



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Desarrollo de un modelo matemático para el estudio de la dinámica poblacional hematopoyética normal y leucémica en el progreso de la leucemia linfoblástica aguda

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Jennifer Enciso García

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosana Pelayo Camacho

[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces

[Instituto de Ecología](#)

Dr. Luis Antonio Mendoza Sierra

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México, Junio, 2021



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.

“The construction and structure of graphs or networks is the key to understanding the complex world around us. Small changes in the topology, affecting only a few nodes or links, can open hidden doors, allowing new possibilities to emerge”

— Albert-László Barabási, “Linked”

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo se llevó a cabo bajo la tutoría de la Dra. Rosana Pelayo en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI-IMSS), el Centro de Investigación Blomédica de Oriente (CIBIOR-IMSS) y el Centro de Ciencias de la Complejidad (C3-UNAM). Extiendo un atento agradecimiento a mi tutora y a ambas Instituciones, IMSS y UNAM, por las facilidades otorgadas para su desarrollo.

A lo largo de los 4 años de desarrollo del presente proyecto recibí continuamente la asesoría y retroalimentación del Dr. Luis Mendoza del Laboratorio de Biología Computacional (CompBioLab) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y de la Dra. Elena Álvarez Buylla-Roces, a quienes agradezco por que siempre mostraron profundo interés tanto por el proyecto, como por mi desarrollo profesional.

Agradezco también a la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida para estudios de Doctorado (368286), al Instituto Mexicano del Seguro Social por la beca otorgada por el Programa de Formación de Investigadores (99096739) y la beca para realizar una estancia de dos meses en el laboratorio del Dr. Denis Thieffry, al Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo proporcionado para la participación en el Congreso Anual de la International Society of Experimental Hematology (ISEH).

Por último agradezco a la Sociedad Mexicana de Inmunología (SMI), la Asociación Latinoamericana de Inmunología (ALAI), la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) e Immunopaedia, que me permitieron ser parte de importantes eventos científicos y de divulgación como parte de los Comités de organización y autora de material para difusión científica. Estos proyectos me han dejado una gran experiencia y satisfacción.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi tutora, maestra y amiga, Ros. El aprendizaje adquirido a lo largo de estos años bajo tu mentoría serán parte de mí por el resto de mi vida. Agradezco haber sido siempre un ejemplo de perseverancia, rectitud y sensibilidad.

A los miembros del laboratorio de Linfopoyesis, gracias por las discusiones científicas y no tan científicas, por sus dudas y respuestas, y por que cada uno de ustedes me enseñó algo nuevo a lo largo de estos años. Gracias JC por ser siempre un ejemplo de pasión y compromiso, te admiro profundamente. A Juss, por tu amistad y por transmitir tanta fortaleza y bondad. A Marthita, Dalia y Dianita por ser excelentes promotoras de colaboración y trabajo en equipo. A Armando por haber sido un gran compañero de carretera en las excursiones a Atlixco.

A mis compañeros y amigos del C3. Caro, Moni y Caldú, agradezco nuestro viaje a Argentina por habernos acercado y formar este círculo de vino, risas y experiencias. Teté, gracias por la ópera, tu entusiasmo y por alimentar mi lista de proyectos. A Juanin, gracias por haber sido un ejemplo de osadía. Ustedes han sabido ser un respiro de aire fresco.

A mis amigos no tan cercanos al círculo académico pero que me han acompañado y aconsejado, de cerca y a distancia, a lo largo de estos años. Toño, Lore, Cris, Dany, Rafa y Alex, gracias por escucharme indiferentemente en momentos de emoción, felicidad, enojo o frustración.

A Josué, por acompañarme y cuestionarme. Caminar a tu lado me ha hecho crecer en innumerables aspectos, agradezco a la *coincidencia de habernos encontrado en el cosmos, porque ha sido maravilloso.*

A mi madre y mi hermana, por ser mis amigas y mi inspiración. Las amo y admiro.

A mi padre, por ser mi ímpetu y la voz de mi conciencia.

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Índice de tablas	v
Índice de anexos.....	v
Abreviaturas	viii
Resumen	x
Abstract	xi
I. Introducción	1
I.1 Sistema hematopoyético	2
I.1.1 Ontogenia de la hematopoyesis	4
I.1.2 Hematopoyesis adulta y nichos hematopoyéticos	5
I.1.2.1 Linfopoyesis: Regulación genética y microambiental	10
I.1.2.2 Leucemia linfoblástica aguda	12
I.2 Modelos matemáticos para el estudio del sistema hematopoyético	16
I.2.1 Origen y fundamento de los modelos de regulación genética discretos	16
I.2.2 Modelos discretos para el estudio de la hematopoyesis	19
I.2.3 Modelos de diferenciación y plasticidad linfoide influidos por elemento microambientales	21
I.2.4 Modelos con variación de dosis para el estudio de la diversidad linfoide: continuos, multivaluados y probabilísticos	24
I.2.5 Simulación continua a partir de redes de diferenciación discreta	26
I.2.6 Aplicación del modelado computacional para la simulación de contextos patológicos relacionados con las células linfoides	28
II. Justificación	31
III. Hipótesis	32
IV. Objetivos	32
IV.1 Objetivo general.....	32
IV.2 Objetivos particulares.....	32
V. Metodología	33
V.1 Construcción de la red de regulación de diferenciación temprana de células B (eBCR)	33
V.2 Modelo dinámico booleano de una red de regulación temprana de células B	

(eBCR)	33
V.3 Modelo dinámico continuo de la red eBCR	34
V.4 Análisis de estados de transición de la simulación continua de redes con mutaciones	36
V.5 Análisis bioinformático de la base de datos dbDEMC 2.0 database	37
V.6 Análisis de expresión de miRNAs en células de LLA pediátrica	38
VI. Resultados	39
VI.1 Reconstrucción de la red de diferenciación temprana de células B	39
VI.2 Simulación Booleana de la red eBCR: recuperación de estadios de la diferenciación temprana de linfocitos B	43
VI.3 Transformación del modelo Booleano a semi-continuo: recuperación de estadios linfoides intermedios	45
VI.4 Evaluación de redes mutantes con modelos semi-continuos	46
VI.5 Inducción de NF- κ B: obtención de precursores B aberrantes CXCR7 ⁺	49
VI.6 Identificación <i>in silico</i> del potencial de unión de miRNAs sobreexpresados en cáncer y particularmente LLA, a TLR8	51
VII. Discusión	55
VIII. Conclusiones	57
IX. Bibliografía	58
X. Anexos	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de células hematopoyéticas. La hematopoyesis es un proceso que involucra una serie de “decisiones de linaje”. Puede visualizarse como un proceso radial con su origen en la población de células troncales, las cuales en respuesta a los factores microambientales diferencian a uno u otro linaje celular. *Clasificación de acuerdo al progenitor común: células de linaje mieloide y linfoide. ** Clasificación de acuerdo a la fase de la respuesta inmunológica en la que participan: células de la respuesta innata o adaptativa. (Modificado de Baladrán et al., 2017) 6

Figura 2. Componentes del microambiente hematopoyético. La diferenciación hematopoyética ocurre en nichos integrados por células estromales que incluyen: osteoblastos, osteoclastos, adipocitos, células mesenquimales y células endoteliales de los sinusoides, a través de los cuales ocurre la comunicación con el resto del cuerpo. Las células estromales producen moléculas de matriz extracelular, quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento que constituyen el microambiente hematopoyético. Los elementos producidos tanto por las células hematopoyéticas como por las células estromales integran una red de comunicación que regula los procesos celulares en la MO. Estas vías de comunicación tienen una participación importante en procesos aberrantes como la leucemia. En la leucemia la población aberrante (células troncales e iniciadoras de la leucemia, LSC / LIC y células leucémicas) también es responsiva a las señales microambientales, y a su vez produce factores capaces de remodelar el microambiente medular afectando la producción de células hematopoyéticas sanas. (Modificado de Enciso et al., 2018) 8

Figura 3. Complejidad del inicio y progresión leucémica. Durante la progresión leucémica tiene lugar un proceso competitivo en el cual convergen y conviven en la MO al menos 3 sistemas: la hematopoyesis normal, la producción celular leucémica y el microambiente hematopoyético. En el diagrama, se representa la convivencia de los 3 sistemas durante la leucemogénesis, proceso durante el cual los blastos leucémicos desplazan gradualmente a la hematopoyesis normal. Los cambios en ambas poblaciones son acompañadas e influenciadas por cambios en el microambiente de la MO. El microambiente a su vez, es modificado por los factores secretados por ambas poblaciones celulares estableciendo un asa de retroalimentación entre los 3 sistemas, comunicación representada por la red intercelular. El establecimiento de un microambiente “leucémico” podría ser el factor determinante en el desequilibrio leucemia/hematopoyesis normal. Además el microambiente y los diferentes nichos que lo conforman, también han sido sugeridos como jugadores importantes para la supervivencia de clones leucémicos minoritarios ante la quimioterapia, y responsables de recaídas (Modificado de: Enciso et al., 2015) 15

Figura 4. Atractores celulares y transiciones de la diferenciación hematopoyética reproducidos a través de modelos discretos. Los modelos discretos han sido ampliamente utilizados para modelar

distintas ramas de la diferenciación hematopoyética. En la red se encuentran representados algunos de los artículos (código de color) en donde se reportan los resultados de modelos discretos y los fenotipos celulares que recuperan en las simulaciones. El subsistema hematopoyético más estudiado a través de estrategias computacionales discretas es la diferenciación de linfocitos T, proceso del cual se han recuperado numerosos fenotipos observados experimentalmente (nodos amarillos) y algunos estadios teóricos que no han asociado a hallazgos experimentales (nodos blancos). Las flechas negras representan la dirección de la hematopoyesis hacia el linaje mieloide y linfoide. Figura de: Enciso, Pelayo & Villarreal 2019 21

Figura 5. Transiciones graduales para valores variables de β . Distribución característica de $\mu [w_n - w_{thr}]$ para un valor umbral $w_{thr} = 1/2$ de la proposición lógica w_n , y diferentes valores del parámetro de saturación β . En el caso $\beta \gg 1$, la distribución característica se convierte en una distribución escalonada 27

Figura 6. Red de regulación de la diferenciación temprana a linfocitos B (*early B cell regulation*, eBCR). La red está compuesta por 30 nodos, que fueron reducidos a 26 a través de la integración de la regla lógica de los nodos reducidos en la regla lógica los nodos que regulan, como se describe en Enciso et al., 2019..... 41

Figura 7. Atractores síncronos y asíncronos recuperados después de la simulación computacional de la red eBCR como modelo Booleano. Los atractores fueron etiquetados de acuerdo con su compatibilidad con las etapas celulares de la linfopoyesis B. Los marcadores linfoides particulares utilizados para esta clasificación se destacan en negritas. La transición entre los fenotipos recuperados se asemeja a los eventos *in vivo* que ocurren durante la diferenciación de células B en la médula ósea..... 44

Figura 8. Redes eBCR de tipo silvestre (*wt*) y mutantes simuladas como modelos semi-continuos. A) Simulación de la red *wt*. La ilustración representa la transición entre nichos de la MO inducida por los ejes IL7/CXCL12 durante el proceso de diferenciación. El mapa de calor refleja el estado de activación para cada nodo simulado durante 100 *iteraciones* (azul claro = nulo o bajo nivel de activación, gris = valores intermedios de activación, verde = valores altos de activación). Las etiquetas superiores indican el fenotipo celular compatible con el patrón de activación de los nodos a lo largo de la simulación continua de la red. B) Representación de la divergencia entre las

simulaciones de las redes mutantes respecto a la simulación de la red *wt*, empleando índices de Jaccard. Las redes mutantes están agrupadas de acuerdo a una clasificación jerárquica no supervisada según la etapa de desarrollo donde la simulación diverge de la simulación de la red *wt*. Cada grupo de mutantes es identificado por los bloques en el eje X identificados en la columna derecha del mapa de calor, indicando la etapa de la simulación en la cual ocurre la mayor perturbación o arresto en la diferenciación (menor índice de Jaccard representado por el color rojo en el mapa de color). Las redes mutantes que integran cada bloque pueden ser consultadas en la tabla complementaria a esta figura en donde también se comparan los resultados de la simulación de mutantes con los hallazgos experimentales (Anexo 2)..... 48

Figura 9. La activación constitutiva de NF-κB induce un bloqueo en fenotipos aberrantes. A) Simulación del modelo semi-continua de redes eBCR mutantes para NF-κB, incluida la inhibición completa (NFκB = 0) y dos niveles de activación constitutiva (OA, sobreactivación: NFκB = 1, e int, activación intermedia: NFκB = 0.5). B y D) Nodos representativos en la simulación de la red NFκB OA y NFκB int, respectivamente, representados de manera individual para comparar su estado de activación a lo largo de la simulación de ambas redes. La gráfica representa el estado de activación durante las simulaciones realizadas por 100 iteraciones. C) La inducción de un valor intermedio de NF-κB en diferentes etapas de desarrollo deriva en atractores diferentes, en algunos casos llegan al atractor final de célula B inmadura (Imm B), y en otros la simulación culmina en un fenotipo aberrante tipo pre-B..... 51

Figura 10. Potenciales MiRNAs ligandos de TLR8 sobreexpresados en distintos tipos de cáncer. Los miRNAs fueron identificados a través del análisis bioinformático de un conjunto de datos de la plataforma dbDEMC 2.0. Se identificaron los miRNAs sobreexpresados con motivo GU entre las posiciones 18 y 21 (MiRNAs_{GU(18-21)})..... 53

Figura 11. Potenciales MiRNAs ligandos de TLR8 sobreexpresados en LLA. Identificación de miRNAs_{GU(18-21)} en LLA pediátrica, a partir del análisis de dos bases publicadas en GEO (GSE56489 y GSE23024_GPL10708)..... 54

Figura 12. Modelo final: La activación de NF-κB puede inducir la generación de una población de precursores aberrantes que podrían estar compitiendo con la hemotapoyesis normal en los nichos de la MO. A) Las perturbaciones de red afectan el paisaje epigenético y pueden derivar en la generación de atractores aberrantes. La generación de atractores aberrantes depende del tipo de

perturbación y la etapa en la que se induce la perturbación de la red. B) La producción de células hematopoyéticas normales y malignas se origina a partir de progenitores similares, sin embargo, la población maligna inducida por una señal proinflamatoria se detiene en una etapa progenitora y muestra una transición diferente a través de los nichos de la MO. La afinidad de la población aberrante a nichos particulares, sugerido por la expresión de moléculas involucradas en los ejes de comunicación del microambiente, puede representar una ventaja ecológica para el reemplazo progresivo de la hematopoyesis normal observada en tumores malignos leucémicos..... 58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de tres tipos de modelos matemáticos..... 27

Tabla 2. Reglas lógicas propuestas para la simulación Booleana de la red eBCR. Las reglas lógicas de los componentes reducidos (gris) fueron introducidas directamente en las reglas lógicas de sus nodos blanco. Los operadores Booleanos están representados con los símbolos & (AND), | (OR) and ! (NOT)..... 42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Justificación bibliográfica para las interacciones que conforman la red eBCR y las correspondientes reglas Booleanas. Los operadores Booleanos se encuentran representados por los símbolos & (AND), | (OR) y ! (NOT)..... 69

Anexo 2. Tabla complementaria de la Figura 8B con la comparación entre los atractores obtenidos de las simulaciones de redes mutantes y los reportes experimentales de inhibición y expresión constitutiva. El código de colores de la primera columna corresponde a los bloques representados del lado izquierdo del mapa de calor presentado en la Figura 8B. Tomada de la Información Suplementaria de Enciso et al. 2020 (Artículo en inglés) 91

Anexo 3. Análisis in silico de unión de miRNAs a TLR8 103

Anexo 4. Publicaciones realizadas durante los estudios e investigación de doctorado 104

