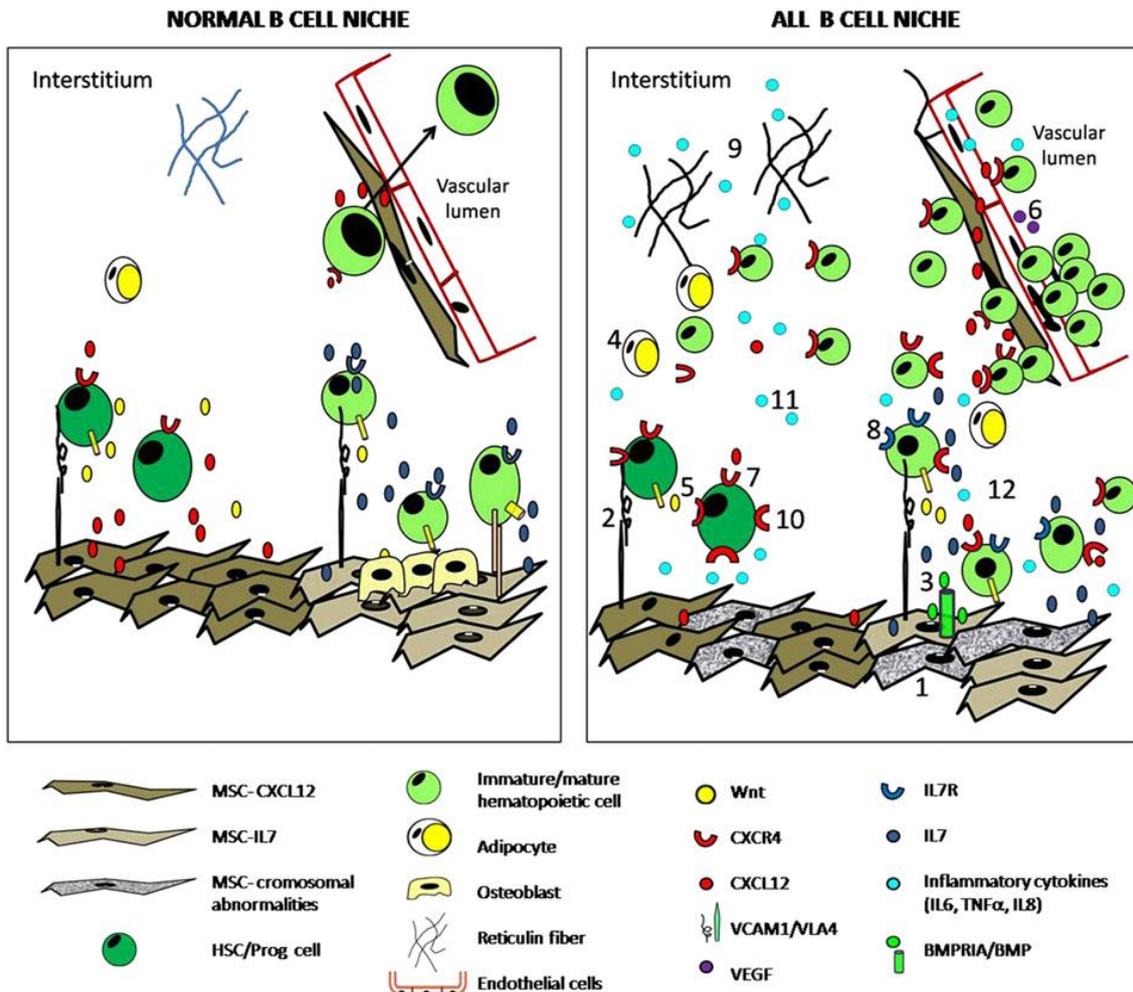


Figura 3. Microambiente hematopoyético en la normalidad y en la LLA de precursores de B. El desarrollo del linaje linfóide se apoya en dos nichos celulares dentro del intersticio. Un nicho que expresa CXCL12/SDF1 y uno que expresa IL-7. El precursor de células B se mueve de acuerdo al progreso de diferenciación. En la LLA, se sugiere que las alteraciones potenciales en el microambiente hematopoyético para dar origen a un microambiente pre-leucémico incluyen: 1. Alteraciones cromosómicas en las células trocates mesenquimales, 2. Sobre expresión de VLA-4, 3. Producción de TGF β como factor de protección, 4. Expresión del receptor de leptina, 5. Regulación epigenética de la vía de Wnt, 6. Alta expresión de VEGF, 7. Incremento de CXCR4, 11. Presencia de citocinas pro-inflamatorias, 12. Alta proliferación.

Inflamación y cáncer:

Las células inflamatorias y sus productos son importantes en la regulación del microambiente tumoral. El incremento de evidencia basada en modelos experimentales y epidemiológicos sugiere que existe una estrecha conexión entre la inflamación crónica y carcinogénesis, particularmente en cáncer colorectal, cáncer gástrico, de hígado y pulmón [Lippitz 2013] [Ben-Neriah 2011]. Por otra parte, se ha estimado que cerca del 25% de los tumores están asociados a procesos de inflamación crónica en respuesta a infecciones u otras etiologías [Balkwil 2012]. La inflamación y el cáncer se pueden asociar por dos vías: *la vía extrínseca*; la cual es causada por factores externos que promueven la respuesta inflamatoria y *la vía intrínseca*; promovida por oncogenes o genes supresores de tumores que activan la expresión de programas relacionados a inflamación [Mantovani 2008]. Para las dos vías, los componentes celulares y citoquímicos en el microambiente tumoral son cruciales. Los macrófagos son las células inflamatorias relacionadas a cáncer que más se han descrito [Andreu 2010] [Gabrilovich 2012], mientras que los fibroblastos asociados a tumor se ha demostrado que son buenos productores de citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento en neoplasias como cáncer de piel, mama y páncreas [Erez 2010]. La participación de las células en la iniciación de la respuesta inmune, el crecimiento y la progresión del tumor, así como la respuesta a la terapia anti-neoplásica, es aparentemente mediada por una variedad de citocinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-12 and IFN α y quimiocinas como CCL2 y CXCL12 [Naugler 2008] [Mantovani 2010], las cuales juegan un papel importante en la tumorogénesis y la inflamación asociada a tumores puede ser un blanco en las terapias convencionales. De especial interés es la participación de factores de transcripción como NF κ B y STAT3 participan en el desarrollo y progresión del cáncer, controlando la expresión de genes anti-apoptóticos y de proliferación, los que adicionalmente intervienen en la regulación de angiogénesis e invasión [Karin 2006]. Se ha demostrado que la vía de señalización TLR-MyD88 promueve la tumorogénesis en modelos primarios de carcinogénesis. De este modo tanto citocinas, quimiocinas y sus receptores son clave en el binomio cáncer-inflamación, en ocasiones

comprometiendo las funciones biológicas normales y promoviendo la senescencia celular, concomitante a la proliferación y supervivencia de células tumorales con propiedades invasivas y metastásicas [Kulbe 2007].

A pesar del incremento de evidencia acerca del daño en el microambiente de la médula ósea en las neoplasias hematológicas, las cuales gobiernan la actividad de las células troncales hematopoyéticas llevándolas a la enfermedad [Purizaca 2012] [Dorantes 2014], el conocimiento acerca del papel de la inflamación en la leucemogénesis es escaso. Hasta el momento, la LLA-B es el cáncer infantil más común en la infancia y se caracteriza por una producción incontrolada de precursores de células B en la médula ósea (MO), con daño inexorable a sus propiedades funcionales y de diferenciación. Aunque las aberraciones genética potencialmente contribuyen a la leucemogénesis, el origen celular de la LLA-B es un importante tema a investigar [Pelayo 2013] [Purizaca 2013]. Tanto los sistemas de cultivo como los modelos animales de xenotrasplante para la reconstitución leucémica de humano a ratón sugieren que las células iniciadoras de la leucemia poseen características de células troncales y progenitores hematopoyéticos [Cox 2009]. Por otra parte la competencia de los precursores leucémicos con las células normales por los nichos hematopoyéticos en la médula ósea y su aparente contribución a la formación de microambientes anormales inhibitorios sugiere que existe un agotamiento de los precursores hematopoyéticos normales debido a la migración de estos, dando como resultado el reemplazo de los nichos por células malignas [Colmone 2008]. Interesantemente, reportes previos han demostrado que las células primitivas en la LLA-B producen factores pro-inflamatorios en cultivo como $TNF\alpha$ y IL-6, sugiriendo que un microambiente pro-inflamatorio prevalece en esta enfermedad [Espinoza 2001] [Juarez 2009]. Por otro lado, los estudios de Guzman indican que en la leucemia mieloide aguda (LMA) las células troncales leucémicas tienen constitutivamente activado el factor de transcripción NF κ B [Guzman 2005] [Guzman 2001], hallazgo que puede explicar el daño en la biología normal de los nichos hematopoyéticos. Para determinar si los precursores leucémicos en la LLA-B contribuyen a un microambiente inflamatorio en la MO. Se ha investigado y confirmado la producción de factores solubles, incluyendo citocinas, quimiocinas y factores de

crecimiento por las células mononucleares (CMNs) provenientes de la LLA-B en MO. Utilizando ensayos de proliferación in vitro y sistemas controlados de Cocultivos, se evaluó el efecto de los factores solubles en el potencial de diferenciación de los progenitores hematopoyéticos normales, con resultados que sugieren que en la MO de LLA las células primitivas normales son promovidas a ciclos de proliferación e inducidas a producir células linfoides y de inmunidad innata.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La LLA es un problema serio de salud pública en la población pediátrica de nuestro país y en el mundo, contribuyendo al 85% de las muertes por neoplasias infantiles. La comprensión de los mecanismos que promueven el mantenimiento y progresión de la enfermedad es de crucial importancia para el manejo clínico de la enfermedad y el desarrollo de medidas terapéuticas. En línea con lo observado en otros tumores, la inflamación crónica pudiera jugar un papel importante en el establecimiento, desarrollo y curso de las leucemias infantiles, así como en su respuesta a los agentes anti-neoplásicos.

JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es la causa más común de cáncer en la población infantil mundial, por lo que hay grandes expectativas en torno a la investigación que permita comprender aspectos fundamentales de su patogenia desde los eventos más tempranos de la diferenciación neoplásica en la médula ósea. Estudios recientes han resaltado la importancia de la inflamación crónica en el desarrollo y mantenimiento de algunas neoplasias. Entender su posible relación con la patología y el pronóstico de las leucemias agudas infantiles, incluyendo la LLA, es crucial para el diseño de estrategias terapéuticas basadas en la manipulación del microambiente tumoral.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál es el perfil de producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias de los precursores hematopoyéticos que caracteriza al microambiente en la médula ósea leucémica infantil y su impacto en la diferenciación hematopoyética?

HIPOTESIS

Los precursores leucémicos de la médula ósea en la leucemia linfoblástica Infantil producen factores solubles y de crecimiento que modifican la biología normal de la hematopoyesis no leucémica, modificando sus patrones de diferenciación.

OBJETIVOS:

Objetivo General:

Investigar la posible contribución de un microambiente pro-inflamatorio a la inestabilidad hematopoyética de la leucemia linfoblástica infantil.

Objetivos Particulares:

Conocer el repertorio de citocinas y quimiocinas producidas por las células leucémicas en pacientes con LLA al diagnóstico y/o en recaída temprana.

Investigar el estado de las vías de señalización de NFkB y STAT3 en las células leucémicas de pacientes con LLA.

Determinar el efecto in vitro de los factores pro-inflamatorios y de crecimiento producidos por las células leucémicas en la diferenciación temprana células troncales y progenitores hematopoyéticos normales.

MATERIALES Y METODOS:

Recolección de muestras y características de los pacientes:

Cincuenta y cuatro niños referidos al Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) con diagnóstico de LLA de precursores de B fueron incluidos en este estudio. De ellos, 34 pacientes cumplieron los criterios para clasificarlos como de alto riesgo de acuerdo a variables clínicas universalmente aceptadas como son: leucocitos en sangre al diagnóstico, edad, fenotipo de precursores de células T o cromosoma filadelfia positivo (Ph +), mientras que 17 de estos pacientes fueron clasificados como riesgo estándar. Dentro del grupo de alto riesgo, 35% de los pacientes fueron de género femenino y 65% fueron masculino, dentro del grupo de riesgo estándar 24% son femeninos y 76% masculinos. La media de edad fue de 7.8 años (2m – 18a) y 4.8 (2a – 9a) para alto riesgo y riesgo estándar, respectivamente. Las muestras de MO fueron

obtenidas por aspirado antes de cualquier tratamiento, respetando las guías nacionales e internacionales. Las muestras de médula ósea normal fueron obtenidas de niños sin enfermedad hematológica que fueron sometidos a cirugías ortopédicas menores. Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de bioseguridad del HIMFG con el registro (HIM/018/2013) y por la Comisión Nacional de investigación Científica del IMSS (R-2014-785-041). Las muestras de sangre de cordón umbilical fueron obtenidas de neonatos nacidos. Todas las muestras fueron obtenidas bajo el consentimiento informado de los padres o tutores.

Inmunofenotipo:

Los pacientes que cumplieron con el criterio morfológico para LLA de acuerdo al grupo Franco-Americo-Británico (FAB), fueron estratificados de acuerdo al riesgo clínico de recaer y la expresión fenotípica de CD10, CD19, CD20, CD22, CD79 α , Kappa, Lambda, anti TdT, CD3, CD5, CD7, CD13, CD14, CD15, CD33, mieloperoxidasa, CD45 y CD34. Posteriormente se definió un grupo de pacientes con expresión aberrante de marcadores mieloides, considerando como positivo al menos el 25% de expresión del antígeno en el total de las células.

Aislamiento celular y recolección de sobrenadantes

Las CMNs de pacientes con LLA-B fueron separadas por gradiente de densidad con Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Bioscience) y cultivadas con medio Alpha MEM (Gibco by Life Technologies) (200,000 CMNs por cada 200 μ L de medio). Los sobrenadantes fueron recolectados a las 24 horas y se les midió la concentración de citocinas. Posteriormente se les agregó 200 μ L de medio adicional a las mismas células para re-evaluar 24 horas más tarde. (Tiempo total de experimento fue de 48 horas).

Detección de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento

Después de recolectar los sobrenadantes, estos fueron almacenados a -20°C hasta su análisis. La determinación de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento contenidos en los sobrenadantes fueron medidos por ensayos Milliplex Map Immunoassay (Merck Millipore), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ensayo incluye: SDF-1, BCA-1, LIF, TRAIL, SCF, TSLP, FGF-2, Flt-3L, G-CSF, GM-CSF, IFN α , IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-15, IP-10, TNF α y VEGF.

Microscopia confocal:

Las células mononucleares provenientes de pacientes con LLA y controles fueron fijadas con paraformaldehído al 4% hidratado con PBS. Se permeabilizaron las células con Triton X-100 al 0.01% (BioRad) y se bloqueó con albumina sérica bovina al 2% hidratada con PBS 1X por 30 minutos a 37°C . Los anticuerpos primarios se incubaron a 37°C por una hora; Anti-pNFkB p65 (serina 536) y anti-pSTAT3 (tirosina 705) (Cell Signaling). Posteriormente se incubó el anticuerpo secundario de cabra anti conejo acoplado a Alexa 488 (Invitrogen) por 30 minutos. Las laminillas fueron montadas con Vectashield y yoduro de propidio (PI). La superposición de imágenes de los diferentes canales fluorescentes se realizó utilizando el software ImageJ (NHI) y el software Image Pro Plus.

Purificación de progenitores hematopoyéticos

Las CMNs provenientes de sangre de cordón umbilical (SCU) fueron separadas por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bioscience). Se enriqueció la fracción CD34⁺ que contiene a las células troncales y progenitores hematopoyéticos de las CMNs utilizando columnas magnéticas (Miltenyi Biotec) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células fueron contadas antes de los ensayos y se confirmó la purificación con citometría de flujo.

Ensayo de proliferación por CFSE

Se utilizó CFSE (Carboxifluorescein diacetate succinimidyl ester) para marcaje *in vitro* de las células y rastreo de múltiples generaciones por dilución de colorante y detección por citometría de flujo (Molecular Probes). Las células CD34⁺ de SCU fueron incubadas con 10mM de CFSE y expuestas por 120 horas en cultivos con los sobrenadantes recolectados de MO normal (SN control), MO de pacientes no inflamatorios (SN no Inf) y MO de pacientes inflamatorios (MO Inf), después de 5 días, las células cosechadas fueron analizadas por citometría de flujo para determinación del fenotipo y número de divisiones celulares. La dilución de la fluorescencia para monitorear hasta 8 divisiones celulares se estimó mediante el uso del software FlowJo 7.6.1.

Cocultivos estromales:

Los precursores provenientes de SCU fueron cocultivados en una monocapa estromal (MS-5) por tres semanas en presencia de los sobrenadantes de pacientes con LLA en condiciones linfoides, de acuerdo a nuestro reporte previo, medio mínimo esencial alfa (α -MEM) fue enriquecido con suero fetal

bovino (SFB) al 10%, 1 ng/ml Flt3-L (FL), 2 ng/ml SCF, 5 ng/ml IL-7, y 10 ng/ml IL-15 (Preprotech), con 100U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina. Los sobrenadantes SN control, SN no Inf y SN inf se utilizaron con α -MEM 3:1, el sistema de cocultivo fue incubado a 37 °C con 5% de CO₂, el medio y los sobrenadantes fueron sustituidos cada semana. Este sistema controlado de cocultivo promueve eficientemente la diferenciación de células troncales, progenitores y precursores comprometidos a células B y NK, células dendríticas de origen linfoide y algunas células mieloides. Las frecuencias celulares y conteos absolutos fueron calculadas a partir de la producción específica a cada linaje en cada condición por progenitor.

Proliferación y diferenciación hematopoyética normal:

El fenotipo de las células de SCU fue determinado en un citómetro de flujo de seis colores FACSCanto® (BD Biosciences). Las células fueron contadas después de cosechadas para calcular la frecuencia y el rendimiento por cada progenitor antes de la tinción con los anticuerpos acoplados a algún fluorocromo (Invitrogen and BD Pharmingen). Para el ensayo con CFSE se utilizaron anticuerpos anti linaje acoplados a fluorocromo utilizando los siguientes marcadores (CD3, CD8, TCR, CD56, CD14, CD11b, CD20, CD19, CD235a) y anti CD34⁺ para identificar las poblaciones Lin⁻CD34⁺, Lin⁻CD34⁻ Lin⁺CD34⁻. Por otro lado al final de tiempo de cultivos, las células cosechadas fueron teñidas con los siguientes anticuerpos: anti-CD34, -CD56, -CD11c, -CD19, -CD11b y CD14, las células producidas de novo fueron identificadas por su fenotipo como sigue: células troncales y progenitores como CD34⁺, precursores de NK CD34⁺CD56⁺, células NK CD34⁻CD56⁺, células dendríticas CD11c⁺, células B como CD19⁺, mientras que para las células mieloides se identificaron dos poblaciones CD11b⁺CD14⁻ o CD11b⁺CD14⁺. El análisis de citometría fue realizado en el software FlowJo 7.6.1. y los valores absolutos fueron calculados en base a la frecuencia celular en cada condición.