ABREVIATURAS

AGM	Aorta-gónada-mesonefros
ATM	Ataxia telangiectasia mutado
BCR	Receptor de células B
CAR	Célula reticular altamente secretora de CXCL12 (<i>'CXCL12 abundant reticular'</i>)
CLP	Progenitor común linfoide (<i>"common lymphoid progenitor"</i>)
CMP	Progenitor común mieloide (<i>"common myeloid progenitor"</i>)
DC	Células dendríticas
eBCR	Regulación temprana de células B (<i>"early B cell regulation / early B cell regulatory"</i>)
ELP	Progenitores linfoides tempranos (<i>"early lymphoid progenitor"</i>)
GC	Centro germinal (<i>"germinal center"</i>)
GMP	Progenitor de granulocitos y monocitos (<i>"granulocyte-monocyte progenitor"</i>)
HIF	Factor inducido por hipoxia (<i>'hypoxia induced factor'</i>)
HPC	Célula progenitora hematopoyética (<i>'hematopoietic progenitor cell'</i>)
HSC	Célula troncal hematopoyética (<i>'hematopoietic stem cell'</i>)
HSPC	Células troncales y progenitoras hematopoyéticas (<i>'hematopoietic stem and progenitor cells'</i>)
KO	Bloqueo o inhibición (<i>"Knock-out"</i>)
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B
LMPP	Progenitor multipotencial predisuesto al linaje linfoide (<i>"lymphoid-primed multipotent progenitor"</i>)
MC	Célula de memoria (<i>"memory cell"</i>)
MDP	Células progenitoras de macrófagos y células dendríticas (<i>'macrophage and dendritic cell progenitors'</i>)
MEP	Células progenitoras de eritrocitos y megacariocitos (<i>'megakaryocyte-erythroid progenitors'</i>)
MLP	Células progenitoras multilinfoides (<i>'multilymphoid progenitors'</i>)
MO	Médula ósea
MPP	Células progenitoras multipotenciales (<i>'multipotential progenitors'</i>)
MSC	Célula estromal mesenquimal (<i>'mesenchymal stromal cell'</i>)
OA	Sobreactivación o inducción de activación constitutiva (<i>"overactivation"</i>)
ODE	Ecuaciones diferenciales ordinarias

PBCN	Redes Booleanas probabilísticas (<i>"probabilistic Boolean control networks"</i>)
PC	Célula plasmática (<i>"plasmatic cell"</i>)
pc	Post-concepción
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
TCR	Receptor de célula T (<i>"T cell receptor"</i>)
T-LGL	Leucemia de linfocitos granulares grandes de células T
VCAM	Molécula de adhesión vascular (<i>"vascular cell adhesion molecule"</i>)
VLA	Antígeno de activación tardía (<i>"very late antigen"</i>)

RESUMEN

Antecedentes. La inhibición o bloqueo del desarrollo de los linfocitos B dentro de la médula ósea está estrechamente asociada con numerosas enfermedades hematopoyéticas e inmunológicas, como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), en la que la interrupción de las redes reguladoras impide el reabastecimiento continuo de células B funcionales. Los modelos computacionales dinámicos pueden ser fundamentales para la comprensión integral de los mecanismos que subyacen a los complejos procesos de diferenciación en la salud y la enfermedad.

Métodos. Mediante la reconstrucción de una red reguladora de tres módulos que incluye la transcripción genética, la transducción intracelular y la comunicación con el microambiente, hemos simulado la etapa temprana de diferenciación de las células del linaje B linfoide, en contextos microambientales y genéticos, normales y patológicos. La red de diferenciación fue simulada como un modelo Booleano y luego transformada, usando lógica difusa, en un modelo continuo. Simulamos escenarios de mutantes nulos y sobreexpresión de los componentes moleculares que integran la red propuesta, para analizar el comportamiento emergente de la regulación de la linfopoyesis temprana de células B. Debido a su importancia en la inflamación, investigamos el efecto de la inducción de NF- κ B en diferentes etapas tempranas de diferenciación de las células B. Además, hicimos un análisis bioinformático de bases de expresión de miRNAs en células hematopoyéticas sanas y leucémicas para identificar miRNAs sobreexpresados en leucemia con secuencias características de ligandos de TLR8 con potencial de actuar como inductores de un microambiente pro-inflamatorio en la médula ósea.

Resultados. Las simulaciones síncronas y asíncronas de la red discreta de diferenciación temprana de células B, reprodujeron las configuraciones de expresión característica de los progenitores hematopoyéticos y de los primeros precursores de los linfocitos B. En la simulación del modelo continuo emergió un perfil IL-7R+ transitorio entre los atractores ProB a Pre-B, con expresión de pre-BCR y una serie de factores transcripcionales predominantemente de células B. Esta población celular expresa un nivel alto de CXCR7 y una expresión reducida de CXCR4 y FoxO1. Sorprendentemente, la señalización constante pero intermedia de NF- κ B en etapas específicas de la diferenciación de células B permitió la estabilización de un fenotipo aberrante CXCR7+ pre-B con aparente afinidad a las señales proliferativas (Flt3+). Nuestros modelos mutantes revelaron un retraso en el ensamblaje del BCR tras la activación de NF- κ B, concomitante a una señalización Flt3 sostenida, una regulación a la baja de la transcripción de los genes Ebf1, Irf4 y Pax5, y una reducción

de la recombinación de Ig, lo que apunta a un posible bloqueo del compromiso de linaje como se observa en las patologías linfoproliferativas. Como moléculas candidatas para el inducción pro-inflamatoria en LLA, identificamos tres miRNAs sobreexpresados en muestras pediátricas de médula ósea leucémica, con motivos que podrían unirse y activar la señalización por TLR8: miR-146a-5p, miR-181b-5p y miR-199b-3p.

Discusión. Por primera vez, un precursor inducible de células B CXCR7^h dotado de la capacidad potencial de desplazarse a través de nichos linfoides en la médula ósea, ha sido inferido mediante modelado computacional. Su fenotipo es compatible con el de las células que inician la leucemia y podría ser la base para explicar la inflamación asociada a malignidades con bloqueo linfoide y una amplia gama de enfermedades inmunológicas. Además de la alteración en la diferenciación, los fenotipos inducidos por inflamación abren la posibilidad de la formación de nuevos nichos colonizados por el precursor aberrante. Así pues, se predicen ecosistemas de médula ósea emergentes tras una inducción pro-inflamatoria, que puede dar lugar a una inestabilidad hematopoyética asociada a patologías de bloqueo de diferenciación.

ABSTRACT

Background. The blockage at the early B lymphoid cell development pathway within the bone marrow is tightly associated with hematopoietic and immune diseases, where the disruption of basal regulatory networks prevents the continuous replenishment of functional B cells. Dynamic computational models may be instrumental for the comprehensive understanding of mechanisms underlying complex differentiation processes in health and disease, like acute lymphoblastic leukemia (ALL).

Methods. By reconstructing a three-module regulatory network including genetic transcription, intracellular transduction, and microenvironment communication, we have investigated the early B lineage cell fate decisions in normal and pathological microenvironmental settings. The early B cell differentiation network was simulated as a Boolean model and then transformed, using fuzzy logic, to a continuous model. We tested null and overexpression mutants to analyze the emergent behavior of the network. Due to its importance in inflammation, we investigated the effect of NF- κ B induction at different early B cell differentiation stages. Additionally, we made a bioinformatic analysis of databases containing miRNAs expression of healthy and leukemic hematopoietic cells, to identify miRNAs overexpressed in leukemia with nucleotidic sequences characteristic of TLR8 ligands with potential to induce a pro-inflammatory microenvironment in the bone marrow.

Results. The exhaustive synchronous and asynchronous simulation of the early B cell discrete regulatory network reproduced the configurations of the hematopoietic progenitors and early B lymphoid precursors of the pathway. Its simulation as a continuous model suggested a transient IL-7R+ ProB-to-Pre-B subset expressing pre-BCR and a series of dominant B-cell transcriptional factors. This conspicuous differentiating cell population up-regulated CXCR7 and reduced CXCR4 and FoxO1 expression levels. Strikingly, constant but intermediate NF- κ B signaling at specific B cell differentiation stages allowed stabilization of an aberrant CXCR7+ pre-B *like* phenotype with apparent affinity to proliferative signals (Flt3+). Our mutant models revealed an abnormal delay in the BCR assembly upon NF- κ B activation, concomitant to sustained Flt3 signaling, down regulation of Ebf1, Irf4 and Pax5 genes transcription, and reduced Ig recombination, pointing to a potential lineage commitment blockage as seen in lymphoproliferative pathologies. As candidate molecules for pro-inflammatory induction in ALL we identified three overexpressed miRNAs in pediatric leukemic bone marrow samples, with motifs that might bind and activate TLR8 signaling: miR-146a-5p, miR-181b-5p y miR-199b-3p.

Discussion. For the first time, an inducible CXCR7^{hi} B cell precursor endowed with the potential capability of shifting central lymphoid niches, is inferred by computational modeling. Its phenotype is compatible with that of leukemia-initiating cells and might be the foundation that bridges inflammation with blockage-related malignancies and a wide range of immunological diseases. Besides the predicted differentiation impairment, inflammation-inducible phenotypes open the possibility of newly formed niches colonized by the reported precursor. Thus, emergent bone marrow ecosystems are predicted following a pro-inflammatory induction, that may lead to hematopoietic instability associated to blockage pathologies.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de las células maduras que conforman el tejido sanguíneo a lo largo de la vida adulta tiene su origen en una escasa población de células troncales hematopoyéticas (HSC). El mantenimiento de la población de HSC es dependiente de señales del microambiente de la médula ósea (MO) conformado por distintos tipos celulares, factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y múltiples componentes de matriz extracelular (Boulais & Frenette 2015; Pelayo et al., 2012; Purizaca, Meza & Pelayo 2012; Sugiyama & Nagasawa 2012). Este microambiente forma nichos especializados que óptimamente balancean las señales de proliferación, diferenciación y migración de las HSC (Purizaca et al., 2012; Sugiyama & Nagasawa 2012). A su vez, dichos nichos son regulados tanto por las células hematopoyéticas en la MO, como por señales extramedulares responsables de incrementar y/o redirigir la hematopoyesis en respuesta a situaciones de emergencia, como infecciones o hemorragias (Schürch, Riether & Ochsenein 2014; Zhao et al., 2014; Dorantes-Acosta et al., 2013). En concordancia, la alteración del microambiente ha sido sugerida como un factor sinérgico para el mantenimiento, progresión e incluso iniciador de distintas patologías hematológicas, entre ellas la leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Ayala et al., 2009; Raaijmakers 2011; MacLean, Lo Celso & Stumpf 2013; Burger & Kipps 2006; Purizaca et al., 2013; Kode et al., 2014; Raaijmakers 2010).

La LLA es la principal causa de mortalidad infantil por cáncer en el mundo. De manera general, las leucemias agudas se caracterizan por la proliferación descontrolada de células precursoras hematopoyéticas arrestadas en estadios de la vía de diferenciación linfoide, provocando su acumulación en la MO (Curado et al., 2011). En línea con las tendencias a nivel mundial, del total de casos de leucemia aguda en pacientes pediátricos en México, aproximadamente el 20% representa leucemias de tipo mielóide y el 80% de tipo linfoide. Del 80% de LLA, el 70% corresponde a leucemia de precursores de linfocitos B, frecuencia que disminuye de manera inversamente proporcional a la edad de incidencia de leucemia (Pérez-Saldivar et al., 2011; Yokota & Kanakura 2016). A pesar de las numerosas investigaciones en torno a la LLA, poco se conoce sobre su etiología y la progresión maligna. Sin embargo, se han identificado numerosas aberraciones genéticas, tales como aneuploidías, rearrreglos cromosomales, patrones transcripcionales anormales y factores epigenéticos que pueden influir en el desarrollo de precursores malignos o células iniciadoras de la leucemia. Algunas de las alteraciones genéticas de mayor frecuencia en la LLA pediátrica son las hiperdiploidías, y las traslocaciones TEL-AML1 t(12;21) y E2A-PBX t(1;19) (Campana & Pui 2008). Por otro lado, la presencia de anomalías genéticas como traslocaciones TEL-

AML1, no sólo han sido identificadas en precursores linfoides, sino también en su contraparte mesenquimal (Shalapour et al. 2010).

De particular importancia para comprender el proceso leucémico, es la coexistencia de las poblaciones celulares leucémicas en la MO, con células hematopoyéticas primitivas normales. Es en parte por esta coexistencia que los pacientes tienen números limitados de células funcionales maduras. La población celular normal es reemplazada progresivamente a través de mecanismos que podrían ser promovidos por una competencia por factores de crecimiento y señales extracelulares provistas por células estromales, así como la transición de un microambiente normal hacia un microambiente de selección positiva para la población leucémica (Purizaca et al., 2012; Ayala et al., 2009; Colmone et al., 2008; Kim et al., 2015; Lim et al., 2016). Algunas de las alteraciones microambientales identificadas en aspirados de MO de un grupo de pacientes leucémicos incluyen el incremento en la expresión de citocinas y factores pro-inflamatorios como IL-1 β , IL-12, G-CSF, GM-CSF y TNF α (Vilchis-Ordoñez et al., 2015). Su secreción por los blastos leucémicos en condiciones *in vitro* ha sido previamente documentada por nuestro laboratorio, concomitante a una disminución en la expresión de moléculas de comunicación entre células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) y células estromales mesenquimales (MSC), como CXCR4, CXCL12 y Cx43. En conjunto, la heterogeneidad de alteraciones tanto en los blastos leucémicos, como en el componente microambiental, complican el entendimiento del estudio de la LLA. Particularmente porque la progresión maligna es aparentemente dependiente tanto del componente linfoide leucémico, como del microambiental.

Desafortunadamente, la investigación de la dinámica y competencia poblacional en la LLA se encuentra crucialmente limitada tanto por la imposibilidad de tomas rutinarias de muestras de MO para el seguimiento a la progresión de la enfermedad antes de su debut o recaída, como por la ausencia de marcadores moleculares para la distinción de poblaciones primitivas normales y leucémicas. Por tanto, el desarrollo de modelos matemáticos y su simulación computacional podrían proveernos de una estrategia corroborativa y predictiva para escenarios de progresión y mantenimiento leucémico, o para el restablecimiento de la hematopoyesis normal.

I.1 Sistema hematopoyético

La hematopoyesis es el proceso de diferenciación a través del cual se mantiene el continuo re-abastecimiento del tejido sanguíneo a lo largo de la vida. Dependiendo de la célula progenitora que les da origen, las células hematopoyéticas son clasificadas en linajes linfoide y mieloide; de acuerdo a

su participación durante la respuesta inmunológica pueden ser clasificadas en células de respuesta innata o adaptativa; y a su vez, las células inmunológicas adaptativas se clasificadas en células de respuesta celular o humoral (Figura 1).

Desde la identificación y caracterización de las HSC, la diferenciación hematopoyética ha sido identificada como un proceso jerárquico en cuyo punto más alto se encuentran las HSC, caracterizadas por su capacidad de autorenovación y pluripotencialidad (Jordan & Lemischka 1990; Kamel-Reid & Dick 1988). Como en cualquier otro tipo de tejido, la frecuencia de células troncales en la MO, sitio en donde se alberga la mayor población durante la vida adulta, es muy baja en comparación con las células en estadios más avanzados de la diferenciación. La mayoría de estas células se mantienen en un estado de quiescencia o arresto en la fase G_0 del ciclo celular, resultando en la protección de la escasa población de HSCs. Durante el estado de quiescencia, la células presenta una baja tasa de división celular y actividad metabólica que se traduce en una disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno y metabolitos celulares que podrían derivar en un agotamiento por estrés oxidativo de la reserva de HSC (Grosselin et al., 2012).

Recientemente, gracias a la innovación tecnológica y analítica que ha permitido estudiar a las poblaciones a un nivel de célula única, se ha sugerido que la hematopoyesis corresponde a un proceso holocrático. La holocracia hematopoyética está fundamentada en la identificación de subpoblaciones altamente dinámicas de HSC comprometidas a linajes específicos. La dinamicidad de estas células con potencial de auto-renovación es dependiente de las interacciones entre ellas, con otras células hematopoyéticas en diferenciación, y con células estromales (Yokota 2019).

El equilibrio entre el mantenimiento, expansión y diferenciación de la población troncal se debe a una compleja regulación mediada por señales bioquímicas, principalmente accesibles en el microambiente y producidas tanto por células hematopoyéticas como por células no hematopoyéticas, que en conjunto conforman estructuras tridimensionales complejas denominadas nichos. Las señales microambientales, características entre nichos hematopoyéticos, actúan activando o inhibiendo programas de determinación de linaje, supervivencia, apoptosis, proliferación y migración en las HSPC. La dependencia de los nichos es un fenómeno que se observa desde las etapas embrionarias hasta la vida adulta. Todos los procesos involucrados en la generación de células hematopoyéticas incluyendo la proporción de células de cada linaje, su adecuada diferenciación y su localización, responden a la constitución dinámica de los nichos en los cuales residen. Dependiendo de la etapa del ser humano y de su estado de salud, las HSPC pueden

relocalizarse en diferentes nichos dentro del mismo, órgano o migrar y establecerse en órganos distantes.

I.1.1 Ontogenia de la hematopoyesis

Durante el desarrollo embrionario de mamíferos vertebrados, las primeras células hematopoyéticas embrionarias emergen en el tejido mesodérmico de una estructura denominada hemangioblasto, precursor común de células hematopoyéticas y células endoteliales que dan origen al proceso de vascularización. Conforme progresa el desarrollo fetal, las HSPC se movilizan a través de diferentes estructuras embrionarias. Se han identificado tres estructuras o focos iniciales de producción hematopoyética durante el desarrollo embrionario: el saco vitelino, el área periférica a la aorta dorsal denominada aorta-gónada-mesonefros (AGM) y la placenta (Ivanovs et al., 2017).

En el saco vitelino ocurre la primer ola de producción hematopoyética, también conocida como hematopoyesis primitiva. Esta etapa se caracteriza por la producción de células eritroides, y una baja cantidad de macrófagos y megacariocitos primitivos (Orkin & Zon 2008). Los eritrocitos primitivos expresan hemoglobina embrionaria, una proteína globular con estructura cuaternaria constituida por dos cadenas de globina zeta y dos de globina epsilon. En humanos, alrededor del día 21 post-concepción (pc), inician las contracciones cardiacas y la circulación sanguínea, lo que da lugar a la migración de progenitores eritro-mieloides definitivos desde el saco vitelino hacia el hígado fetal, en donde se producen macrófagos que colonizarán el hígado adulto (células de Kupffer), el cerebro (microglía), la epidermis (células de Langerhans) y los pulmones (macrófagos alveolares). Los eritrocitos producidos durante el segundo trimestre de gestación, expresan mayoritariamente hemoglobina con dos cadenas de globina alpha y dos cadenas de globina gamma. El reemplazo de cadenas gamma por subunidades beta ocurre progresivamente para dar lugar a la hemoglobina adulta, la forma predominante al momento del nacimiento.

Concomitante a la hematopoyesis del saco vitelino y la migración de precursores al hígado fetal, alrededor del día 27 pc, emergen en la AGM grupos celulares o *clusters* hematopoyéticos intra-aórticos en donde se generan las primeras HSC definitivas, las cuales se desplazan y desaparecen completamente de ese sitio entre los días 39 y 42 pc. Tanto en el saco vitelino como en la AGM, en los inicios del establecimiento de la hematopoyesis definitiva o adulta, se producen los primeros progenitores linfoides B y T. Entre la semana 5 y 9 pc, una segunda ola de producción de HSC tiene lugar en la placenta (Ivanovs et al., 2017). Posterior al desarrollo de la vasculatura, las HSPC migran

al hígado, y alrededor del día 56 pc, cuando la osificación y la invasión vascular del hueso cartilaginoso se encuentran en estados avanzados, la MO es colonizada por las células hematopoyéticas, inicialmente por monocitos y macrófagos, y posteriormente por el resto de HSPC (Ivanovs et al., 2017).

La MO es el órgano en el cual se albergan a las HSC y se regula la producción de las células que componen el tejido sanguíneo durante la vida adulta. Sin embargo, bajo circunstancias específicas y/o patológicas las HSPC pueden migrar y diferenciarse en sitios extramedulares como un proceso compensatorio a la insuficiente producción celular en la MO. Este proceso se conoce como hematopoyesis extramedular y ocurre principalmente en bazo, ganglios linfáticos e hígado, en pacientes con anemia crónica, neoplasmas mieloproliferativos, linfomas, algunos tipos de leucemia, entre otras patologías (Kim 2010).

I.1.2 Hematopoyesis adulta y nichos hematopoyéticos

Las HSC en la MO, dan origen a los progenitores multipotenciales (MPP), los cuales han perdido la capacidad de autorenovación y por lo tanto, la capacidad de reconstituir el sistema hematopoyético a largo plazo (Acevedo Fernández et al., 2011). Los MPP tienen la capacidad de diferenciarse a progenitores mieloides comunes (CMP) o a progenitoras multipotentes predispuestas a linaje linfóide (LMPP). Los CMP se diferencian a células del linaje mielóide, dando lugar a los progenitores eritroides y megacariocíticos (MEP), progenitores de granulocitos y monocitos (GMP), y progenitores de macrófagos y células dendríticas (MDP). Por el otro lado, los LMPP marcan el inicio de la diferenciación linfóide dando lugar a la población de progenitores multilinfoides (MLP) que a su vez, tienen la capacidad de diferenciarse a progenitores linfoides comunes (CLP) precursores de células T, progenitores de células B y NK (B/NK), y también producen un tipo de MDPs (Chotinantakul, K. & Leeansaksiri 2012). En conjunto, los CMP, MEP, GMP, MDP y B/NK conforman el compartimento de las células oligopotentes, las cuales producirán células precursoras comprometidas a linaje, unipotenciales y con alta capacidad proliferativa (Acevedo Fernández et al., 2011).

Las células maduras generadas a partir de los precursores mieloides comprenden a los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos, megacariocitos, células cebadas y células dendríticas (DC). Las células maduras linfoides, incluyen a los linfocitos T, linfocitos B y células NK. Todas las células, exceptuando a los linfocitos T y B, salen a la sangre periférica como fenotipos maduros, a través de los vasos sanguíneos que irrigan la MO. La

maduración de los linfocitos T y B requiere de la migración de células aún inmaduras, al timo y el bazo, respectivamente (Acevedo Fernández et al., 2011).

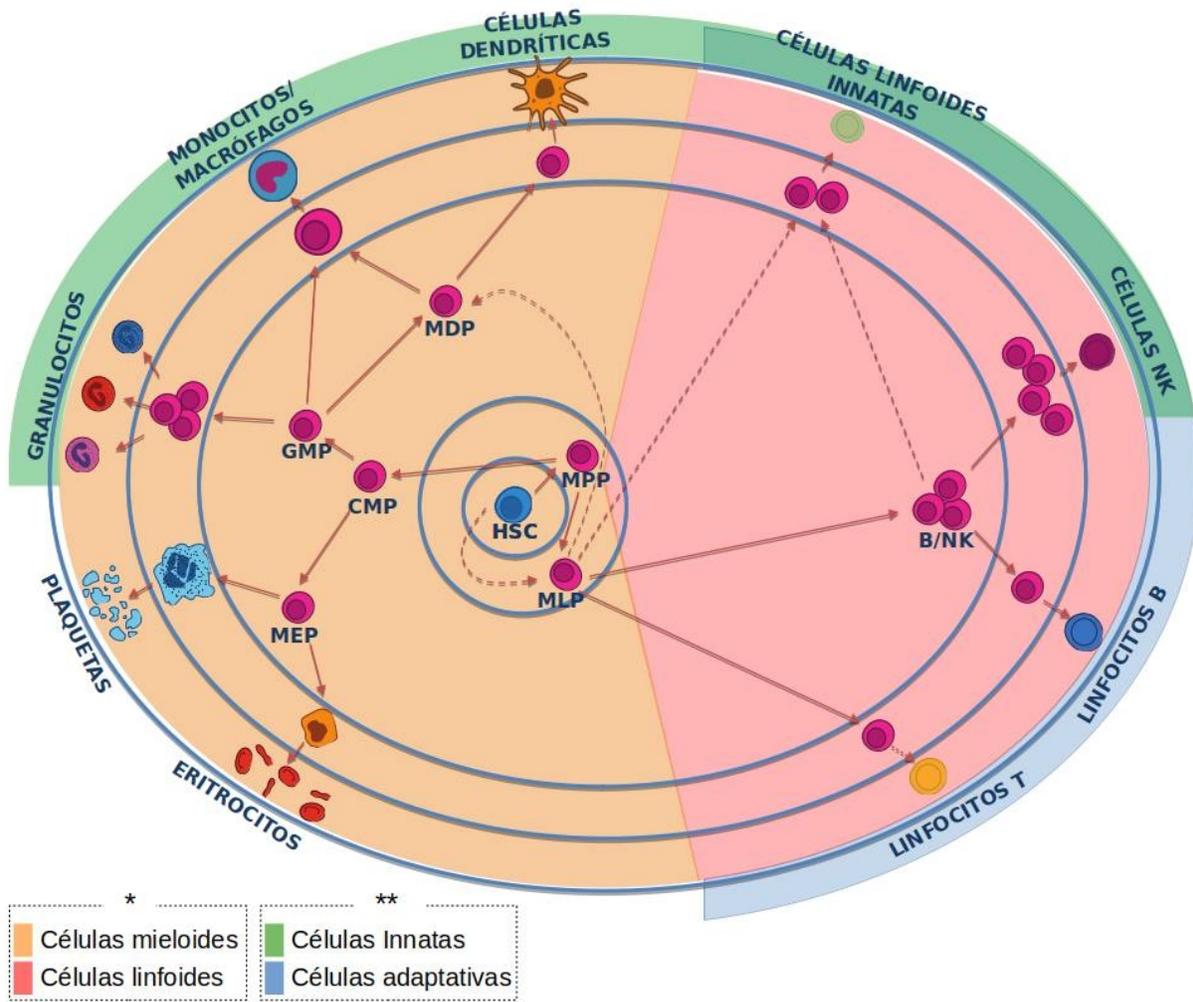


Figura 1. Clasificación de células hematopoyéticas. La hematopoyesis es un proceso que involucra una serie de “decisiones de linaje”. Puede visualizarse como un proceso radial con su origen en la población de células troncales, las cuales en respuesta a los factores microambientales diferencian a uno u otro linaje celular. *Clasificación de acuerdo al progenitor común: células de linaje mieloide y linfoide. ** Clasificación de acuerdo a la fase de la respuesta inmunológica en la que participan: células de la respuesta innata o adaptativa. (Modificado de Balandrán et al., 2017).

La hematopoyesis se encuentra regulada por factores intrínsecos y extrínsecos provistos por el microambiente hematopoyético en la MO y señales extramedulares que comunican la demanda celular del organismo. El microambiente de la MO está conformado por estructuras tridimensionales complejas denominadas nichos hematopoyéticos (Blank, Karlsson & Karlsson 2008; Zhang & Li 2008; Ehninger & Trumpp 2011). El microambiente en los nichos comprende factores de crecimiento,

citocinas, quimiocinas y componentes de matriz extracelular secretados por distintos tipos celulares presentes en la MO, dando lugar a los compartimentos o nichos, los cuales también se definen por su localización (Figura 2). Se ha observado que las HSPC expresan distintos inmunofenotipos dependiendo del compartimento medular en el cual se encuentren confinadas, diferencias que se han asociado a la composición específica de cada nicho incluyendo, además de los factores de crecimiento, citocinas e interleucinas, otros componentes como la tensión de oxígeno (Jing et al., 2012). Regiones de bajos niveles de oxígeno en la MO, han sido asociados a la modulación de la quiescencia de la población más primitiva de células hematopoyéticas manteniéndolas en un estado de bajo estrés oxidativo para preservar la integridad del material genético, proteínas y lípidos en la célula (Ehninger & Trumpp 2011; Takubo 2011; Tsai et al., 2011).

La baja concentración de oxígeno influye también en las células no hematopoyéticas que integran los nichos de la MO. Por ejemplo, el bajo nivel de oxígeno inhibe la degradación del factor inducido por hipoxia-1 α (HIF-1) en MSCs. HIF-1 es un regulador de la transcripción de numerosos genes entre los cuales se encuentran los codificantes para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de células troncales (SCF) y CXCL12 (Keith, Johnson & Simon 2012; Ben-Shoshan et al., 2008; Han et al., 2008; Hitchon et al., 2002). Además, la hipoxia promueve la diferenciación de las MSC a osteoblastos y adipocitos, componentes celulares de los nichos hematopoyéticos (Wagegg et al., 2012).

Tomando en cuenta la localización medular y la conformación celular, se han identificado tres nichos en la MO que determinan el destino celular hematopoyético (Purizaca, Meza & Pelayo 2012; Sugiyama & Nagasawa 2012):

- El nicho endosteal es reconocido por su localización en la parte interna del hueso medular recubierto principalmente por osteoblastos y osteoclastos, responsables de la resorción ósea.
- El nicho vascular, que como su nombre indica, se encuentra integrado por las células endoteliales que conforman los sinusoides que irrigan la MO.
- El nicho mesenquimal, que representa la mayor parte de la MO y está compuesto por distintas subpoblaciones de MSC.

A pesar de que por simplicidad se clasifican en estos tres grupos, la estructura de la MO es bastante compleja y las transiciones celulares ocurren a través de gradientes bioquímicos y no a través de compartimentos definidos. Además, en la MO se establecen asas de retroalimentación bioquímica entre las células hematopoyéticas y las células estromales, con la finalidad de regular los

proceso celulares (i.e. diferenciación, proliferación, secreción de factores solubles, migración, apoptosis) de las diferentes poblaciones que integran los nichos hematopoyéticos.

De los procesos de regulación en la MO, se han estudiado con mayor detalle los mecanismos de regulación de las células hematopoyéticas, mediados por factores expresados por su contraparte estromal. Sin embargo, las células hematopoyéticas progenitoras y diferenciadas en la MO, también influyen en los procesos de diferenciación de las células estromales. Por ejemplo, se ha observado que el incremento en la concentración de megacariocitos incrementa la proliferación de los osteoblastos, derivando en el incremento del volumen óseo (Kacena et al., 2004).

La retroalimentación en la MO entre células hematopoyéticas y no hematopoyéticas es altamente dinámica y se lleva a cabo a través de distintos mecanismos de comunicación, incluyendo mecanismos mediados por moléculas de contacto intercelular (i.e. uniones gap, integrinas, adhesinas), secreción de componentes de matriz extracelular o factores solubles (i.e. citocinas interleucinas, quimiocinas, encimas), transferencia de moléculas a través de vesículas (i.e. proteínas, ROS, miRNAs, mitocondrias), entre otros (Figura 2). Estos procesos de comunicación también juegan un rol importante en el desarrollo y evolución de patologías hematológicas, promoviendo la proliferación de células aberrantes y/o inhibiendo la hematopoyesis normal (Enciso, Balandrán & Pelayo 2018).

Algunas situaciones en las que se ha identificado un rol determinante del microambiente en la evolución patológica de la hematopoyesis, incluyen:

- Envejecimiento y obesidad: producción deficiente de células B derivada de un microambiente adipogénico en la MO con una alta concentración de quimiocinas y factores de crecimiento pro-mielocíticos (Riley 2013).
- Sepsis: la inflamación aguda por sepsis induce la disminución de osteoblastos en la MO, afectando el tamaño de la población de CLP por la disminución de la concentración de IL-7 (Terashima et al., 2016).
- Hematopoyesis de emergencia: durante la producción de células hematopoyéticas en respuesta a algunos patógenos, los linfocitos T CD8 activados inducen la producción de IL-6 por las MSC en la MO promoviendo la producción de células inatas efectoras como monocitos y DC, e inhibiendo la linfopoyesis (Nagai et al., 2006; Welner & Kincade 2014).
- Leucemia: las MSC en la MO leucémica modifican su patrón de secreción derivando en el establecimiento de un microambiente favorable para el mantenimiento de la leucemia e

incompatible para la hematopoyesis normal (Ayala et al., 2009; Colmone et al., 2008; Vilchis-Ordoñez et al., 2015; Balandrán et al 2016).