Análisis Estadístico:

Se utilizó la prueba de comparación de medias t test no pareada con el software Prism (versión 5.01 GraphPad) y SPSS. Los valores de P fueron de dos colas, considerando como estadísticamente significativo menor o igual a 0.05. Adicionalmente para la expresión aberrante de marcadores mieloides, se realizó un análisis distribucional, encontrando una distribución no normal. Por lo que se realizó un análisis no paramétrico test U Mann-Whitney, comparando las medianas y tomando α de 5% estadísticamente significativo.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los pacientes que fueron incluidos en el presente estudio pertenecen al Hospital Infantil de México Federico Gómez. En el Laboratorio clínico del HIMFG se purificaron las células mononucleares, en tanto en el Laboratorio de Linfopoyesis de la UIMEO se llevaron a cabo los cultivos para la producción de citocinas y el resto de las estrategias experimentales.

La presente se considera una investigación con riesgo mínimo. Sin embargo, de los pacientes con LLA estrictamente se tomó una alícuota de la misma muestra necesaria para el diagnóstico. En ningún momento y bajo ninguna premisa fueron tomados aspirados de médula ósea con la finalidad única de incluirlos en el protocolo de investigación.

Sin excepción, todos los procedimientos realizados fueron autorizados bajo la carta de consentimiento informado o la carta de asentimiento.

El estudio en todas sus etapas se llevó a cabo en estricto apego a las normas y regulaciones establecidas universal e institucionalmente.

RESULTADOS:

Identificación de dos grupos de pacientes con LLA-B de acuerdo a la producción celular de citocinas en la médula ósea.

Citocinas y factores de crecimiento fueron cuantificados en los sobrenadantes de las CMNs de pacientes con LLA-B. De forma interesante las citocinas pro-inflamatorias IL-1 α , IL-1 β y TNF α están incrementadas comparados con su contraparte normal, de hasta cuarenta veces para la IL-1 β (Figura 1). También se produjeron interferones y factores de crecimiento que participan en la respuesta pro-inflamatoria como G-CSF, GM-CSF, IFN α e IL-12, con producción incrementada por las células de pacientes con LLA-B. Se encontró altas concentraciones de IL-7, el cual es un factor de crecimiento esencial relacionado al desarrollo linfocitario (Figura 4). Así por primera vez, se ha observado que los precursores hematopoyéticos en la leucemia linfoblástica aguda infantil producen factores solubles, incluyendo citocinas pro-inflamatorias, interferones y factores de crecimiento. Se observó un moderado incremento de IFN γ , IL-10 y VEGF, mientras que no se observaron cambios en Flt3L, IL-15, IL-5, IL-6, IL-8, SCF and SDF-1. Se comprobó significancia estadística en la producción de G-CSF, IFN α 2, IL-12p40, IL-1 α , IL-3, IL-7 y TNF α por t de Student. A pesar de la heterogeneidad en la producción de citocinas entre pacientes, los análisis de dispersión de datos nos indican la presencia de dos grupos definidos de acuerdo a la concentración de las citocinas producidas después de 24 horas de cultivo (Figura 2A). Sorprendentemente, un grupo minoritario se comporta de manera diferente de la mayoría de los pacientes y de los controles, produciendo la mayor cantidad de factores de crecimiento, interferones y citocinas pro-inflamatorias.

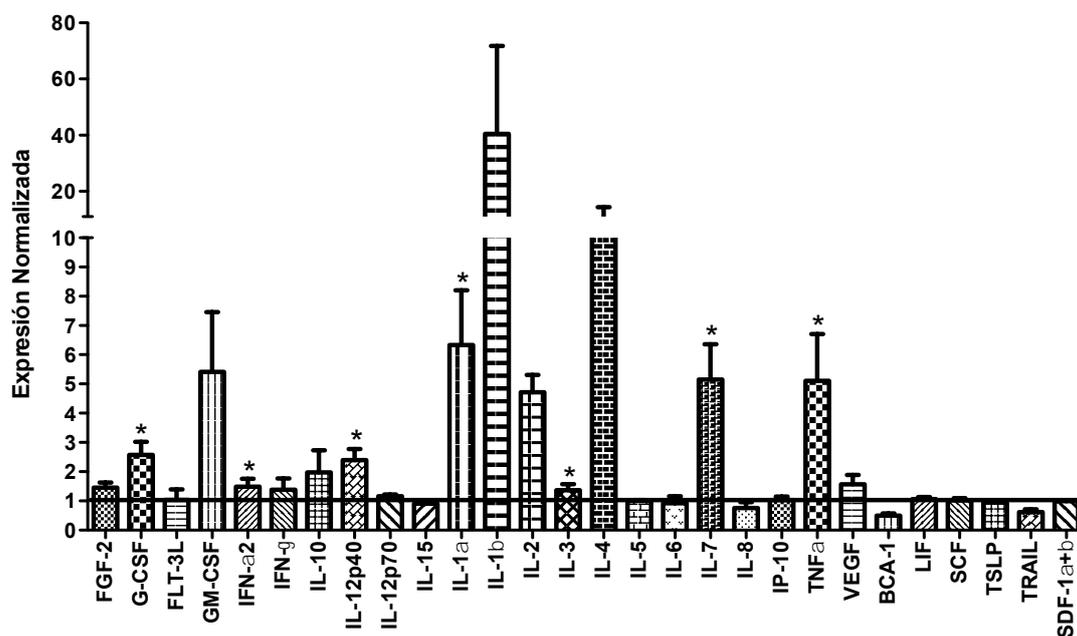


Figura 4. Las células de la médula ósea de niños con leucemia linfoblástica aguda producen citocinas y factores de crecimiento hematopoyéticos. Las CMNs de MO fueron cultivadas por 24 horas, se recolectaron los sobrenadantes para medir 28 citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Se presenta la expresión normalizada en base a su contraparte normal.

Los sobrenadantes que provienen de este minoritario grupo que contienen factores pro-inflamatorios se les denominó “sobrenadantes inflamatorios”, mientras que los sobrenadantes con cantidades moderadamente altas o normales se les denominó “sobrenadantes no inflamatorios”. Los sobrenadantes control provienen de las CMNs de MO de niños sin enfermedades hematológicas y sometidos a cirugía ortopédica.

Para explorar la posibilidad de una pre-activación celular local y transitoria, se continuó con los cultivos celulares por 24 horas adicionales después de la primera recolección de los sobrenadantes. Las gráficas de concentración en la Figura 5b sugieren una activación a largo plazo o intrínseca en la vías inflamatorias, independiente de la interacción con el estroma en la MO.