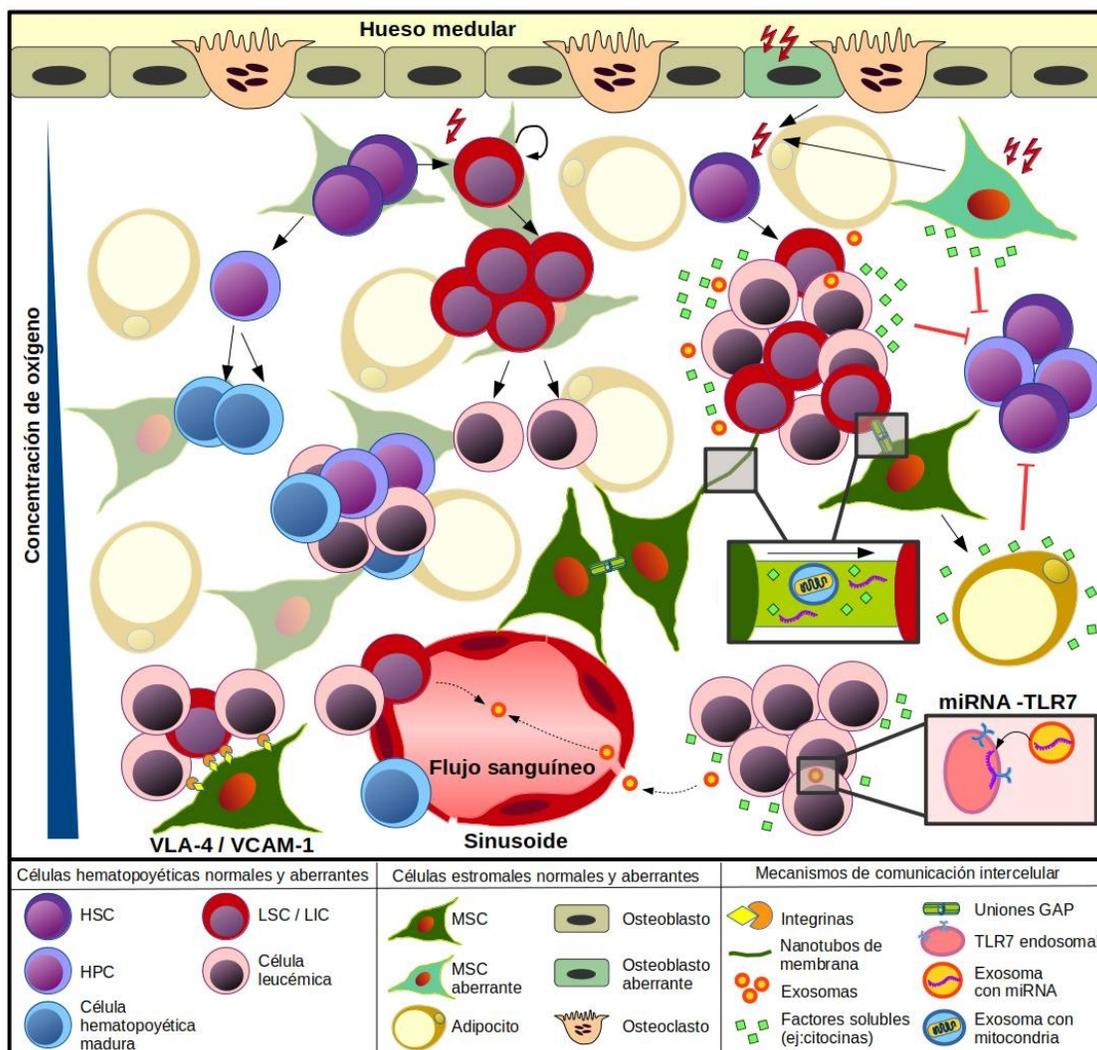


Figura 2. Componentes del microambiente hematopoyético. La diferenciación hematopoyética ocurre en nichos integrados por células estromales que incluyen: osteoblastos, osteoclastos, adipocitos, células mesenquimales y células endoteliales de los sinusoides, a través de los cuales ocurre la comunicación con el resto del cuerpo. Las células estromales producen moléculas de matriz extracelular, quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento que constituyen el microambiente hematopoyético. Los elementos producidos tanto por las células hematopoyéticas como por las células estromales integran una red de comunicación que regula los procesos celulares en la MO. Estas vías de comunicación tienen una participación importante en procesos aberrantes como la leucemia. En la leucemia la población aberrante (células troncales e iniciadoras de la leucemia, LSC / LIC y células leucémicas) también es responsiva a las señales microambientales, y a su vez produce factores capaces de remodelar el microambiente medular afectando la producción de células hematopoyéticas sanas. (Modificado de Enciso et al., 2018)

I.1.2.1 Linfopoyesis: Regulación genética y microambiental

A medida que se descifra la red transcripcional que subyace a la diferenciación hematopoyética, se descubren nuevas subpoblaciones de células intermedias o transitorias. Respecto a la trayectoria de diferenciación linfoide, actualmente se sabe que los LMPP dan lugar a una mezcla de progenitores mieloides y linfoides restringidos entre ellos los MLP. Los MLP, cuyo equivalente celular en ratón es el progenitor linfoide común, son células con bajo potencial mieloides que tienen la capacidad de generar todo tipo de linfocitos adaptativos e innatos, y algunas categorías de DC (Galy et al., 1995; Fathman et al., 2011; Welner, Pelayo & Kincade 2008; Inlay et al., 2009; Welner et al., 2007; Welner et al 2008). La población de progenitores linfoides se divide en progenitores de todos los linfocitos (ALP) y progenitores restringidos de linfocitos B (BLP) que generan predominantemente precursores de linfocitos T y B, respectivamente (Inlay et al., 2009).

Algunos progenitores ALP circulantes llegan al timo y migran através del endotelio para ingresar al órgano, en donde continúan el proceso de diferenciación y proliferación. Una vez dentro del timo, los ALP diferencian a progenitores tímicos tempranos (ETP), progresando a células conocidas con el nombre de doble negativas (DN) porque carecen de expresión membranal de las proteínas CD4 y CD8. Las células con el fenotipo doble negativo, transitan a través de 3 estadios (DN2, DN3 y DN4) durante los cuales ocurren los rearrreglos genéticos necesarios para la expresión de las cadenas que componen el receptor de las células T (TCR). En pasos subsecuentes, las células precursoras de linfocitos T adquieren un fenotipo doblemente positivo (DP) caracterizado por la co-expresión membranal de los receptores CD4 y CD8. Finalmente, las células regulan a la baja la expresión de alguno de los dos receptores para convertirse en linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺. Los linfocitos monopositivos migran del timo hacia la periferia como linfocitos T naïve (Zlotoff & Bhandoola 2011; Jouan et al., 2018). Las decisiones de linaje que ocurren dentro del timo, también se encuentran fuertemente influenciadas por factores del microambiente local, incluyendo la expresión de IL-7, ligandos de Notch y TGF- β (Jouan et al., 2018).

Los linfocitos B alcanzan una maduración parcial en la MO, siguiendo una serie de pasos de diferenciación secuenciales de BLP hacia prepro-B, pro-B, pre-B y finalmente, célula B inmadura. Durante las transiciones prepro-B/pro-B/pre-B se activa la expresión de las recombinasas Rag1 y Rag2 que dan lugar al reordenamiento de los genes V(D)J para la expresión de la cadena pesada de inmunoglobulinas (IgH), que deriva en la expresión del receptor de la célula pre-B (pre-BCR). La activación del pre-BCR, la cual se ha propuesto que es inducida por la interacción con componentes

de la matriz extracelular, activa la expansión clonal de células pre-B, seguida por un arresto del ciclo celular para favorecer una segunda ola de expresión de recombinasas Rag1 y Rag2 para el reordenamiento de la cadena ligera de inmunoglobulinas (IgL), marcando la transición de las células pre-B a las células B inmaduras, y de receptor pre-BCR a BCR (Inlay et al., 2009; Herzog, Reth & Jumaa 2009; Guo et al., 2018). Las células B inmaduras migran a órganos linfáticos secundarios, en donde se exponen a antígenos y señales de otras células inmunitarias, y diferencian a fenotipos con funciones más específicas.

La diferenciación temprana de las células B depende de la expresión funcional de factores de transcripción específicos, como Ikaros (IKZF1), PU.1, Forkhead Box O1 (FoxO1), el factor de células B tempranas (EBF1), las proteínas E2A y (PAX5), Aiolos (IKZF3) y el factor regulador del interferón 4 (IRF4), entre otros. Su expresión coordinada es fundamental para la diferenciación de las HSC hasta células B inmaduras. La modulación de muchos de los genes de diferenciación está influida por factores solubles del microambiente hematopoyético en la MO, como CXCL12, Flt3L, IL-7 y SCF. Estos factores han mostrado ser críticos en los estadios más tempranos de la linfopoyesis; así como el contacto de precursores de células B con células estromales mediante moléculas de adhesión como VLA-4 y VCAM-1 (Purizaca, Meza & Pelayo 2012; Tokoyoda, Egawa & Sugiyama 2004).

La citocina IL-7 se propuso originalmente como factor indispensable para la inducción de EBF1, la inducción de expansión clonal de células precursoras, y la recombinación de BCR en ratones (Kikuchi et al., 2008; Roessler et al., 2007), mientras que en humanos esta interdependencia parece ser menor (Welner, Pelayo & Kincade 2008). Sin embargo, investigaciones más recientes sobre células B humanas con mutaciones en IL-7R α han demostrado una reducción de la producción de inmunoglobulinas, lo que sugiere que la señalización de la IL-7 en los seres humanos podría compensarse con un eje molecular equivalente pero no completamente redundante, que permite la diferenciación celular en ausencia de una señalización óptima de la IL-7 (Welner, Pelayo & Kincade 2008; Nodland et al., 2011). Por otra parte, las poblaciones de HSC y CLP dependen en gran medida de CXCL12, una citoquina producida y secretada por las células estromales mesenquimales BM de tipo CAR (MSC-CAR) (Greenbaum et al., 2013). El CXCL12 participa en la localización, mantenimiento y retención de células hematopoyéticas primitivas en nichos de la MO, en parte mediante la regulación del eje de integrinas VLA-4/VCAM-1 (Peled et al., 2000; Glodek et al., 2003). El CXCL12, que se une al CXCR4 expresado en la superficie de las células hematopoyéticas, también se ha sugerido como un eje regulador crucial en las neoplasias de células B, como la

leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Perez-Saldivar et al., 2011; Tokoyoda, Egawa & Sugiyama 2004; Greenbaum et al., 2013; Sugiyama et al., 2006; Enciso et al., 2016; Balandrán et al., 2016).

Además de su clara dependencia de factores secretados como IL-7 y CXCL12, se ha sugerido que el desarrollo de las células B depende de la transición o migración de células en diferenciación a través de nichos de la MO. Inicialmente Tokoyoda y sus colegas, propusieron que dos nichos espacialmente excluyentes de células estromales productoras de CXCL12 e IL7, participan en la compartimentación y desincronización de los períodos de expansión/arresto celular de los precursores linfoides, para permitir la recombinación adecuada de los genes V(D)J para el ensamblaje del BCR (Tokoyoda, Egawa & Sugiyama 2004; Park et al., 2013; Clark et al., 2013). Sin embargo, datos recientes sugieren que las MSC que segregan IL-7 son también las mayores productoras de CXCL12, y que el cambio de señalización de IL-7/CXCL12 depende de la biodisponibilidad de IL-7 y de la regulación de CXCR4 (Cordeiro-Gomes et al., 2016; Fistonich et al., 2018; Zehentmeier & Pereira 2019).

I.1.2.2 Leucemia linfoblástica aguda

Como ya se sugiere en los párrafos anteriores, la producción de las células hematopoyéticas es un proceso altamente regulado. El desbalance de los factores reguladores puede dar lugar al desarrollo de patologías hematológicas, entre las cuales destaca el desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) que representa la primer causa de muerte infantil por cáncer en el mundo (Boulais & Frenette 2015; Pelayo et al., 2012; Purizaca, Meza & Pelayo 2012; Curado et al., 2011; Pui & Evans 2013).

La LLA se caracteriza por la proliferación descontrolada de progenitores linfoides arrestados en algún estadio de diferenciación, denominados blastos leucémicos. La LLA puede originarse en el compartimento de linfocitos B o T, pero alrededor del 80% de los casos de LLA tienen un inmunofenotipo de células B. Los blastos de las LLA-B suelen presentar un fenotipo de estadio pre-B, pro-B, o en casos minoritarios, un fenotipo de linaje mixto (pre-B/pro-B). La baja incidencia de leucemias mieloides, y alta incidencia de LLA en pacientes pediátricos se debe, en parte, a la naturaleza de los procesos hematopoyéticos a lo largo de la vida adulta. Las HSC de la MO humana van disminuyendo su capacidad de producir células linfoides con la edad (Kim et al., 2008, Riley 2018). En comparación con las HSC fetales, neonatales y de cordón umbilical, las HSC de adultos mayores son capaces de mantener la homeostasis de las células linfoides pero no son capaces de

reabastecer el sistema inmune con la misma velocidad y tienen una predominancia para la producción de células mieloides (Yokota & Kanakura 2016). Uno de los mecanismos sugeridos para este fenómeno que también se observa en procesos de inflamación crónica, es la remodelación del microambiente en la MO por la modificación en el patrón de secreción de las células estromales hacia el incremento de citocinas pro-mielocíticas como RANTES, una quimiocina que inhibe la expresión de factores de transcripción necesarios para la diferenciación linfóide (Riley 2013).

La etiología de la leucemia aún no ha sido esclarecida, sin embargo hay una larga lista de aberraciones citogenéticas identificadas en blastos leucémicos, destacando por su prevalencia la hiperdiploidía, la traslocación E2A-PBX1(1;19) y la traslocación TEL-AML1 t(12;21). La LLA implica un paradigma en el estudio del cáncer por dos características principales:

1. No ha sido posible identificar una población troncal cancerosa. En la LLA, células inmaduras con expresión de moléculas características de diferentes estadios de diferenciación de células B son capaces de reestablecer la leucemia al ser transplantados a una MO mieloabata y/o irradiada. Esta característica reta el modelo de jerarquía celular observado en la hematopoyesis normal y en otros tipos de cáncer en donde la capacidad de auto-renovación es una característica limitada a los compartimentos troncales. Incluso en la leucemia mieloide aguda ha sido posible identificar una población de células troncales leucémicas (Swaminathan et al., 2015; Lang et al., 2015; Enciso et al., 2018).
2. Las células de LLA y de otros cánceres con alta prevalencia en pacientes pediátricos (por ejemplo, osteosarcomas) tienen un número bajo de aberraciones citogenéticas en comparación con las células de otros tipos de cáncer, restando soporte a la hipótesis de acumulación de daño como explicación etiológica del cáncer (Vogelstein 2013).

En ausencia de la identificación de una población leucémica troncal en la LLA, se ha propuesto la existencia de células pre-leucémicas y células iniciadoras de la leucemia para explicar el inicio y progresión de la LLA. Una hipótesis sugiere que la adquisición de daño citogenético que da origen a una población celular pre-leucémica tiene lugar durante la embriogénesis. Las células pre-leucémicas podrían ser más susceptibles a la adquisición y acumulación de daños genéticos secundarios en etapas post-natales, con el potencial de transformarse en células iniciadoras de la leucemia. Esta hipótesis está soportada por evidencia en gemelos idénticos que comparten una mutación comúnmente expresada en células leucémicas. Esta mutación compartida es indicativa de un daño adquirido durante etapas pre-natales, sin embargo son los eventos post-natales los que determinan que un gemelo desarrolle leucemia y el otro no (Campana & Pui 2008; Lo-Coco et al., 2014).

A pesar de que no hay evidencia concluyente al respecto, se ha propuesto que los daños citogenéticos secundarios podrían deberse a la exposición del recién nacido a compuestos carcinógenos, radiación ionizante, administración de vitamina K, proximidad a campos electromagnéticos, entre otros (Lo-Coco et al., 2014; Eden 2010).

Por otro lado, existe también la hipótesis de “infección retardada” propuesta por Greaves, la cual considera que infecciones recurrentes en el recién nacido actúan como un factor inductor de modificaciones genéticas secundarias que pueden dar lugar a la transición de células pre-leucémicas a células iniciadoras de la leucemia (Greaves 2006; Greaves & Müschen 2015). En esta generación de daños secundarios inducidos por antígenos asociados a patógenos, se ha sugerido la participación sinérgica de las enzimas RAG y AID, responsables de los rearrreglos genéticos que dan lugar a la expresión del pre-BCR y BCR en las células B (Nagai et al., 2006).

Un factor importante a considerar para el estudio y entendimiento de la progresión leucémica es la convivencia en la MO de distintas clonas leucémicas con la población normal hematopoyética que, en un inicio, mantiene la producción de células sanas (Figura 3). Conforme progresa la leucemia, la producción de blastos desplaza a la producción normal hematopoyética. La heterogeneidad clonal leucémica es también responsable de una proporción de las recaídas entre los pacientes leucémicos, debido a la probable existencia de subpoblaciones leucémicas minoritarias resistentes a quimioterapia, las cuales podrían resguardarse en nichos hematopoyéticos quiescentes y emerger después de que la población leucémica sensible ha sido abatida durante los esquemas de quimioterapia y/o radioterapia.

La naturaleza de la competencia entre estas poblaciones celulares aún no es muy clara, sin embargo, las evidencias recopiladas de experimentos en modelos de ratón e *in vitro* sugieren que involucra una competencia por los recursos en la MO (por ejemplo, espacio, factores de crecimiento e interleucinas) y una remodelación del microambiente que favorece la producción de células leucémicas e induce la apoptosis, arresto y/o migración de las células progenitoras sanas (Purizaca, Meza & Pelayo 2012; Ayala et al., 2009; Colmone et al., 2008; Vilchis-Ordoñez et al., 2015; Balandrán et al 2016; Enciso, Mendoza & Pelayo 2015; Kim et al., 2015).

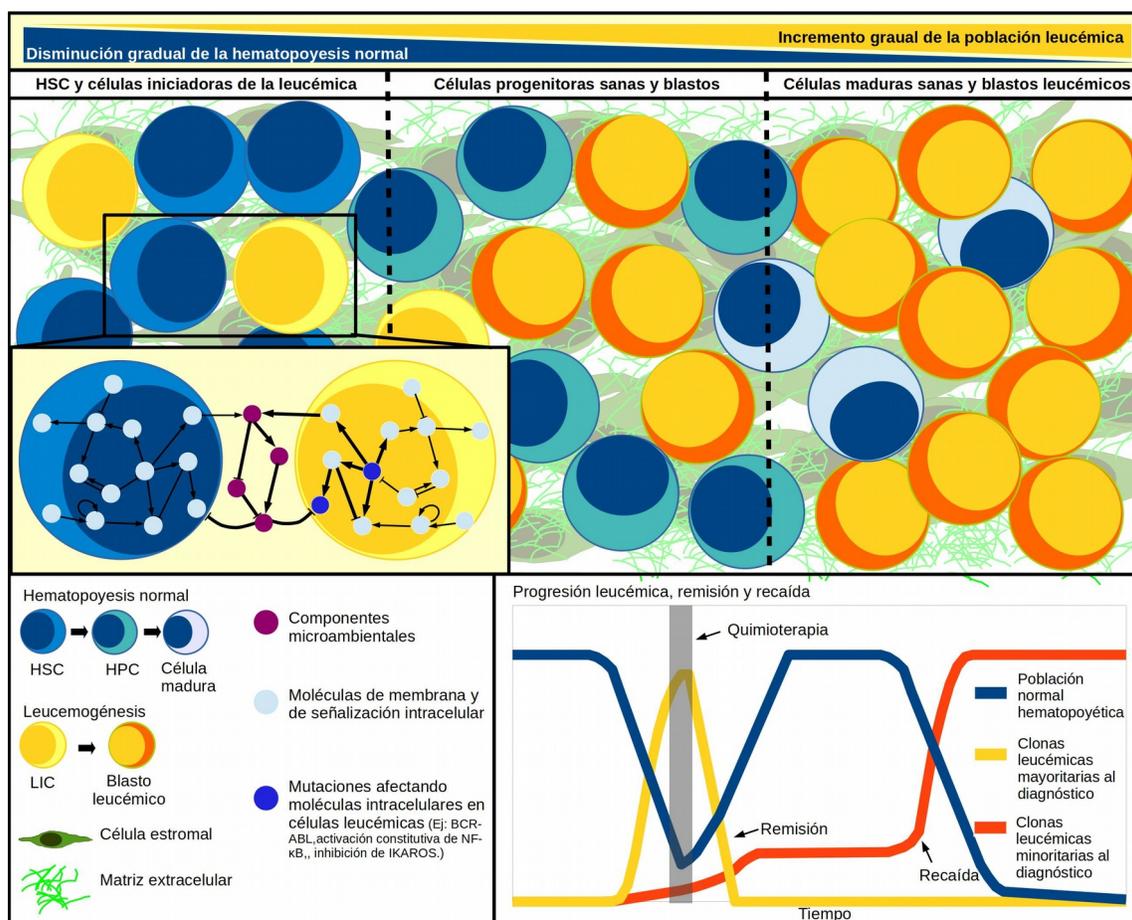


Figura 3. Complejidad del inicio y progresión leucémica. Durante la progresión leucémica tiene lugar un proceso competitivo en el cual convergen y conviven en la MO al menos 3 sistemas: la hematopoyesis normal, la producción celular leucémica y el microambiente hematopoyético. En el diagrama, se representa la convivencia de los 3 sistemas durante la leucemogénesis, proceso durante el cual los blastos leucémicos desplazan gradualmente a la hematopoyesis normal. Los cambios en ambas poblaciones son acompañadas e influenciadas por cambios en el microambiente de la MO. El microambiente a su vez, es modificado por los factores secretados por ambas poblaciones celulares estableciendo un asa de retroalimentación entre los 3 sistemas, comunicación representada por la red intercelular. El establecimiento de un microambiente “leucémico” podría ser el factor determinante en el desequilibrio leucemia/hematopoyesis normal. Además el microambiente y los diferentes nichos que lo conforman, también han sido sugeridos como jugadores importantes para la supervivencia de clonas leucémicas minoritarias ante la quimioterapia, y responsables de recaídas (Modificado de: Enciso et al., 2015).

Estudios en modelos de ratón y en pacientes con leucemia, han revelado que algunas de las alteraciones del microambiente de la MO incluyen un aumento en la concentración del factor de células madre (SCF, “*stem cell factor*”) y una disminución de la producción de CXCL12 (Li et al., 2015; Colmone et al., 2008; Lim et al., 2016). Por otra parte, trabajos previos de nuestro laboratorio sugieren un importante daño en la frecuencia y función de las HSPC en la MO de los pacientes con LLA, acompañado de un perfil de secreción anormal y proinflamatorio con aumento de la secreción de IL-1 β y TNF α (Purizaca et al., 2013; Vilchis-Ordoñez et al., 2015). Para abordar las vías moleculares implicadas en las alteraciones hematopoyéticas y microambientales que pueden favorecer la

progresión de la enfermedad, previo al trabajo desarrollado en esta tesis, construimos un modelo booleano que demuestra que la activación constitutiva de NF- κ B en la red molecular hematopoyética, es suficiente para establecer un asa de retroalimentación positiva que mantiene la secreción constitutiva de citocinas proinflamatorias (e. p. ej. IL-1 β y G-CSF) e inducir la interrupción del eje CXCR4/CXCL12, que es crucial para el mantenimiento de las células hematopoyéticas en su nicho regulador.

I.2 Modelos matemáticos para el estudio del sistema hematopoyético

I.2.1 Origen y fundamento de los modelos de regulación genética discretos

Con la finalidad de comprender el complejo proceso de regulación genética que interviene en el desarrollo celular, C. H. Waddington introdujo en 1957 el concepto metafórico de paisaje epigenético. Propuso una perspectiva única del desarrollo celular como una esfera que rueda a través de un paisaje formado por picos y valles. La esfera inicia desde la posición más alta del paisaje, representando un fenotipo celular primitivo y con potencial para diferenciar a distintos linajes celulares. El descenso de la esfera representa el proceso de diferenciación. Siguiendo su trayectoria, la esfera puede finalmente caer en un valle, representando una posición final que se define un estado estable -y un destino celular- también conocido como atractor. El paisaje epigenético de Waddington fue formalizado, entre otros, por S. A. Kauffman, quien estudió el comportamiento de grandes redes de "genes" con estados de activación binarios (por ejemplo, actividad/inactividad, encendido/apagado) y aleatoriamente interconectados, estableciendo los principios del modelado Booleano (Kauffman 1969). El supuesto de una regulación transcripcional discreta se investigó posteriormente en la embriogénesis de *Drosophila*, mostrando que el gradiente de morfógeno bicoide resultaba de promediar los estados binarios de actividad transcripcional, activos o inactivos, a nivel de núcleos individuales (Garcia et al., 2013).

El comportamiento del sistema general y el número de atrayentes de una red reguladora Booleana o multivaluada depende de características topológicas como el número de componentes y el grado de interconectividad entre ellos. Durante muchos años se aceptó que las redes biológicas eran sistemas libres de escala con una distribución de la conectividad dada por la ley de potencias (Serra, Villani & Agostini 2003; Albert 2005; Garcia et al., 2013). En una red libre de escala, las características de la red son independientes del tamaño de la red. Eso significa que cuando la red crece, la estructura subyacente sigue siendo la misma. Por otro lado, la distribución de ley de potencias indica que existe una relación entre dos variables (M , m) en donde el cambio de una

variable (M) resulta en un cambio proporcional relativo de la segunda variable (m) dado por la fórmula $M = am^k$, en donde a y k son constantes. Sin embargo, se ha comprobado que las redes biológicas empleadas para proponer este tipo de relación fue establecida con base en análisis visuales de representaciones graficas y no através de medidas estadísticas (Khanin & Wit 2006).

Actualmente la característica principal de las redes biológicas se describe como conectividad altamente variable pero siguiendo una distribución en forma de cola, teniendo pocos nodos con muchas aristas y muchos nodos con pocas aristas. La conectividad puede seguir diferentes tipos de relaciones: leyes de potencias, exponenciales, Poisson. Esta propiedad de las redes biológicas proporciona, entre otros atributos, la robustez de la red, un mejor rendimiento en la difusión de la información y la propiedad de que el número de atractores es prácticamente independiente del número de nodos.

El modelado matemático discreto y la simulación computacional basado en las redes de regulación Booleana proporciona información cualitativa significativa que emerge de la topología básica de las relaciones moleculares que determinan los destinos celulares, y puede utilizarse para el análisis de circuitos biológicos sin necesidad de valores explícitos de los parámetros cinéticos de la red. En este tipo de enfoque, los nodos de la red pueden representar genes, factores de transcripción, proteínas que median en cascadas de señalización, ARN, factores ambientales, etc., y los enlaces representan la regulación positiva o negativa entre pares de nodos. La variable de estado de cada nodo toma un valor discreto de 0 (inhibido o inactivo) o 1 (expresado o activo) (Wang, Saadatpour & Albert 2012). El estado de cada nodo en el tiempo $t+1$ se especifica mediante un mapeo dinámico que depende del estado de sus reguladores en un tiempo anterior, t :

$$X_{n(t+1)} = f_n(X_{n1(t)}, X_{n2(t)}, \dots, X_{nk(t)}) \quad [1],$$

donde f_n es una función discreta que determina el estado del nodo n en el tiempo $t+1$ ($X_{n(t+1)}$) de acuerdo al estado de los nodos $n1, n2, \dots, nk$ en el tiempo t . La función f_n representa una proposición lógica, también conocida como regla Booleana, constituida por términos elementales relacionados por las conectividades lógicas AND, OR, y NOT. Las proposiciones lógicas satisfacen la axiomática Booleana, que cumple con la asociatividad, la conmutatividad, la distributividad, la absorción y la identidad. La naturaleza discreta de los valores de verdad que intervienen en las proposiciones lógicas Booleanas implica que esta aproximación no siempre es suficiente para investigar la enorme variabilidad inherente a los procesos biológicos, como es el caso de los niveles de expresión, las concentraciones, las tasas de decaimiento, etc. Así pues, es natural considerar una teoría que contemple proposiciones lógicas multivaluadas para las interacciones de red en las que los valores de

verdad pueden sufrir más de dos niveles de activación pero siguen trabajando con valores discretos como 0, 1 y 2 que representan, por ejemplo, la inactivación, la activación intermedia y la activación alta.

Las reglas lógicas o Booleanas, son empeladas para simular computacionalmente la dinámica de una red booleana a través de pasos de tiempo discretos. La dinámica y los atractores obtenidos dependen completamente del estado de activación inicial que les asigna a los nodos de la red. A partir de un estado o grupos de estados iniciales, los nodos de la red actualizan iterativamente su valor basándose en las reglas Booleanas hasta llegar finalmente a un estado estable de punto fijo determinado por la condición $q_{i(t+1)} = q_{i(t)}$, siendo q un estado de la red i con estados de activación específicos para cada uno de los nodos que la conforman. En una simulación exhaustiva del modelo Booleano que se desea estudiar, se evalúan las trayectorias y atractores obtenidos a partir de todas las configuraciones iniciales posibles en el espacio de estados. El tamaño del espacio de estados de un modelo es $\Omega = 2^N$ donde N es el número de nodos en la red. Alternativamente, los estados finales puede ser un atractor cíclico asociado a la condición $q_{i(t+S)} = q_{i(t)}$, donde el número entero S señala el período del atractor. Los atractores cíclicos se interpretan generalmente como comportamientos oscilatorios y se sostienen por lo menos por un circuito de retroalimentación negativa en la topología de la red, que implica un número impar de interacciones inhibitorias (Thomas 1981). Este tipo de atractores pueden estar directamente asociados a eventos biológicos, por ejemplo en modelos que recuperan las oscilaciones del ciclo celular o, a veces, pueden interpretarse como activaciones intermedias u oscilatorias en modelos multivaluados y de diferenciación booleana, como se ha informado con los atractores de células T (Fauré et al., 2006; Davidich & Bornholdt 2008; Ortiz-Gutiérrez et al., 2015; Naldi et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2015).

A cada atractor de punto fijo y cíclico se llega desde un número ω de condiciones iniciales diferentes. El parámetro ω denota el tamaño de la cuenca de atracción que puede visualizarse como una proporción de áreas en el paisaje epigenético. Por consiguiente, la probabilidad de que se exprese un estado estable es $p = \omega/\Omega$, considerando como probabilidad a la proporción de trayectorias que derivan en un estado estable específico. La probabilidad varía dependiendo del tipo de actualización del modelo, si es síncrono o asíncrono.

I.2.2 Modelos discretos para el estudio de la hematopoyesis

En el paisaje epigenético de Waddington, la célula situada en la "cumbre" del paisaje epigenético hematopoyético es la HSC. A medida que se descifra la red transcripcional que subyace a la diferenciación linfoide, se descubren estadios progenitores intermedios o "valles" en el paisaje epigenético.