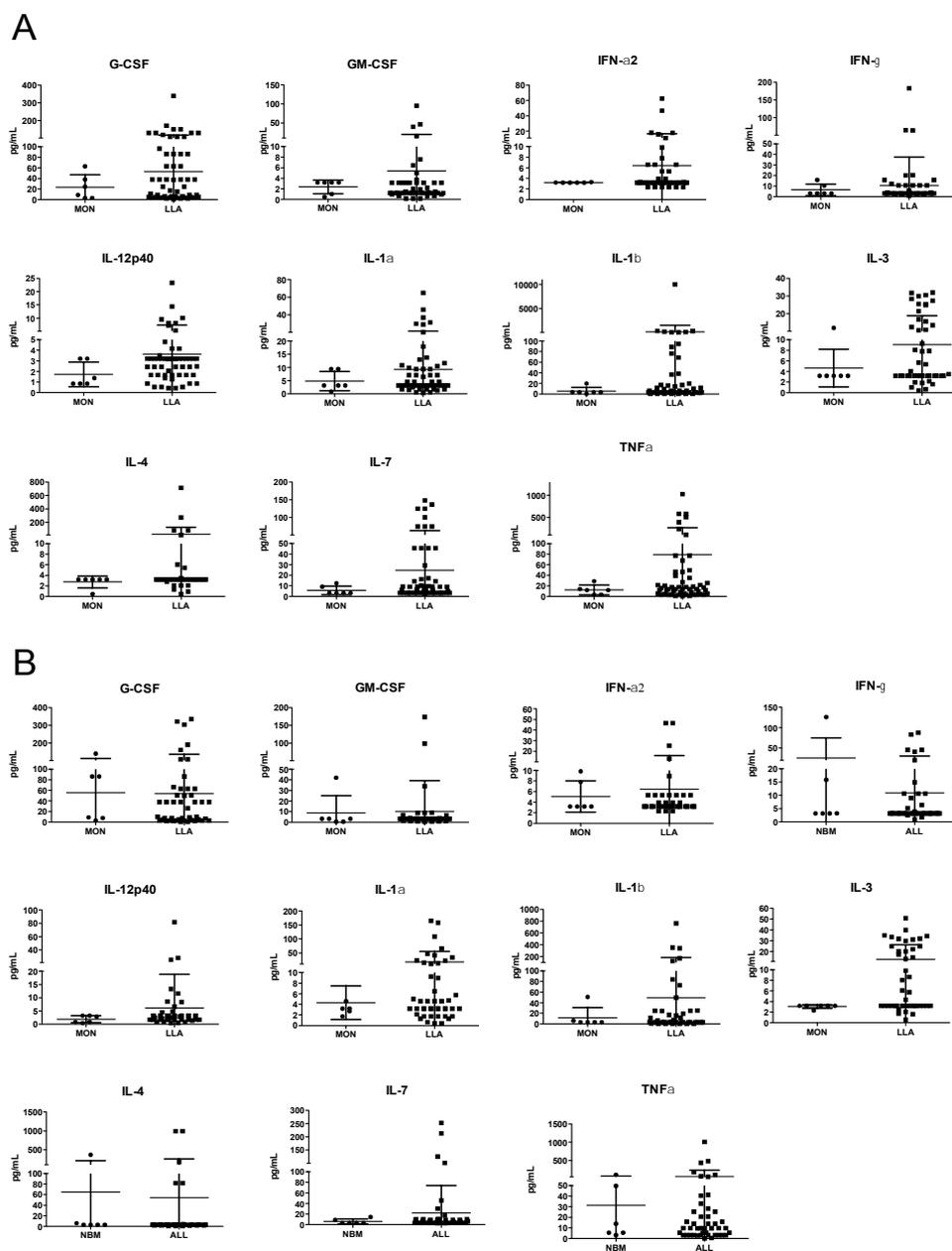


Figura 5. Alta producción de citocinas pro-inflamatorias por un grupo de pacientes con LLA. Las CMNs de pacientes y controles fueron cultivadas por 24 horas (A) y se recolectaron los sobrenadantes inmediatamente. Las células fueron provistas con medio adicional después de la primera colecta, los sobrenadantes se recolectaron 24 horas posteriores (B). Se muestra la distribución de los datos para la producción de citocinas tanto de pacientes con LLA como de controles.

El estado de activación de NF- κ B y STAT3 coincide con el estado pro-inflamatorio de los pacientes con LLA-B:

Con el propósito de investigar las vías de señalización que están implicadas en la activación del microambiente pro-inflamatorio, se buscó el estado de activación de NF κ B p65 y STAT3 por inmunofluorescencia indirecta. Entre cada paciente se aprecia de forma cualitativa que existe heterogeneidad en los niveles de activación; Sin embargo, las muestras que provienen de pacientes productores de citocinas pro-inflamatorias parecen tener mayor porcentaje de número de células positivas para NF κ B y STAT3 fosforilados, sugiriendo que en este grupo de pacientes el fenómeno pro-inflamatorio pudiera estar mediado por las vías de señalización mencionadas (Figura 6 panel superior). En contraste, las muestras definidas como no inflamatorias; mostraron menor activación tanto para NF κ B p65 y STAT3 y su contraparte normal parecen mostrar niveles basales de activación.

El perfil inflamatorio en la LLA-B está relacionado con la co-expresión aberrante de marcadores mieloides.

De los 54 pacientes incluidos en este estudio, 37 cumplieron los criterios clínicos para ser clasificados de alto riesgo de recaída, basados en el conteo de leucocitos, edad, CrPh + y si tienen el fenotipo de precursores de células T, mientras que 17 fueron estratificados como riesgo estándar (Tabla 1). La media de edad fue de 7.8 años (2m – 18a) y 4.8 (2a – 9a) para alto riesgo y riesgo estándar respectivamente. Independiente de la estratificación de riesgo clínico a las recaídas, 20 pacientes mostraron co-expresión aberrante de uno o más marcadores mieloides, incluyendo CD13 y CD33.

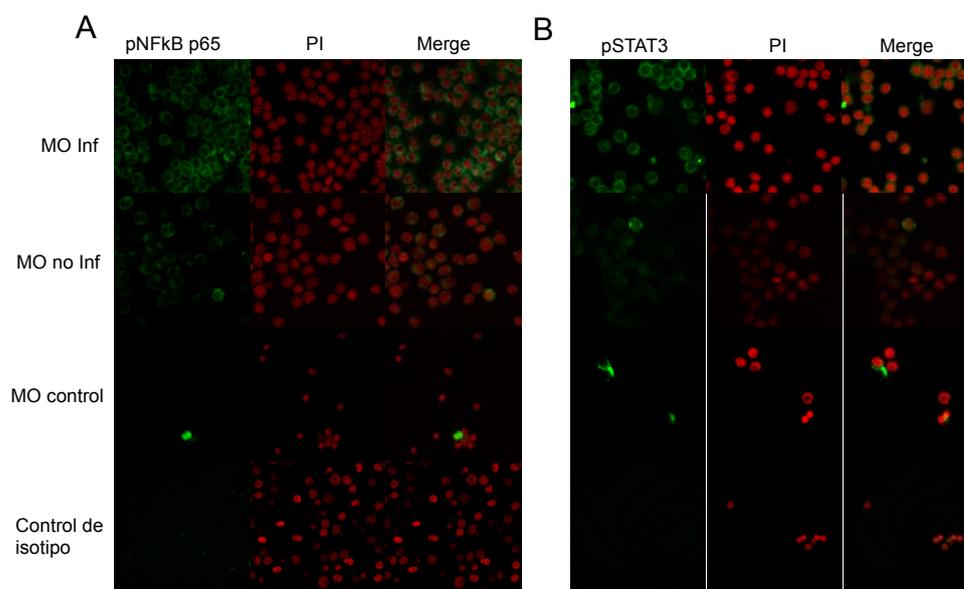


Figura 6. El perfil pro-inflamatorio está asociado a la activación de NFkB and STAT3. Se utilizó microscopía por inmunfluorescencia indirecta para evaluar pNFkB p65 y pSTAT3 en las CMNs de pacientes con LLA que presentan un perfil pro-inflamatorio (MO Inf), con un perfil no inflamatorio (MO no Inf) e individuos sanos (MO control). Se utilizó yoduro de propidio para contrastar los núcleos. Se muestra una figura representativa de 4 experimentos independientes.

Se realizaron pruebas de correlación por el método de Pearson (dato no mostrado), mostrando débil correlación entre el grupo de riesgo y la producción de factores pro-inflamatorios (Tabla 1). No se encontró tampoco asociación entre un marcador linfoide (CD10, CD19 o CD20) o la co-expresión de un marcador mieloides (CD13, CD14, CD15, CD33) con la producción de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, cuando se clasificó a la población de acuerdo a la co-expresión concomitante de tres marcadores linfoides (CD10, CD19 y CD20) o la expresión aberrante de los marcadores mieloides CD13 y CD33, fueron identificados cuatro grupos: un grupo positivo CD10+CD19+CD20+, el cuál expresa los tres marcadores linfoides de células B; un grupo sin la expresión de los tres marcadores linfoides de B (CD10+/-CD19+/-CD20+/-) (Tabla 2); un grupo positivo a CD13+CD33+; y un grupo con la co-expresión de menos de dos marcadores mieloides (Tabla 3). Primero se realizó la prueba de U de Mann-Whitney después de un análisis Kolmogorov-Smirnov para descartar distribución normal, se encontraron diferencias significativas entre el grupos linfoide positivo (CD10+CD19+CD20+) y negativo (CD10+/-CD19+/-CD20+/-) para IL-1 β , TNF- α , G-CSF e IFN- α 2 con $p \leq 0.05$ (Tabla 2). Por otro lado, el grupo de pacientes con co-expresión aberrante de CD13 y CD33 en más del 25% de las CMNs de la MO fue considerado como un grupo positivo (Tabla 3). Sorprendentemente la prueba de U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas en dos grupos con co-expresión mieloides aberrante. Por lo que la co-expresión aberrante de marcadores mieloides en la LLA-B condiciona la producción de citocinas pro-inflamatorias

Tabla 1: Características de los pacientes

Paciente	Edad (a)	Genero	WBC/mm ²	Fenotipo	Estratificación de riesgo Factor de Riesgo	Expresión aberrante de marcadores mieloides	Expresión concomitante de CD10/CD19/CD20
1	4	F	33700	LLA-B	RE	NEG	POS
2	4	F	7600	LLA-B	RE	CD15	POS
3	11	F	65000	LLA-B	AR Leucocitosis	NEG	POS
4	4	M	26400	LLA-B	RE	CD13/CD33	NEG
5	11	M	36600	LLA-B	AR Edad	CD13/CD33	NEG
6	5	M	23000	LLA-B	AR PhCr +	CD13	POS
7	5	M	8900	LLA-T	HR LLA-T	NEG	POS
8	2	F	91500	LLA-B	AR Leucocitosis PhCr +	NEG	POS
9	1	M	40000	LLA-B	AR Edad	NEG	NEG
10	10	F	1500	LLA-B	AR Edad	NEG	POS
11	12	F	1300	LLA-B	AR Edad	CD13/CD15	NEG
12	2	M	39000	LLA-B	RE	NEG	POS
13	5	M	11400	LLA-B	RE	NEG	NEG
14	13	M	3400	LLA-B	AR Edad	NEG	NEG
15	5	M	1100	LLA-B	RE	CD13	NEG
16	2	M	5300	LLA-B	RE	NEG	NEG
17	3	F	260000	LLA-B	AR PhCr+	CD13	NEG
18	3	M	85700	LLA-B	AR Leucocitosis	CD13	NEG