Aunque las transiciones de diferenciación se reconocen ahora como procesos continuos, la adquisición de moléculas y propiedades identificables con fenotipos estables depende de interruptores moleculares que actúan como pasos determinantes del linaje, lo que ha permitido la simulación de los procesos de diferenciación como modelos discretos. Más concretamente, la diferenciación hematopoyética se ha abordado con modelos discretos a muchos niveles (Figura 4), desde la cima de la colina del paisaje epigenético hasta las etapas finales de la producción de células maduras. El principal tipo de información que proporciona la construcción y simulación de las redes Booleanas se obtiene de la integración funcional de los componentes de la red de regulación genética, la cual se confirma a través de la validación de los atractores y transiciones con observaciones experimentales previas. Para comparar con los datos experimentales, los modelos Booleanos se someten a diferentes tipos de perturbaciones, incluidas las mutaciones permanentes (por ejemplo, el *knock-out* o la sobreexpresión del gen) o los cambios temporales en el valor de activación de los nodos, que pueden entenderse como "desencadenantes" que pueden dar lugar a transiciones entre estados de la red. Un ejemplo de este tipo de evaluaciones es el caso del modelo de red de células troncales y progenitores hematopoyéticos (HSPC) generado por Bonzanni et al., 2013. El modelo HSPC representa la dinámica de 10 genes expresados en la población de células troncales, además de GATA1 que se expresa en el progenitor temprano MPP (Bonzanni et al., 2013). La simulación dinámica de la red HSPC genera dos atractores de estado único, uno con perfil de célula eritroide y el otro con todos los genes desactivados, definiendo un perfil de células no hematopoyéticas. Además el modelo recupera un atractor cíclico compuesto de 32 estados de activación oscilatoria para cuatro genes (i.e. Gata2, Zfp1, Erg y Eto2a) compatibles con los datos de expresión genética de una célula única de las HSPC (Ramos et al., 2006). A partir del atractor complejo de HSPC, evaluaron las transiciones dinámicas inducidas por la modificación del valor de activación de nodos individuales. El cálculo de las transiciones permitió trazar la ruta de desarrollo desde las HSPC hacia los perfiles de células T eritrocitarias, granulocitarias, monocitarias, asesinas naturales (NK), de células B, CD4 o CD8 (Chambers et al., 2007). La simulación y evaluación del modelo de Bonzanni proporciona información sobre la estabilidad del atractor de la HSPC, el tipo de

genes que intervienen en la ruta de desarrollo y que desencadenan la transición hacia linajes específicos durante la diferenciación. Además, la reconstrucción del modelo permitió sugerir la regulación negativa de Gata1 sobre Fli1, necesaria para asegurar la estabilidad de los estados diferenciados. Dicha interacción fue corroborada experimentalmente en el mismo trabajo (Bonzanni et al., 2013).

En una publicación más reciente, la ramificación mieloide/linfoide se abordó mediante el ensamblaje de un red de regulación genética con 23 nodos que, al ser computados utilizando un formalismo lógico multivaluado, generaron 4 atractores estables compatibles con los genotipos de CLP, células de linaje B, progenitores de granulocitos-monocitos (GMP) y macrófagos (Collombet et al., 2017). Como se expuso anteriormente, tan sólo el ensamblado de la red genética puede ser útil para proponer interacciones novedosas, como ocurrió con este modelo que predijo tres regulaciones faltantes (i.e. la regulación negativa de la transcripción de C/EBP α por Foxo1, la activación de E2A por Ikaros y la regulación positiva de Gfi1 por Pax-5). Además, el modelo permitió explorar los mecanismos moleculares de inducción transitoria del factor de transcripción C/EBP α que regula a la baja el núcleo transcripcional de la especificación a linfocito B y promueve una trans-diferenciación irreversible hacia macrófagos. Las conclusiones teóricas complementaron los resultados de un informe experimental previo en el que las células B transdiferenciaron hacia macrófagos tras la expresión inducida de C/EBP α y C/EBP β (Xie et al 2004).

Las predicciones derivadas de este tipo de modelos podrían ser útiles para desentrañar la patobiología de las enfermedades hematopoyéticas, por ejemplo, el modelo mieloide/linfoide podría aplicarse para comprender la regulación aberrante de los núcleos transcripcionales de diferenciación en las leucemias agudas raras de tipo mixto donde las células neoplásicas expresan concomitantemente marcadores mieloides y linfoides. Además, los análisis de los modelos de ramificación temprana pueden ayudar a profundizar las investigaciones sobre los procesos relacionados con la plasticidad, como los que se sugiere que intervienen en el cambio de linaje de la leucemia y la recaída (Dorantes-Acosta & Pelayo 2012). Sin embargo, para muchos tipos de enfermedades ha cobrado especial interés la integración de las señales microambientales capaces de influir y regular los núcleos transcripcionales reguladores de la diferenciación celular, en particular para abordar la retroalimentación bidireccional entre las células y su microambiente circundante.

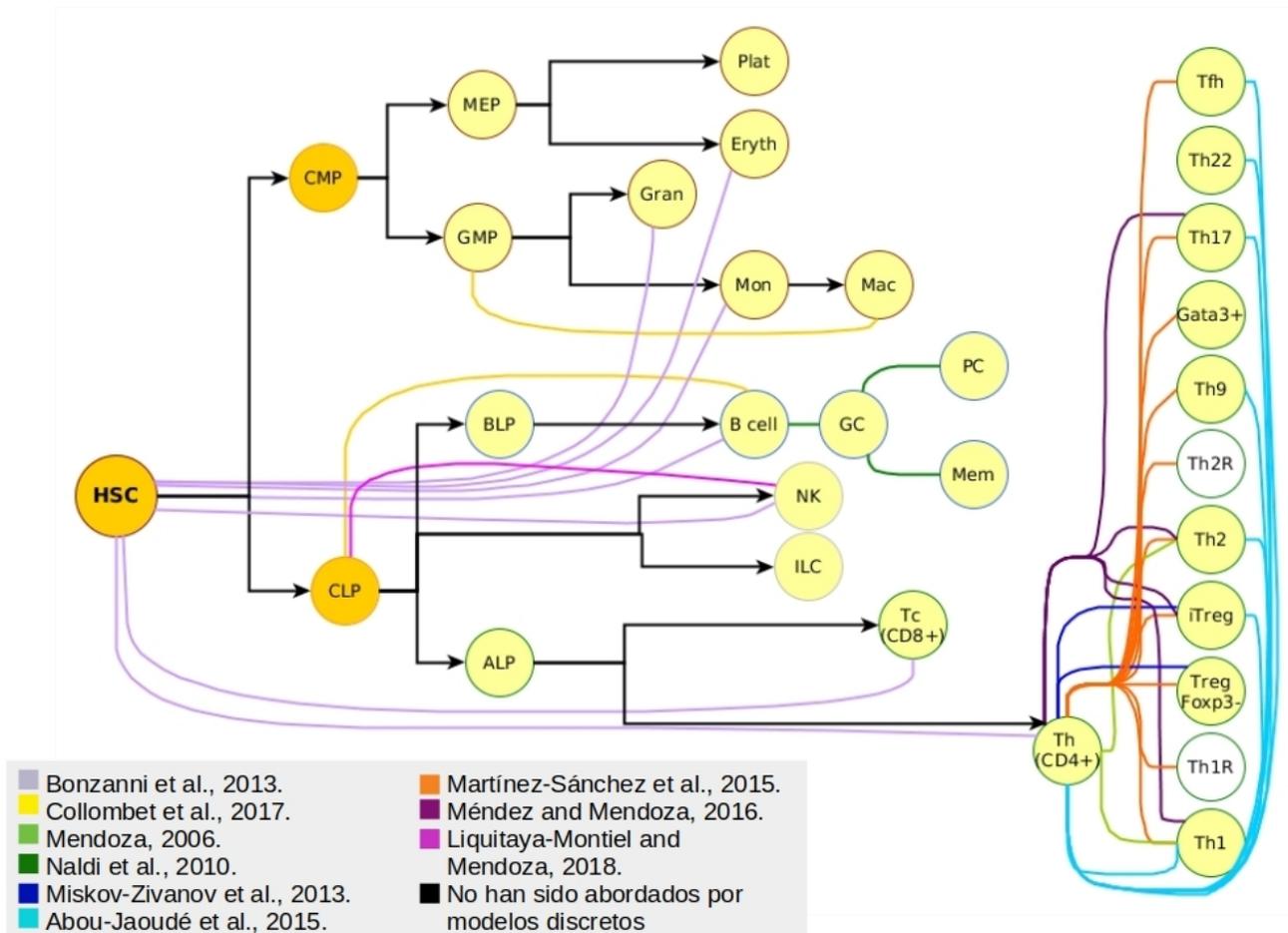


Figura 4. Atractores celulares y transiciones de la diferenciación hematopoyética reproducidos a través de modelos discretos. Los modelos discretos han sido ampliamente utilizados para modelar distintas ramas de la diferenciación hematopoyética. En la red se encuentran representados algunos de los artículos (código de color) en donde se reportan los resultados de modelos discretos y los fenotipos celulares que recuperan en las simulaciones. El subsistema hematopoyético más estudiado a través de estrategias computacionales discretas es la diferenciación de linfocitos T, proceso del cual se han recuperado numerosos fenotipos observados experimentalmente (nodos amarillos) y algunos estadios teóricos que no han asociado a hallazgos experimentales (nodos blancos). Las flechas negras representan la dirección de la hematopoyesis hacia el linaje mieloide y linfoide. Figura de: Enciso, Pelayo & Villarreal 2019.

I.2.3 Modelos de diferenciación y plasticidad linfoide influidos por elementos microambientales

La aplicabilidad de los modelos discretos se amplía a la luz de los descubrimientos sobre la heterogeneidad y la plasticidad celular. Su flexibilidad para el análisis de sistemas biológicos integrados por múltiples tipos de eventos moleculares (i.e. interacción receptor/sustrato, fosforilación/desfosforilación, transcripción, degradación) los convierte en una herramienta útil para la evaluación de diferentes microambientes que influyen en la modulación de las redes genéticas y de señalización.

Moléculas como las integrinas, citoquinas o receptores de antígenos pueden incluirse en los modelos computacionales ya que participan en el mantenimiento de un determinado compartimiento hematopoyético, el aumento de la proliferación, la regulación de la apoptosis o la migración, o la orientación de la diferenciación a un fenotipo u otro. Como se ha mencionado anteriormente, algunos de estos procesos pueden ser representados en los modelos como comportamientos binarios emergentes de la conectividad entre nodos de las redes moleculares y el ruido, intrínseco o extrínseco (Huang & Ferrell 1996; Kim & Sauro 2012; Das et al., 2009).

Algunos de los primeros enfoques matemáticos lógicos para modelar el comportamiento de los linfocitos tras la exposición a los antígenos precedieron al desarrollo de redes que conectaban los eventos intracelulares que regulan el destino celular de los progenitores hematopoyéticos y los linfocitos (Kaufman, Urbain & Thomas 1985; Kaufman & Thomas 1987). Pero, a medida que se descubrían los diferentes subtipos de linfocitos, los esfuerzos se centraron en la reconstrucción de las redes de regulación genética que permitieran explicar la aparición de fenotipos maduros en respuesta a factores microambientales variables en condiciones normales y patológicas. El primer modelo de ramificación de la diferenciación linfocítica utilizando una perspectiva discreta que describe la polarización de células Th vírgenes (Th0) en células Th1 o Th2, resultó de la transformación de un modelo continuo previo basado en funciones de Hill a un modelo de ecuaciones diferenciales ordinarias de tres dimensiones (Yates, Callard & Stark 2004). Más adelante, la versión booleana propuesta por Mendoza integró 17 nodos y reemplazó el bucle de auto-retroalimentación positiva del factor de transcripción Gata-3 en el modelo de Yates con un circuito de retroalimentación funcional más refinado que involucra a Gata-3 y a la interleucina-4 (IL-4). La activación de este circuito funcional caracteriza al subtipo de célula Th2 (Mendoza 2006; Kim et al., 1999; Höffer et al., 2002, Ho et al., 1996). Además de recuperar la polarización Th0 en Th1 y Th2, el modelo actualizado fue capaz de describir la transición entre los atractores Th1 y Th2 mediante la estimulación con IFN γ , IL-4, o la combinación de IL-12 e IL-18. Más tarde, el modelo se amplió para incluir factores de transcripción adicionales, citocinas y moléculas de transducción de señales para recuperar destinos adicionales a las células reguladoras de T (Treg) y Th17 (Naldi et al., 2010). La publicación de nuevos trabajos describiendo nuevos datos moleculares han dado lugar a la reconstrucción y simulación de versiones más grandes de la red de diferenciación linfocítica, prediciendo un mayor repertorio de subconjuntos de células Th (Figura 4), incluyendo células independientes Tfh, Th9, Treg, iTreg, Th9, Th17, Th22 y T reguladoras de Foxp3 (Martinez-Sanchez et al., 2015; Abou-Jaoudé et al., 2015; Puniya et al., 2018).

Los linfocitos B y NK han sido menos populares en el modelado matemático. Durante la diferenciación de las células B terminales en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios, la exposición a factores ambientales particulares, incluyendo la activación mediada por antígenos del BCR, define la transición de la célula B con un fenotipo vírgen hacia una célula de memoria o a una célula plasmática productora de anticuerpos. Esta diferenciación terminal de las células B ha sido simulada como un modelo Booleano que recupera cuatro perfiles celulares: célula B ingenua antes y después de llegar al centro germinal (GC), célula de memoria (MC) y célula plasmática (PC) (Méndez & Mendoza 2016). El modelo de célula B recupera no sólo los atractores celulares esperados sino también las transiciones con significado biológico. Cabe destacar que a partir de la reconstrucción de la red y las simulaciones del modelo, se predicen cuatro interacciones que no han sido confirmadas experimentalmente pero que se sugieren a través de mecanismos indirectos: dos bucles de auto-retroalimentación involucrados en la activación de Pax5 y Bcl6, la regulación positiva de Bcl6 por parte de Pax5 y la inhibición de Pax5 por parte de Irf4.

Por otro lado, la biología de las células NK ha sido abordada recientemente por un modelo Booleano que recupera un atractor de CLP capaz de transitar hacia atractores pro-B, progenitor T temprano o tres subtipos diferentes de atractores NK caracterizados por la expresión diferencial de Tbet y Eomes. Las transiciones CLP hacia los diferentes atractores es dependiente del patrón de activación de IL-7, IL-15 y del ligando Delta (Liquitaya-Montiel & Mendoza 2016). Los tres atractores NK recuperados por el modelo son compatibles con hallazgos experimentales sobre la producción de NKs altamente citotóxicos, NKs de la MO y NKs hepáticos (Simonetta, Pradier & Roosnek 2016).

La participación del microambiente en la diferenciación de los linfocitos se aplica con éxito en los modelos mencionados gracias a la suposición de que las citocinas están ausentes o presentes, y no consideran la disponibilidad graduada. Otro tipo de modelos han integrado supuestos para simular el procesamiento y la propagación de la señal utilizando un modelo discreto, como los modelos de las vías de señalización asociadas a la activación del TCR (Saez-Rodríguez et al., 2007; Klamt et al., 2006). Saez-Rodríguez y colaboradores simularon un modelo Booleano a partir de una red de 94 nodos incluyendo un ajuste que permitiera integrar que algunos eventos moleculares ocurren antes o más rápidamente que otros. Las reglas lógicas se actualizaron en una primera y segunda ronda dependiendo de la naturaleza del evento molecular. A partir de los atractores recuperados después de la simulación, los autores hicieron predicciones sobre la cascada de señales activada por el compromiso de los receptores y las confirmaron experimentalmente. La aplicación de dos rondas de actualización es una forma de reconocer que los acontecimientos celulares se producen en escalas

de tiempo diferentes, por ejemplo, las reacciones bioquímicas que tienen lugar en el citoplasma (por ejemplo, la inhibición molecular por fosforilación) son más rápidas que las modulaciones transcripcionales (por ejemplo, el factor de transcripción que se traslada al núcleo y se une a un promotor genético que se activará). A pesar de su utilidad, es necesario reconocer que los modelos discretos son útiles para el estudio de determinados procesos celulares con suposiciones estrictas sobre su naturaleza. En particular, este tipo de modelos es insuficiente cuando el proceso es altamente dependiente de concentraciones continuas o graduales de una biomolécula.

El estudio de las enfermedades crónicas tiene una gran influencia en la comprensión de cómo los cambios sutiles en la biodisponibilidad de algunas moléculas derivan en la perturbación completa de sistemas biológicos complejos. Si quisiéramos simular cómo la acumulación progresiva de factores pro-inflamatorios en el tracto intestinal perturba las proporciones de las poblaciones de células T, el uso de modelos Booleanos sería muy limitado para ver las etapas transitorias entre el atractor sano y un atractor patológico, como ocurre en la enfermedad inflamatoria de Bowel (Geremia & Arancibia-Cárcamo, 2017).

1.2.4 Modelos con variación de dosis para el estudio de la diversidad linfoide: continuos, multivaluados y probabilísticos

El modelado y simulación de la producción o activación de células linfoides puede requerir la integración de moléculas con efectos dosis-dependientes, como por ejemplo; las afinidades ligando-receptor, los gradientes de quimiocinas e incluso algunos factores de transcripción como C/EBP α y PU.1 (Collombet et al., 2017; Xie et al., 2004). En este sentido, los modelos matemáticos continuos son el instrumento más recurrente para el estudio del desarrollo y la respuesta de los linfocitos, útiles para evaluar la dinámica de las subpoblaciones y el repertorio de receptores (Mehr 2003; Salmon-Divon et al., 2005). La construcción de este tipo de modelos requiere información cinética y bioquímica detallada, sin embargo cuando este tipo de información es escasa, existen estrategias para ajustar los parámetros cinéticos a los datos experimentales disponibles. Algunos procesos celulares dependientes de variaciones en las concentraciones, pueden simularse todavía con enfoques discretos utilizando modelos multivaluados o redes Booleanas probabilísticas. También existen otras alternativas para integrar acontecimientos moleculares discretos y continuos, como la construcción de modelos híbridos y difusos.

Los modelos híbridos han sido empleados para simular la activación de los linfocitos Th y B por parte de las DC, y su posterior salida del ganglio linfático. Las entidades celulares y los pasos de replicación se simularon como variables discretas, mientras que la migración se simuló con ecuaciones diferenciales definidas con parámetros continuos (e.g., concentración y difusión de quimiocinas, velocidad celular) (Baldazzi et al., 2009).

Las vías moleculares que participan en la señalización del TCR, un proceso con interacciones dosis-dependientes, han sido modeladas con valores multivaluados y continuos. Ríto abajo de la activación del TCR con péptidos procesados y expresados en la superficie de las células presentadoras de antígenos, tiene lugar el proceso de discriminación de ligandos durante el cual los linfocitos T diferencian entre antígenos de unión débil y de unión fuerte, para identificar los antígenos propios y los ajenos. La afinidad de ligandos débil o fuerte, fue representada mediante un modelo multivaluado que permitía tres posibles niveles de activación de los nodos TCR y PI3K (off=0, low=1 y high=2). Las simulaciones computacionales del modelo corroboraron que una señal de TCR baja favorece la diferenciación de Treg, mientras que una señal más fuerte da lugar a la inducción del perfil de Th (Miskov-Zivanov et al., 2013). Además, la variación del número de rondas o pasos de tiempo para la activación del TCR, como enfoque para los tiempos de vida de los ligandos, mostró que el fenotipo Th se estabiliza más rápidamente que un perfil Treg.

Por otro lado, el proceso de activación del TCR ha sido simulado con ecuaciones diferenciales. Las simulaciones continuas sugirieron que el establecimiento de una asa de retroalimentación negativa por la vía MAPK es la responsable de modular la respuesta del TCR después de su activación hasta que se alcanza un umbral de activación de la cinasa ERK, asemejando a un comportamiento binario (Altan-Bonnet & Germain 2005). El modelo se amplió para responder a la pregunta de cómo las variaciones estocásticas en la expresión de las proteínas CD8 dentro de una población clonal de células T podrían afectar su capacidad de respuesta. Las variaciones en la expresión de CD8 y dos componentes de la vía de señalización del MAPK, ERK-1 y SHP-1, generan dispersión en la capacidad de respuesta entre las células individuales, pero la corregulación de CD8 y SHP-1 restringe la variabilidad fenotípica (Feinerman et al., 2008). Más tarde se descubrió que el proceso de discriminación de los ligandos influye en la diferenciación de las células T en fenotipos Treg o Th mediante la modulación descendente de las vías de señalización PTEN y Akt/mTOR (Sauer et al., 2008; Haxhinasto, Mathis & Benoist 2008).

El microambiente inductivo que participa en la diferenciación de los linfocitos es susceptible de modificaciones en respuesta a desafíos locales y distantes, como las infecciones que influyen en el compartimiento de los linfocitos al inducir la plasticidad. Para profundizar en la composición de los patrones microambientales que afectan a la diversidad de los linfocitos T, se ha desarrollado redes Booleanas probabilísticas (PBCN). A diferencia de los modelos Booleanos convencionales, las PBCN asocian probabilidades de activación a cada nodo como una representación de la dosis, aumentando el rango de microambientes simulables (Puniya et al., 2018). Mediante un análisis de sensibilidad de la PBCN se identificaron los requisitos mínimos del microambiente, en cuanto a composición y dosis, para la recuperación de 10 perfiles de células T y algunas transiciones de plasticidad reportadas experimentalmente.

Cada tipo de modelo tiene diferentes limitaciones, resumidas en la Tabla 1. Los modelos multinivel y probabilísticos no permiten la integración de jerarquías temporales en los eventos moleculares, lo que es particularmente importante cuando se modelan más de un tipo de procesos celulares (por ejemplo, reacciones bioquímicas, eventos transcripcionales, exportación de citoquinas, unión intercelular). Mientras que el modelo continuo, incluye un número limitado de componentes que dependen de la disponibilidad de sus parámetros cinéticos o de suficiente información para establecer supuestos. Como alternativa, proponemos el uso de la lógica difusa para fusionar grandes redes de regulación transcripcional que participan en la diferenciación y plasticidad celular, con el conocimiento cualitativo de la cinética de las vías de señalización que participan en la transducción de las variaciones microambientales (por ejemplo, qué eventos son relativamente más rápidos que otros, o qué ligando se une predominantemente a su receptor por encima de otro ligando).

I.2.5 Simulación continua con lógica difusa a partir de redes de diferenciación discreta

Como una alternativa a la falta de parámetros cinéticos, los modelos Booleanos pueden transformarse en sistemas continuos utilizando la lógica difusa (Enciso, Pelayo & Villarreal 2019; Méndez & Mendoza 2016; Villarreal, Padilla-Longoria & Álvarez-Buylla 2012; Di Cara et al., 2007). La lógica difusa satisface una axiomática similar a la de la lógica Booleana, sin embargo emplea operadores que permiten definir valores continuos entre 0 y 1, manteniendo una descripción cualitativa. La lógica difusa es una teoría que tiene como objetivo proporcionar una base formal para aproximar el razonamiento continuo con aplicaciones en las ciencias físicas, biomédicas y del comportamiento.

El enfoque de lógica difusa es útil para aprovechar redes de regulación genética existentes, de diferenciación y activación linfóide, en la simulación de escenarios complejos que impliquen la comunicación intercelular entre células inmunes, la interacción de las células inmunes con el tejido normal o patológico y las transiciones de la población de células inmunes en respuesta a la remodelación del microambiente.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de tres tipos de modelos matemáticos

Modelos dinámicos	Ventajas	Desventajas	Tipo de aplicación
Discreto	<ul style="list-style-type: none"> • Simulación de redes extensas (e.g. cientos de componentes) • Simulación de sistemas biológicos con poca información de parámetros cinéticos y detalles mecanísticos • Útil para responder preguntas sobre la dinámica cualitativa del sistema biológico de estudio • Útil para integrar largas cantidades de información cualitativa disponible en la literatura existente y/o de experimentos de gran escala 	<ul style="list-style-type: none"> • Suposiciones de discretización para todos los componentes del sistema • Los atractores son difícilmente comparables con observaciones experimentales que incluyen expresiones o activaciones graduales de sus componentes • Las simulaciones dinámicas ocurren en términos de pasos "computacionales" de tiempo 	Simulación de redes de regulación genética (e.g. diferenciación celular, transición normal-maligna)
Continuo	<ul style="list-style-type: none"> • Útil para la simulación de sistemas de reacciones bioquímicas • La información de salida es comparable con información experimental cuantitativa (e.g. niveles de activación de vías de señalización o proporciones de poblaciones celulares) • El modelo dinámico puede ser simulado e interpretado en términos de unidades reales de tiempo 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere la disponibilidad de parámetros cinéticos y detalles mecanísticos (e.g. tasas de síntesis y degradación) • Las simulaciones requieren mayor poder de cómputo conforme al número de componentes que se incorporados al modelo • Se requiere mayor conocimiento matemático para la selección apropiada, construcción y simulación de un sistema de ecuaciones 	Sistemas de reacciones bioquímicas
Lógica difusa	<ul style="list-style-type: none"> • La activación de los componentes del sistema, puede tomar valores continuos en un rango entre 0 y 1 • No requiere un profundo conocimiento cinético ni mecanístico, pero permite incorporar información cuantitativa para implementar una jerarquía en los tiempos de expresión/activación de los componentes del sistema • Útil para simular redes biológicas extensas que incluyan sub-redes con poca información cinética disponible 	<ul style="list-style-type: none"> • El valor asignado para cada componente oscila entre 0 y 1, asemejándose más a un grado de activación que a una concentración real • Como con los modelos Booleanos, la precisión en las predicciones generadas por modelos de lógica difusa, está limitada por la disponibilidad de información cinética y mecanística 	Módulos de señalización gradada conectados a redes de regulación genética (e.g. sistemas de citocinas influyendo en decisiones de destino celular)

La transformación de modelos discretos en un conjunto de ecuaciones diferenciales es útil para identificar atractores adicionales y/o estados transitorios con relevancia biológica. Por ejemplo, en el modelo de Méndez y Mendoza, la simulación continua de una red de diferenciación de células B recuperó tres atractores adicionales en comparación con la simulación de la misma red, como modelo Booleano (Méndez & Mendoza 2016). Los atractores adicionales mostraron valores intermedios de Bcl-6 y/o Irf4, sin embargo sólo uno de ellos fue comparable con un fenotipo previamente reportado para centrocitos identificados durante la selección en centros germinales (Cattoretto et al., 2006).

En comparación con los modelos continuos convencionales, la simulación computacional de los modelos difusos es más sencilla y, en consecuencia, más rápida, por lo que también permite la integración de redes Booleanas desarrolladas independientemente. Un ejemplo de esta utilidad es el modelo de Méndez y Mendoza construido para simular la diferenciación de linfocitos T/B (Mendoza & Méndez 2015). Este modelo está conformada por 81 ecuaciones que representan citocinas y factores de transcripción que conducen a diez atractores: Th0, Th1, Th2, Th17, Treg, linfocito T citotóxico, linfocitos T DP, CD8 T virgen, célula B virgen y célula plasmática. Los atractores obtenidos por el modelo continuo son más compatibles con los datos experimentales que los modelos discretos anteriores, todos los atractores tienen valores intermedios para Ikaros, Gfi1 y PU1. Para cada uno de los tres factores de transcripción existen fuertes evidencias que asocian su expresión intermedia con la delimitación hacia el linaje linfóide durante la diferenciación hematopoyética (Spooner et al., 2009; Mak et al., 2011; Zarnegar & Rothenberg 2012).

1.2.6 Aplicación del modelado computacional para la simulación de contextos genéticos y microambientales patológicos relacionados con las células linfoides

El marco lógico también se ha aplicado a la simulación de las vías de señalización implicadas en enfermedades relacionadas con las células linfoides, como la leucemia linfoblástica aguda y la leucemia de linfocitos granulares grandes de células T (T-LGL). En el primer caso, se predijo que un microambiente proinflamatorio puede inducir inestabilidad en dos ejes moleculares responsables de la retención de las células progenitoras hematopoyéticas dentro de los nichos regulatorios de la MO: eje citocina-receptor CXCL12/CXCR4 y eje de integrinas VCAM-1/VLA4. En este trabajo previo se predijo que un estímulo pro-inflamatorio representado por un ligando de TLR, es capaz de inestabilizar ambos ejes moleculares causando la desregulación de la proliferación de los progenitores hematopoyéticos en el nicho mesenquimal, probablemente participando a través de este mecanismo en la promoción de hiperproliferación celular característica de patologías como la LLA (Enciso et al., 2016). En el segundo caso, el modelo lógico fue útil para descifrar algunos de los mecanismos moleculares que promueven la progresión de la leucemia T-LGL, entre ellos identificaron a la cinasa de esfingosina 1 y al NF- κ B como factores esenciales para la supervivencia de los linfocitos T citotóxicos (Zhang et al., 2008).

Ambos modelos integran factores microambientales con vías de señalización que participan en las decisiones sobre el destino celular, y en ambos casos el papel de la vía proinflamatoria del NF- κ B surgió como un factor importante en la patogénesis, actuando a diferente niveles: directamente

dentro de las células leucémicas promoviendo su supervivencia y modificando la expresión de receptores, o en las células estromales modificando su patrón de secreción de citocinas.

Pocos modelos matemáticos han logrado simular ficientemente la comunicación dinámica entre los linfocitos y el microambiente, teniendo en cuenta que los bucles de retroalimentación entre ambos sistemas son la clave para modular las respuestas inmunitarias en contextos saludables o, para mantener estados pro-inflamatorios en múltiples enfermedades crónicas. Durante muchos años el estudio de las condiciones pro-inflamatorias se centró en la identificación de citocinas que pudieran ser utilizadas como biomarcadores o dirigidas como terapias adyuvantes. Con los avances en la inmunoterapia, el estudio de la participación de las células inmunitarias como participantes activos en el desarrollo y la progresión de las enfermedades crónicas ha cobrado gran importancia porque representan un objetivo terapéutico que, en la mayoría de los casos, implica menos efectos colaterales que las terapias convencionales.

Recientemente se ha comprobado que el enfoque del paisaje epigenético es útil para el análisis *in silico* de la progresión de salud hacia la patogenia (Huang, Ernberg & Kauffman 2009), como la transición epitelio-mesenchima y la inducción a fenotipos migratorios después de afecciones proinflamatorias crónicas, lo que ofrece una herramienta para profundizar en las etapas de transición que podrían ser importantes para el diagnóstico temprano y reversión de la enfermedad. En el caso del modelado computacional de la transición epitelio-mesenchima inducida por señales proinflamatorias, se demostró que podría haber una etapa intermedia con un perfil senescente (Méndez-López et al., 2017). El proceso de transformación maligna es promovido, entre otros factores, por TGF β secretado por las células CD8 y Treg, y TNF α producido por macrófagos y células T proinflamatorias (Bates & Mercurio 2003; Mahic et al., 2008). Es importante señalar que los linfocitos T CD8 se han utilizado como agentes de promoción de características agresivas en la tumorigénesis del cáncer de mama (Santisteban et al., 2009), pero el uso de las células T CD8 como dianas terapéuticas implica afectar a una de las defensas más importantes contra las infecciones, por lo que la investigación sobre las redes reguladoras que subyacen a la polarización de las células T abre nuevas oportunidades para el desarrollo de terapias más precisas (Gómez Tejeda Zañudo, Scaltriti, & Albert 2017).

El mismo enfoque es aplicable al estudio de los atractores emergentes de muchas otras redes asociadas a enfermedades crónicas. Por ejemplo, la diabetes de tipo 2 puede describirse en términos de redes de interacción de células beta-pancreáticas (Zhou, Bruschi & Huang 2011) y linfocitos T,

sobre la base de pruebas de la participación de diferentes subpoblaciones T como inductores de inflamación local y sistémica (Xia, Rao & Zhong 2017). Un primer modelo dirigido a la plasticidad de las células T CD4 en enfermedades metabólicas mostró que la hiperinsulinemia, una afección asociada al síndrome metabólico y a las primeras etapas de la diabetes de tipo 2, inhibe la generación de células T reguladoras de Foxp3 independientes y estabiliza el atractor Th17 (Martinez-Sanchez, Hiriart & Álvarez-Buylla 2017). Además de la diabetes de tipo 2, el aumento de la subpoblación Th17 y la disminución de las células reguladoras T se han vinculado con la destrucción de las células beta-pancreáticas en la patogénesis de la diabetes de tipo 1, un mayor riesgo de recurrencia del cáncer de mama en los pacientes diabéticos y una mayor susceptibilidad a desarrollar colitis (Emamaullee 2009; Nicholas et al., 2016; Xin et al., 2014). La modulación de la subpoblación Th17 como tratamiento prometedor de la colitis se predijo mediante simulaciones computacionales de un modelo continuo desarrollado por Carbo y colaboradores (Carbo et al., 2013).