Paciente	Edad (a)	Genero	WBC/mm ²	Fenotipo	Estratificación de riesgo Factor de Riesgo	Expresión aberrante de marcadores mieloides	Expresión concomitante de CD10/CD19/CD20
19	4	M	161500	LLA-B	RE	NEG	POS
20	13	M	1600	LLA-M	AR LLA-linaje mixto	CD13/MPO	NEG
21	13	M	2600	LLA-B	AR Leucocitosis	NEG	NEG
22	3	M	400500	LLA-T	AR LLA-T	NEG	NEG
23	3	M	52500	LLA-B	AR Leucocitosis	CD-13	NEG
24	3	F	35100	LLA-B	RE	CD15	NEG
25	10	M	3500	LLA-B	RE	NEG	NEG
26	10	F	1200	LLA-B	AR Edad	CD13/CD15	NEG
27	6	M	115000	LLA-B	AR Leucocitosis	CD13	NEG
28	2	M	---	LLA-B	---	NEG	POS
29	6	M	131000	LLA-B	AR Edad	CD13	NEG
30	6	M	83500	LLA-B	AR Leucocitosis	NEG	POS
31	3	F	2700	LLA-B	AR	NEG	POS
32	6	M	13100	LLA-B	RE	NEG	POS
33	6	M	12600	LLA-B	RE	NEG	NEG
34	3	M	15600	LLA-B	RE	NEG	POS
35	4	F	---	LLA-B	---	NEG	NEG
36	6	M	1000	LLA-B	RE	NEG	NEG
37	14	F	600	LLA-B	Ar PhCr+	NEG	NEG
38	14	M	163000	LLA-B	AR	NEG	POS

Paciente	Edad (a)	Genero	WBC/mm ²	Fenotipo	Estratificación de riesgo Factor de Riesgo	Expresión aberrante de marcadores mieloides	Expresión concomitante de CD10/CD19/CD20
					Leucocitosis		
39	10	M	5900	LLA-B	AR Edad	CD13	POS
40	4	M	16100	LLA-B	AR PhCr+	NEG	NEG
41	15	M	113000	LLA-B	AR Edad Leucocitosis	NEG	NEG
42	6	M	42100	LLA-B	RE	NEG	NEG
43	15	M	47400	LLA-B	AR Edad	NEG	NEG
44	9	M	185000	LLA-B	AR Leucocitosis	NEG	POS
45	7	M	4000	LLA-B	RE	CD13	NEG
46	17	M	---	LLA-B	AR Edad	NEG	NEG
47	0.9	F	334700	LLA-B	SR Edad	CD33	POS
48	1	F	87900	LLA-B	AR Leucocitosis	NEG	POS
49	7	M	10500	LLA-B	RE	CD13/CD15	NEG
50	8	M	---	LLA-B	---	CD15	NEG
51	9	M	1900	LLA-B	RE	NEG	NEG
52	0.4	F	41600	LLA-B	AR Edad	CD13	NEG
53	8	F	52500	LLA-B	AR Leucocitosis	NEG	NEG
54	8	F	350000	LLA-B	AR Leucocitosis	NEG	POS

a: años; WBC: cuenta de leucocitos; M: masculino; F: femenino; LLA-B: Leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B; LLA-T: Leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B; LLA-M: Leucemia aguda de linaje mixto; AR: Alto riesgo; RE: Riesgo estándar.

Tabla 2: Las células de la MO en la LLA-B que expresan menos de dos marcadores linfoides producen mayor cantidad de citocinas pro-inflamatorias

Citocina	Expresión de tres marcadores linfoides (CD10+ CD19+ CD20+) Mediana (pg/mL) RI	Menos de tres marcadores linfoides positivo (CD10+/- CD19+/- CD20+/-) Mediana (pg/mL) RI	p
IL-1 α	3.20 4.07	4.58 9.20	0.202
IL-1 β	3.20 6.90	10.00 8.80	0.004**
IL-12p40	2.44 2.20	3.00 2.83	0.167
TNF α	9.85 13.72	19.00 54.73	0.032*
G-CSF	9.00 45.92	37.93 102.38	0.049*
GM-CSF	3.00 0.45	3.20 1.22	0.08
IL-7	5.00 6.39	9.18 42.51	0.104
IFN- α 2	0.700 0.700	2.20 3.80	0.008**

Expresión concomitante de CD10, CD19 y CD20, Prueba de U-Mann Whitney, RI: Rango intercuartilico.

Tabla 3: Expresión aberrante de marcadores mieloides en la LLA-B y la producción de citocinas pro-inflamatorias

Citocina	Expresión de marcadores mieloides CD13 and CD33 Mediana (pg/mL) RI	Expresión de menos de dos marcadores mieloides (CD13 or CD33) Mediana (pg/mL) RI	p
IL-1 α	46.00 52.38	3.20 96.39	0.009**
IL-1 β	429.00 9911.00	3.20 13.96	0.008**
IL-12p40	8.00 6.80	3.00 1.53	0.051*
TNF α	237.00 342.49	13.92 22.14	0.022*
G-CSF	37.00 104.17	24.32 81.19	0.558
GM-CSF	7.00 1.69	3.20 0.20	0.015*
IL-7	17.00 36.71	6.00 12.80	0.222
INF α 2	8.00 12.80	3.20 3.80	0.122

Expresión concomitante de CD13 y CD33, Prueba de U-Mann Whitney, RI: Rango intercuartilico.

Los progenitores tempranos son promovidos a proliferar en presencia de factores inflamatorios en la LLA-B.

Ensayos para medir proliferación con carboxifluoresceína (CFSE) fueron realizados para medir la respuesta de los progenitores hematopoyéticos normales provenientes en presencia de factores pro-inflamatorios producidos en la MO por el grupo de pacientes con LLA-B con la co-expresión aberrante de CD13 y CD33 (Figura 7). Se observó aceleración moderada entre los estados de diferenciación de $\text{Lin}^- \text{CD34}^+$ a $\text{Lin}^+ \text{CD34}^-$ cuando se analizó por citometría de flujo multi-paramétrica al medir el fenotipo de las células producidas después de 5 días de cultivo en condiciones linfoides (Figura 7A). En contraste, la inducción a estados de proliferación celular con los SN inf y SN no Inf fue claro (Figura 7B y 7C). Si bien, no existe influencia clara en los compartimentos tempranos por los SN no Inf, el compartimento $\text{Lin}^- \text{CD34}^-$ fue selectivamente empujado a ciclos de proliferación. De especial interés, las condiciones pro-inflamatorias muestran claramente que las células más primitivas son despertadas (Figura 7C panel izquierdo), así como una intensa actividad en las células más diferenciadas $\text{Lin}^- \text{CD34}^-$ and $\text{Lin}^+ \text{CD34}^-$. El efecto positivo neto se aprecia más cuando es analizado el conteo absoluto de cada compartimento respecto al número de divisiones celulares (Figura 7D). Las células progenitoras fueron inducidas a dividirse en presencia de condiciones pro-inflamatorias, como se muestra en los estadios transitorios de generación 0 (G0) a generación 1 (G1) y río abajo, a generación 2 (G2). El efecto de promoción se observa también en células diferenciadas $\text{Lin}^- \text{CD34}^-$, la mayor parte de las generaciones celulares de G1 a G6 se encuentran en condiciones inflamatorias (Figura 7 panel central. En contraste, las células maduras fueron restringidas a proliferar hasta G2 y de forma similar ocurrió en condiciones no inflamatorias.

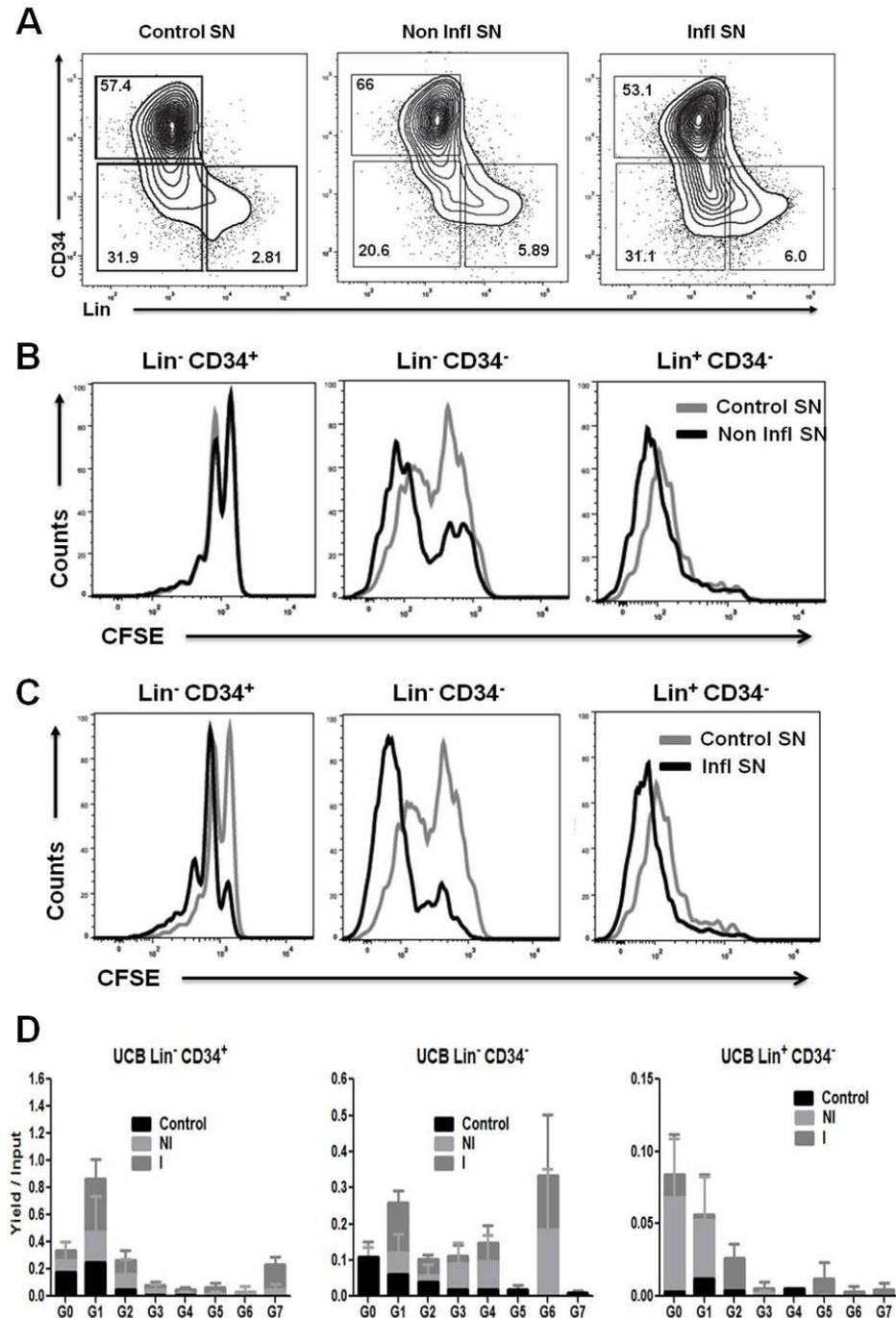


Figura 7. Los factores pro-inflamatorios producidos por las células de la MO en LLA promueven la proliferación de células primitivas normales. Células CD34⁺ de SCU fueron purificadas por columna magnética y analizadas para estudiar su capacidad de proliferación después de 120 horas de exposición a SN Inf, SN no Inf y SN control. Las ventanas señalan la frecuencia celular para células primitivas Lineage⁻CD34⁺, precursores Lineage⁻CD34⁻ y células maduras Lineage⁺CD34⁻ (A), y para mostrar el número de divisiones celulares en cada población. La exposición de las células a SN no Inf se muestra en (B), mientras que los perfiles

inflamatorios se muestran en (C). El número total de cada generación celular y de cada tratamiento se muestra en rendimiento por progenitor producido por cada progenitor (D). Los análisis de división celular fueron hechos en el software FlowJo. Se muestran los datos representativos de dos experimentos independientes.

El microambiente pro-inflamatorio en la MO de pacientes con LLA-B produce cambios en la diferenciación hematopoyética normal.

Con el fin de investigar si los eventos inflamatorios en la LLA pueden influir en las decisiones de destino en la hematopoyesis temprana, las células Lin⁻CD34⁺ provenientes de SCU fueron purificadas y expuestas a los sobrenadantes control e inflamatorios durante tres semanas en condiciones linfoides. La cosecha celular reveló que la producción de células CD34, NK, B, células dendríticas (CD) y mieloides incrementó sustancialmente cuando los progenitores se incubaron con el SN Inf en comparación al control. Al final del co-cultivo, los progenitores comprometidos a linaje linfoide tuvieron al menos el doble de producción celular por progenitor cuando estuvieron expuestos a factores solubles pro-inflamatorios en la LLA (Figura 8).

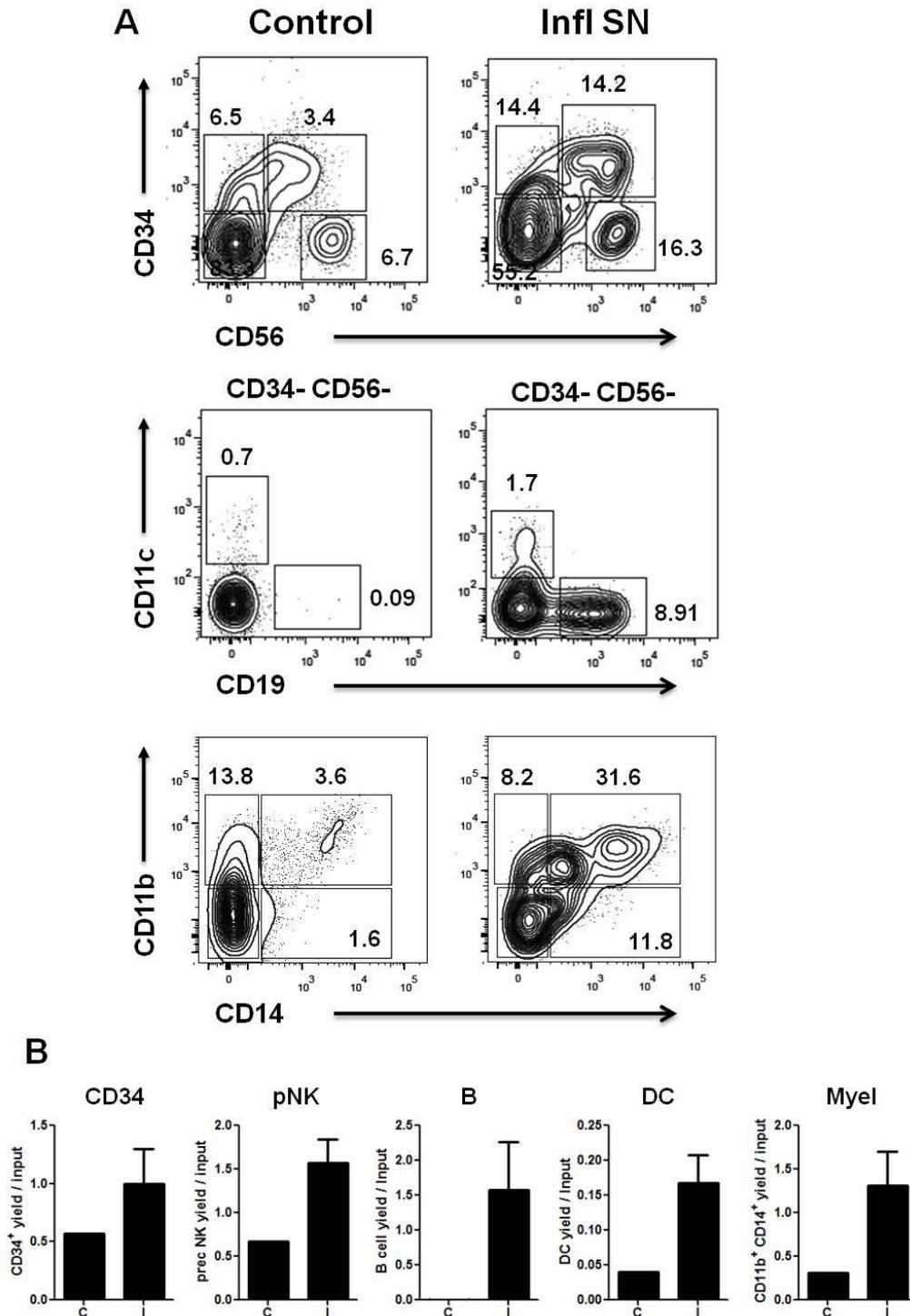


Figura 8. Tanto la diferenciación linfoide como mieloide en etapas tempranas es acelerada por los factores pro-inflamatorios en la LLA. Células CD34⁺ fueron purificadas de SCU y estimuladas con SN Inf, SN noInf, y SN control en co-cultivo estromal por 3 semanas. Las células producidas fueron analizadas y cuantificadas por citometría de flujo multiparamétrica (A) Se muestran en las ventanas las frecuencias celulares obtenidas en el cultivo para CD34⁺,

precursores de CD34⁺CD56⁺ y células NK CD56⁺ (A, panel superior). Al fraccionar el compartimento CD34⁻CD56⁻, se identifican células dendríticas CD11c⁺ y células B CD19⁺. (A, panel intermedio). Las células mieloides aparecen como CD11b⁺ o más diferenciadas CD11b⁺CD14⁺ (A panel inferior). Los números totales para cada condición son expresados en rendimiento por progenitor (B). Se muestran los datos representativos de tres experimentos diferentes.

Discusión:

La linfopoyesis es un proceso complejo, el cual involucra la participación altamente regulada por un microambiente hematopoyético, genes que son regulados por factores de transcripción y que dirigen el programa de diferenciación linfoide [Kathrein 2008]. Dicho proceso sufre alteraciones durante la leucemia linfoblástica aguda, provocando el desequilibrio hematopoyético y el bloqueo de la diferenciación en la etapa de ProB/PreB que caracteriza la enfermedad. Aunque en la leucemia linfoblástica aguda no se conoce el origen de la enfermedad, puesto que se ha podido recapitular la leucemia a partir de células progenitoras así como a partir de blastos leucémicos, se ha sugerido la existencia de células de características troncales, probablemente de origen muy primitivo, las cuales escapan de la acción de los agentes quimioterapéuticos y son potencialmente responsables de las recaídas y falla en la respuesta al tratamiento, factores que disminuyen la supervivencia libre de enfermedad del paciente y por tanto, su calidad de vida [Baker 2007]. Por estudios realizados en el laboratorio se conoce que el microambiente hematopoyético tiene defectos en el soporte de diferenciación linfoide, los progenitores linfoides tempranos se encuentran abatidos en sus potenciales de proliferación y diferenciación *in vitro*. Además, el contenido celular muestra diferencias sustanciales con respecto a las células de la médula ósea de niños sin enfermedades hematológicas, con una disminución aproximadamente 10 veces menor que en la normalidad. En contraste, el compartimento de células precursoras muestra un dramático incremento en la fracción ProB/PreB, lo cual

es concordante con lo reportado en la literatura acerca del bloqueo estadio-específico [Purizaca 2013].

En recientes descubrimientos en la regulación del desarrollo hematopoyético temprano se sabe que están involucrados los receptores tipo toll (TLRs) en presencia de patógenos o moléculas de daño y que el reconocimiento de estas moléculas por las células troncales y progenitores provocan cambios en la decisión destino y contribuye a la repoblación emergente de células hematopoyéticas de la respuesta innata en un contexto inflamatorio [Welner 2008] [Cain 2009] [Takisawa 2012]. Por otro lado, se ha documentado que la señalización de TLR en progenitores normales se puede producir citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento como $TNF\alpha$, IL-12, IL-3, IL-6, IL-8, GM-CSF y MCP-1 [Sioud 2006] [Lee 2011]. En respuesta a estas señales pro-inflamatorias, las células troncales y progenitores tempranos, pueden producir citocinas que promueven su movilización y la diferenciación a células de la respuesta innata [Welner 2014] [Zhao 2014].

Derivado del microambiente tumoral, se ha visto que las células leucémicas dañan la biología normal de las células hematopoyéticas [Colmone 2008]. Así por primera vez, se ha demostrado que los precursores hematopoyéticos en la leucemia linfoblástica aguda infantil producen factores solubles, incluyendo citocinas pro-inflamatorias, interferones y factores de crecimiento. Se observó un moderado incremento de $IFN\gamma$, IL-10 y VEGF, mientras que no se observaron cambios en Flt3L, IL-15, IL-5, IL-6, IL-8, SCF y SDF-1. Queda por demostrar si la producción de factores solubles se debe al estímulo de TLRs por patrones moleculares asociados a daño, patrones moleculares asociados a patógenos (DAMPs o PAMPs respectivamente) [Vadillo 2014] o debido a aberraciones genéticas que provocan la activación constitutiva de vías que participan en la inflamación [Guzman 2001]. En nuestro grupo de trabajo encontramos una producción significativa de IL-6 por las células mesenquimales (MSC) de la médula ósea en la LLA-B (dato en preparación), por lo que podemos asumir que un estímulo externo contribuye a la liberación de citocinas hematopoyéticas a través de la activación de (MSC) [Schurch 2014].

Las muestras de pacientes denominados inflamatorios presentan activación tanto NFκ-B y STAT3. Las muestras definidas como no inflamatorias; mostraron menor activación tanto para NFκB p65 y STAT3 y su contraparte normal parecen mostrar niveles basales de activación. Interesantemente estos factores transcripción cooperan y promueven el desarrollo y progresión del cáncer. Se ha propuesto como alternativa terapéutica el uso de inhibidores de NFκB p65 y STAT3 para modificar el estado inflamatorio del microambiente tumoral. Una vez activadas estas vías de señalización, gobiernan la expresión de genes anti-apoptóticos y de proliferación tanto en tejido normal como neoplásico [Grivennikov 2010]. Estudios recientes indican que las células troncales leucémicas en la leucemia mieloide aguda tienen activado NFκB de forma constitutiva (25), mientras que STAT3 participa en el mantenimiento y auto-renovación de las células troncales hematopoyéticas en la LLA con la translocación TEL-AML1 t (12:21) [Mangolini 2013] y ayuda a la expansión hematopoyética a través del control en la diferenciación de progenitores mieloides [Zhang 2010].

Falta investigar si las células con expresión aberrante de estos marcadores mieloides son las responsables de la producción de los factores a través de la regulación de moléculas relacionadas al desarrollo mieloide. De forma alternativa pudiera presentarse hematopoyesis mieloide bajo condiciones de emergencia en la LLA, como se ha visto en infecciones sistémicas.

De acuerdo con estas observaciones de proliferación, reportes previos indican que durante procesos de inflamación crónica, el paso de un estado de quiescencia a estados de proliferación de las células troncales puede conducir a su agotamiento [Trump 2010]. Si esto ocurre en las células hematopoyéticas normales en la MO de pacientes LLA-B, tendría gran relevancia clínica y podría predecir escenarios de riesgo o protección.

De particular interés fue la sobreproducción de células de la respuesta innata como las NK o mieloides CD14⁺, lo que semeja el comportamiento de las células troncales y progenitores en condiciones de estrés o en infecciones [Zhao 2014]. La función de los factores solubles es fundamental en el microambiente tumoral: TNF α incrementa el crecimiento de las células malignas en cáncer de piel, ovario y páncreas, y forma parte de una red de moléculas pro-inflamatorias incluyendo CXCL12 y CCL2, IL-6, factor inhibidor de macrófagos (MIF) y factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF), entre otros [Kulbe 2007]. En cuanto a las neoplasias hematológicas, existen observaciones experimentales que indican el uso autócrino de TNF α por las células iniciadoras de la leucemia, para sobrevivencia y proliferación independiente de NF κ -B [Gallipoli 2013]. Por otro lado, se ha documentado la participación de IL-1 β en la patogénesis de la leucemia mieloide aguda, mostrando que su señalización en las células troncales leucémicas las saca de su estado dormante y las induce a proliferar [Yang 2013]. Por otro lado la regulación del inflamasoma NLRP3 podría explicar la actividad de IL-1 β en la leucemia promielocítica, como se describe en otros modelos [Zitvogel 2012] [Okamoto 2010]. La participación del inflamasoma en la activación de procesos inflamatorios en la LLA-B se tendrá que investigar, así como el activador putativo dentro de las células en la LLA. En nuestro conocimiento, este es el primer acercamiento a descifrar la influencia de un microambiente pro-inflamatorio en el desarrollo de la hematopoyesis temprana en la LLA. Los hallazgos sugieren que una subpoblación celular que co-expresa marcadores mieloides en la LLA está asociada a la producción de citocinas y factores solubles, particularmente relacionados a la respuesta Th1, el cual a su vez, regula la proliferación y diferenciación en células primitivas normales. Nuestro dato sugiere que la señalización de NF κ B y STAT3 en células leucémicas y la presencia de nichos hematopoyéticos dañados podrían afectar la hematopoyesis de largo plazo. Los mecanismos involucrados pueden incluir receptores de factores de crecimiento [Vadillo 2014]

CONCLUSIONES:

Existen grandes expectativas en la investigación biomédica para entender aspectos fundamentales de la patogénesis de la LLA, desde los eventos más tempranos de diferenciación normal y leucémica en la MO. Aunque desde hace tiempo se ha reconocido la estabilidad del sistema hematopoyético, ha quedado claro que la plasticidad de las células troncales y los progenitores hematopoyéticos, son cruciales en la regulación de los compartimentos más primitivos durante la inflamación.

Así como lo demuestran los estudios epidemiológicos y experimentales donde la inflamación crónica juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del cáncer. Nuestros hallazgos sugieren que la manipulación del microambiente hematopoyético por parte de un grupo especial de células leucémicas puede modificar la comunicación normal entre las células troncales hematopoyéticas con su nicho al momento que se lleva a cabo el desarrollo del tumor.

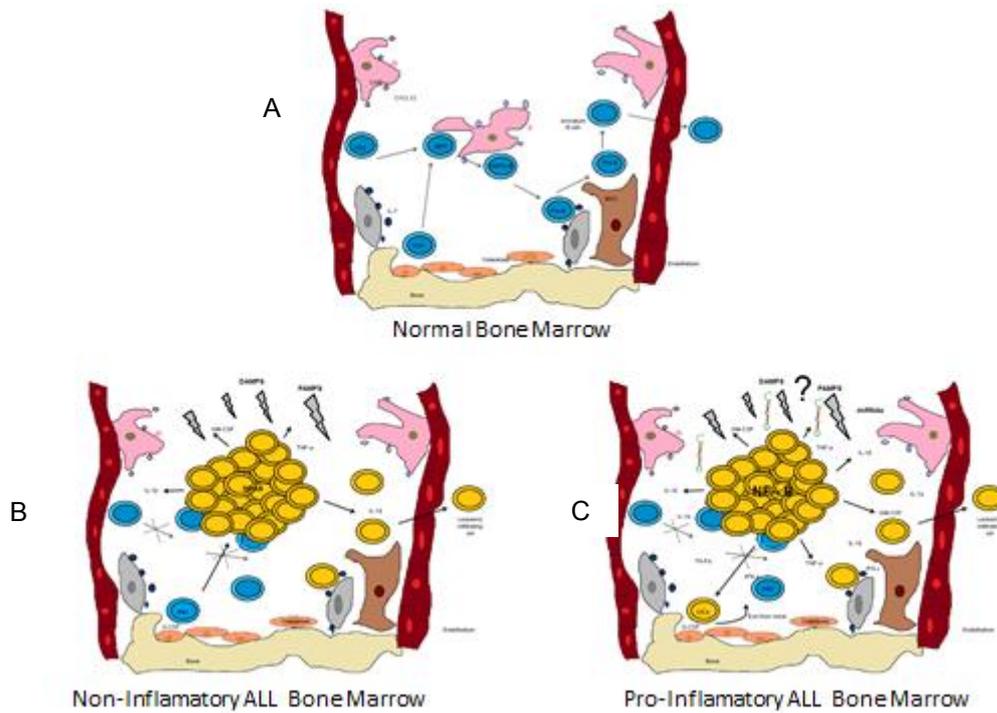


Figura 9: Mecanismo propuesto en un microambiente pro-inflamatorio. La presencia de factores inflamatorios sugiere el agotamiento de células troncales, siendo ocupados los nichos por células leucémicas. Los posibles detonantes del microambiente pro-inflamatorio son los ligandos de TLR o miRNAs. A) Microambiente hematopoyético normal, B) Microambiente hematopoyético leucémico no inflamatorio. C) Microambiente hematopoyético leucémico con un perfil pro-inflamatorio.

BIBLIOGRAFÍA

Andreu P, Johansson M, Affara NI et al. 2010. FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell* 17:121–34.

Baker SJ, Rane SG, Reddy EP. Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*. 2007 Oct; 26(47):6724-37.

Balkwill FR, Mantovani A. 2012. Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology* 22: 33– 40.

Ben-Neriah Y, Karin M. 2011. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature Immunology* 12: 715-23.

Cain D, Kondo M, Chen H. 2009. Effects of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation. *J Invest Dermatol* 129:266-77.

Colmone A., Amorim M., Pontier AL et al. 2008. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 322(5909): 1861-5.

Colmone A., Amorim M., Pontier AL., Wang S., Jablonski E. y Sipkins DA. 2008. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. 322(5909): 1861-5.

Cox CV, Diamanti P, Evely RS et al. 2009. Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL. *Blood* 113: 3287-3296.

Cox CV., Diamanti P., Evely RS., Kearns PR. y Blair A. 2009. Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL. *Blood*. 2;113 (14):3287-96.

Díaz Trejo et al. Defunciones por leucemia linfoblástica aguda en menores de 20 años México 1998-2009, Boletín Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

Dick JE., Kennedy JA., Barabé F., Poepl AG. y Wang JC. 2007. Comment on "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells". Science. 318(5857):1722.

Dirección General de Información en Salud. Estadísticas de salud en niños y adolescentes. Mexico, D.F.: Bol Med Hosp Infant Mex; 2004. Report No.4.

Dorantes-Acosta E, Vadillo E, Contreras-Quiroz A, et al. 2013. TLR Stimulation of Bone Marrow Lymphoid Precursors from Childhood Acute Leukemia Modifies Their Differentiation Potentials. BioMed research international. 2013:846724.

Dorantes-Acosta E. y Pelayo R. 2012. Lineage switching in acute leukemia's: a consequence of stem cell plasticity?. Bone Marrow Res. 2012:406796.

Erez N, Truitt M, Olson P et al. 2010. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner. Cancer Cell 17:135–47.

Espinoza-Hernandez L, Cruz-Rico J, Benitez-Aranda H et al. 2001. In vitro characterization of the hematopoietic system in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res 25: 295-303.

Friedman AD. Normal and malignant hematopoiesis. Oncogene. 2007 Oct; 26(47):6686.

Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. J Clin Oncol 2005;23: 6285–6295.

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:253-268.

Gallipoli P, Pellicano F, Morrison H et al. 2013. Autocrine TNF- α production supports CML stem and progenitor cell survival and enhances their proliferation. *Blood* 122:3335-9.

Greaves M. 2006. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 3:193-203.

Grivennikov SI, Karin M. 2010. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21: 11–19.

Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D et al. 2001. Nuclear factor- κ B is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*

Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L et al. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4163-9.

Heidenreich O., Vormoor J. 2009. Malignant stem cells in childhood ALL: the debate continues!. *Blood*. 113(18):4476-7.

Hematopoietic Progenitors by Promoting Cytokine Release from Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells. *Cell Stem Cell* 14:460-72.

Juarez JG., Thien M., De la Pena A., Baraz R., Bradstock KF. y Bendall LJ. 2009. CXCR4 mediates the homing of B cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia cells to the bone marrow via activation of p39MAPK. *Br. J. Haematol.* 4: 491-9.

Karin M. 2006. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* 441:431-6.

Khalid S et al. Retrospective, Review of Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia: a single center experience. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010 Oct-Dec; 53(4): 704-10.

Kathrein KL, Chari S, Winandy S. Ikaros directly represses the Notch target gene Hes1 in a leukemia T cell line. *J Biol Chem* 2008;283(16):10476-10484.

Kulbe H, Thompson RT, Wilson J et al. 2007. The inflammatory cytokine TNF- α generates an autocrine tumour-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 67:585–92.

Lee SA, Kim SM, Son YH et al. 2011. Peptidoglycan enhances secretion of monocyte chemoattractants via multiple signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 408: 132-138.

Lippitz BE. 2013. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncology* 14: e218–28.

Mangolini M, de Boer J, Walf-Vorderwulbecke et al. 2013. STAT3 mediates oncogenic addiction to TEL-AML1 in t(12;21) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 122:542-9.

Mantovani A, Allavena P, Sica A et al. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436–44.

Mantovani A, Savino B, Locati M et al. 2010. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:27–39.

Medina Sanson A, Martínez-Avalos A, Gallegos-Castorena S, et al. Pediatric oncology at Hospital Infantil de Mexico: fifty-five years of accomplishment. *Pediatr Hematol Oncol* 2002 Sep; 19(6):383-7.

Menendez P., Catalina P., Rodriguez R., Melen GJ., Bueno C., Arriero M., García-Sánchez F., Lassaletta A., García-Sanz R. y García-Catro J. 2009. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLLA-AF4 fusion gene. *J. Exp. Med.* 206(13): 3131-41.

Nagasawa T., Omatsu Y. y Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.* 2011 Epub 7:315-20. *Nature* 454:436–44.

Naugler WE, Karin M. 2008. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med* 14:109–19.

Niel Cravioto A, González-Bonilla CR, Mejía Arangure JM, et al. Genetic rearrangement MLL/AF4 is most frequent in children with acute lymphoblastic leukemias in Mexico City. *Leuk Lymphoma* 2009 Aug; 50(8):1352-60.

Okamoto M, Liu W, Luo Y et al. 2010. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1b. *J. Biol. Chem.* 285:6477–88 (2010).

Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am.* 2009; 23:655-674.

Pelayo R, Vadillo E, Dorantes E et al. 2013. From HSC to B-lymphoid cells in normal and malignant hematopoiesis. In: *Advances in hematopoietic stem cell research.* Intech 2013.

Pérez Saldivar ML, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer.* 2011; 11: 355.

Pérez Vera P, Salas C, Montero-Ruiz O, et al. Analysis of gene rearrangements using a fluorescence in situ hybridization method in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution. *Cancer Genet Cytogenet* 2008 Jul 15; 184(2):94-8.

Purizaca J, Contreras-Quiroz A, Dorantes-Acosta E et al. 2013. Lymphoid Progenitor Cells from Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Are Functionally Deficient and Express High Levels of the Transcriptional Repressor Gfi-1. *Clin Dev Immunol* 2013, Article ID 349067.

Purizaca J., Meza I. y Pelayo R. 2012. Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Arch. Med. Res.* 43(2):89-101.

Raaijmakers MH. 2011. Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica.* 7: 1041-8.

Schurch CM, Riether C, Ochsenbein AF. 2014. Cytotoxic CD8+TCells Stimulate.

Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010 Nov; 2(6): 640-53.

Sioud M, Floisand Y, Forfang L et al. 2006. Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitor cells along the myeloid lineage. *J Mol Biol* 364: 945-954.

Takizawa H, Boettcher S, Manz MG. 2012. Demand-adapted regulation of early hematopoiesis in infection and inflammation. *Blood* 119:2991-3002.

Tokoyoda K., Egawa T., Sugiyama T., Choi BL. y Nagasawa T. 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development *Immunity.* 6:707-18.

Trumpp A, Essers M, Wilson A. 2010. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 10:201-9.

Vadillo E, Dorantes-Acosta E, Arriaga-Pizano L et al. 2014. Adult, but not neonatal, human lymphoid progenitors respond to TLR9 ligation by producing functional NK-like cells. *Exp Hematol*.

Warner JK., Wang JC., Hope KJ., Jin L. y Dick JE. 2004. Concepts of human leukemic development. *Oncogene*. 20;23 (43): 7164-77.

Welner RS, Kincade PW. 2014. 9-1-1: HSCs respond to emergency calls. *Cell Stem Cell* 14:415-6.

Yang J, Ikezoe T, Nishioka C et al. 2013. IL-1 β inhibits self-renewal capacity of dormant CD34+/CD38- acute myelogenous leukemia cells in vitro and in vivo”, *International Journal of Cancer*, 133, 1967–1981.

Zhang H, Nguyen-Jackson H, Panopoulos AD et al. 2010. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood* 116:2462-71.

Zhao JL, Ma C, O’Connell RM. 2014. Conversion of danger signals into cytokine signals by hematopoietic stem and Progenitor Cells for Regulation of Stress-Induced Hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 14:445-59.

Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L et al. 2012. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol* 13:343-51.