En todos los procesos crónicos mencionados anteriormente, intervienen múltiples etapas de desarrollo de la enfermedad en las que se producen diferentes cambios en el microambiente y la composición celular. Con los modelos discretos podemos trazar un mapa claro de los atractores y de las transiciones entre ellos, en presencia o ausencia de nodos particulares. Así pues, la transformación de los modelos Booleanos, utilizando la lógica difusa, es un enfoque prometedor para integrar las redes de diferenciación de las células linfoides y las células de otros tejidos a fin de obtener modelos más precisos para estudiar las enfermedades crónicas, ya que se hace importante la consideración de la evolución temporal y los cambios graduales en las composiciones moleculares.

Sin embargo el uso de los modelos matemáticos también ha tenido sus limitantes. Por un lado, la construcción de modelos requiere una delimitación del sistema que se va a simular, lo que hace difícil estudiar a detalle procesos extensos como la hematopoyesis que incluye múltiples ramificaciones y numerosos fenotipos celulares a lo largo de todo el proceso. En esta línea encontramos que hay escasos modelos sobre la diferenciación temprana de linfocitos B y múltiples modelos sobre linfocitos T. Además la reconstrucción de un modelo requiere que exista información detallada sobre el mismo, tanto molecular como cinética. Sin embargo, la hematopoyesis es aún un sistema que no se conoce por completo, lo cual genera que los modelos incluyan múltiples suposiciones y requieran una continua actualización para integrar nuevas interacciones.

II. JUSTIFICACIÓN

Hallazgos previos de nuestro grupo de investigación, experimentales y computacionales, respaldan la hipótesis de que la disrupción del microambiente hematopoyético podría ser la clave para la inhibición de la hematopoyesis normal y, el mantenimiento y progresión de células malignas o aberrantes en la progresión de patologías linfoproliferativas, como la LLA. El análisis de la expresión de distintas moléculas y citocinas en MSC y HSPC, en MO humana normal y MO leucémica, sugiere la existencia de asas pro-inflamatorias que podrían estar induciendo una remodelación de los nichos hematopoyéticos. Particularmente, señales pro-inflamatorias derivadas e inductoras de la vía de señalización NF- κ B, son capaces de alterar la expresión y activación de ejes moleculares de comunicación entre las células estromales, las HSPC y/o precursores linfoides, incluyendo los ejes CXCL12/CXCR4/CXCR7 y VCAM1/VLA4. En consecuencia, la alteración de estos ejes en combinación con las vías de señalización proinflamatoria podrían afectar la red genética subyacente a la diferenciación linfoide.

La simulación de un modelo computacional dinámico discreto (modelo Booleano) conformado por las interacciones moleculares involucradas en la diferenciación temprana de linfocitos B, la comunicación con el microambiente y las vías de transducción de señales relacionadas, constituye una herramienta poderosa para la validación de las teorías formuladas a partir de la recopilación de resultados experimentales y computacionales de nuestro laboratorio y otros grupos de investigación previos, y para la predicción de mecanismos asociados al mantenimiento y progresión de enfermedades linfoproliferativas, así como trastornos inmunológicos. El estudio de estados patológicos es posible mediante la simulación de un modelo matemático discreto que permita simular estados aberrantes mutantes, considerando la activación o inhibición, total o parcial, de uno o varios elementos.

III. HIPÓTESIS

Si la presencia de estímulos pro-inflamatorios simulados por inducción de NF- κ B perturban la red de diferenciación temprana de linfocitos B, entonces células con fenotipos emergentes competirán por los nichos en la MO, dando lugar al desplazamiento de la hematopoyesis normal e induciendo patologías linfoproliferativas.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Simular la red de diferenciación temprana de linfocitos B y la perturbación de la misma mediante estímulos pro-inflamatorios para comprender los mecanismos que pudieran estar participando en la competencia poblacional existente entre las células leucémicas y las células hematopoyéticas normales en la MO, e identificar escenarios de progresión leucémica.

IV.2 Objetivos particulares

- Construir una red que relacione la interacción de células progenitoras hematopoyéticas con señales microambientales que modulen factores transcripcionales involucrados en la diferenciación temprana de células B.
- Modelar la red de diferenciación temprana de células B como un modelo Booleano y semi-continuo, evaluar los atractores recuperados y mutantes.
- Identificar candidatos moleculares para la inducción de escenarios pro-inflamatorios en la leucemia
- Identificar escenarios de progresión, mantenimiento e inhibición leucémicos.

V. METODOLOGÍA

V.1 Construcción de la red de regulación de diferenciación temprana de células B (eBCR)

La reconstrucción de la red eBCR se realizó a partir de una revisión exhaustiva de bibliografía, principalmente empleando el buscador Pubmed con acceso a la base de publicaciones MEDLINE de la *National Library of Medicine* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Como herramientas complementarias para la confirmación de interacciones entre nodos y la identificación de interacciones hipotéticas, se emplearon las herramientas:

- STRING (<https://string-db.org/>), herramienta para la construcción de redes de interacción proteína-proteína, desarrollada por el *STRING Consortium*.
- Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>), conjunto de herramientas para el análisis de enriquecimientos, desarrollada por el grupo de investigación de Avi Ma'ayan en *Icahn School of Medicine en Mount Sinahi*.

A partir de la revisión de literatura y herramientas complementarias, se obtuvo una red de 30 nodos. Este red se redujo a 26 nodos mediante la integración de la regla lógica de los nodos reducidos en la regla lógica los nodos que regulan. Los nodos a ser reducidos fueron seleccionados por que permitían hacer el reemplazo de la regla lógica de manera directa, no generaban atractores nuevos, y no añadían ciclos en los atractores existentes.

Las reglas lógicas así como el código en R empleado para las simulaciones del presente trabajo pueden ser consultadas y descargadas en la sección de Información Suplementaria del artículo Enciso et al., 2020 (<https://peerj.com/articles/9902/#supplemental-information>)

V.2 Modelo dinámico booleano de una red eBCR

Para la simulación computacional del modelo eBCR, se siguió la metodología para convertir la red en un sistema dinámico discreto, como lo describen Albert & Wang y Assman & Albert (Albert & Wang 2009; Assman & Albert 2009).

La función booleana de un nodo particular, también llamada regla lógica, describe las condiciones necesarias para su activación, de acuerdo con el estado de activación de sus nodos reguladores y su interacción. Los operadores Booleanos clásicos empleados para la construcción de las funciones Booleanas son AND, OR y NOT. El operador AND se usa para representar el requisito

de la conjunción de dos o más nodos reguladores; el operador OR, cuando hay más de un nodo capaz de regular a otro pero solo uno de ellos es suficiente para ejercer el efecto; y el operador NOT, representa una regulación negativa o inhibitoria. Las funciones Booleanas se implementaron con el paquete BoolNet R (Müssel, Hopfensitz & Kestler 2010) para obtener los estados estables, o atractores, utilizando los esquemas de actualización síncronos o asíncronos (Albert & Wang 2009).

En el esquema de actualización síncrono, todos los nodos de la red transicionan al mismo tiempo, suponiendo que todos los genes y moléculas representados en el modelo cambian sus niveles de expresión o activación en lapsos de tiempo equivalentes. Esta suposición es biológicamente poco realista y se relaja a través de simulaciones asíncronas, donde en cada iteración se selecciona aleatoriamente un nodo para actualizar, por lo que todos los nodos tienen la misma probabilidad de hacer una transición (Garg et al., 2008). Las simulaciones con ambos tipos de esquemas de actualización se ejecutaron exhaustivamente, lo que significa que se consideraron todos los posibles estados iniciales para la simulación.

V.3 Modelo dinámico continuo de la red eBCR

Para la transformación del modelo Booleano a un modelo de continuo, las reglas Booleanas fueron transformadas a expresiones algebraicas empleando la función *booleanToODE()* implementada en el paquete de R, BoolNetPerturb disponible en GitHub: <https://github.com/mar-esther23/boolnet-perturb>. Esta función transforma las reglas Booleanas empleando la lógica de Zadeh o la lógica probabilística, y las integra en ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs), usando el método SQUAD (Mendoza & Xenarios 2006) o el método propuesto por Villarreal y colaboradores (Enciso, Pelayo & Villarreal 2019, Villarreal, Padilla-Longoria & Álvarez-Buylla 2012). Para la transformación de modelo Booleano a continuo, usamos lógica de Zadeh y el método propuesto por Villarreal.

El método propuesto por Villarreal y colaboradores para la generación del sistema de ODEs para la simulación de una red de regulación, considera que el nivel de expresión w_n , que corresponde a la función algebraica del nodo n puede ser parametrizado por una función característica de estructura logística, descrita por la función:

$$\mu[w_n] = \frac{1}{1 + \exp[-\beta(w_n - w_{thr})]} \quad [2],$$

en donde β corresponde a la tasa de saturación indicando la progresión de w_n , de un nivel de expresión nula hacia un estado de expresión máxima. Esta transición es gradual para una β de valor bajo y aguda para una β de valor alto (Figura 5). En las simulaciones continuas de la red eBCR, se usó un valor intermedio, $\beta=10$, ya que en una serie de simulaciones exploratorias identificamos que con este valor se recuperaban los patrones de expresión de asociados a los los precursores y progenitores linfoides. Este valor de β genera una distribución sigmoide más parecida a la expresión de elementos transcripcionales y menos a interacciones de activación/inhibición abrupta, como en las uniones ligando/receptor o inhibición/activación por fosforilación. En [2], w_{thr} representa el valor umbral o nivel a partir del cual se considera el cambio entre inactivación y activación. Por simplicidad, el valor w_{thr} empleado en las simulaciones de la red eBCR fue de 0.5, el cual representa que debajo de 0.5 el nodo se considera apagado o inactivo, y arriba de 0.5 se considera encendido o activo.

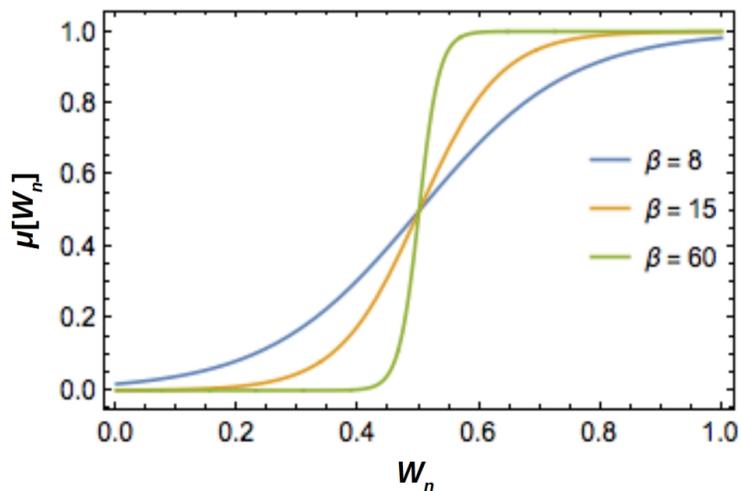


Figura 5. Transiciones graduales para valores variables de β . Distribución característica de $\mu [w_n - w_{thr}]$ para un valor umbral $w_{thr} = 1/2$ de la proposición lógica w_n , y diferentes valores del parámetro de saturación β .

La metodología basada en la lógica de Zadeh para la obtención de las expresiones algebraicas w_n , emplea las reglas presentadas a continuación para la transformación de las reglas de regulación:

Booleano	Zadeh
$n1$ AND $n2$	$\min [n1, n2]$
$n1$ OR $n2$	$\max [n1, n2]$
NOT $n1$	$1-n1$

La evolución dinámica del valor de expresión de n en el tiempo es determinada por una serie de ODEs de la forma:

$$\frac{dx_n}{dt} = \Theta[w_n] - \alpha_n x_n \quad [3],$$

en donde α_n es la tasa de decaimiento de la expresión del nodo n . En el presente trabajo, se estableció un valor $\alpha_n = 1$ para todos los nodos considerando que no contamos con información cinética (ej: tasa de degradación, afinidad o fuerza de unión) suficiente sobre todas las moléculas representadas en la red, de tal manera que con un valor $\alpha_n = 1$ el nivel de expresión de cualquier nodo en estado estacionario está únicamente determinado por el grado de verdad o activación de la expresión algebraica w_n .

El estado inicial para las simulaciones continuas se estableció con base en los requisitos mínimos necesarios de la red para favorecer la progresión HSC \rightarrow LMPP. Esta configuración está determinada por la activación de los nodos *Ikzf1*, *Gfi1*, *Spi1* y *Runx1*. Adicionalmente, los nodos *Flt3L* y *Il7* se fijaron en valor 1, representando a un microambiente con disponibilidad de ambas moléculas de diferenciación. El sistema de ODEs fue simulado durante 100 iteraciones determinadas con simulaciones preliminares en las cuales se observó que después de este número de actualizaciones se llegaba a estados estables. Para facilitar el análisis de las simulaciones continuas, se consideró como una unidad de tiempo computacional cada 5 iteraciones. Es decir que cada simulación se corrió por 20 unidades de tiempo computacional, cada iteración representando 0.2 unidades. Las simulaciones continuas fueron calculadas usando la función *ode()* del paquete *deSolve* de R.

V.4 Análisis de estados de transición de la simulación continua de redes con mutaciones

Para la validación de la red eBCR, evaluamos el efecto de todas las mutaciones sencillas posibles, sobre la etapa de diferenciación temprana de la linfopoyesis B. Las mutaciones inducidas para cada nodo fueron: hiperactivación (OA), simulada como valor constitutivo igual a 1; y, nulo o noqueado (KO), simulado como una activación totalmente apagada o con un valor de activación igual a 0. Después de derivar cada uno de los mutantes de la red Booleana de tipo silvestre, seguimos la misma metodología para transformar las reglas lógicas y simular como un modelo continuo.

Después de actualizar el estado de la red durante 20 unidades de tiempo computacional, comparamos la simulación continua de cada una de las redes mutantes con la simulación continua de la red silvestre. Para ello, empleamos el índice o coeficiente de Jaccard que es una medida

estadística usada para determinar la similitud entre dos conjuntos, que en este caso corresponden a los vectores de estado de activación de los nodos de la red silvestre y las redes mutantes en cada paso de tiempo.

$$W_t = \{X_{n1(t)}, X_{n2(t)}, X_{n3(t)}, \dots, X_{nk(t)}\} [4]$$

$$M_t = \{Y_{n1(t)}, Y_{n2(t)}, Y_{n3(t)}, \dots, Y_{nk(t)}\} [5]$$

W_t y M_t representan la configuración o valor del vector estado de las redes de tipo silvestre y mutante en el paso de tiempo t , respectivamente. Se entiende como configuración de la red o valor del vector estado, al vector con los valores de activación de los nodos de cada una de las redes en el tiempo t .

Se calculó el índice de Jaccard para cada paso de tiempo en las simulaciones mutadas respecto a su contraparte en la red silvestre con la siguiente fórmula:

$$J(W, M)_t = \frac{|W_t \cap M_t|}{|W_t \cup M_t|} [6],$$

$|W_t \cap M_t|$ representa el número de nodos con el mismo valor de activación en el paso de tiempo t en la simulación continua de las redes W y M , mientras que $|W_t \cup M_t|$ representan los nodos en cada red que tenían un valor de activación diferente en el paso de tiempo t en la simulación de redes W y M . Para el cálculo del índice no consideramos el nodo knock-out o con expresión constitutiva en la red mutada, que por defecto reflejaría una divergencia entre los estados W_t y M_t incluso si el resto de los nodos tienen valores de activación idénticos. Los índices de Jaccard para todos los mutantes en cada paso de tiempo se trazaron en un mapa de calor y las transiciones se agruparon jerárquicamente para visualizar los estadios comunes donde las mutaciones perturban el proceso normal de diferenciación de células B. El código utilizado para la simulación del modelo y el cálculo de la distancia se incluye en la Información Suplementaria.

V.5 Análisis bioinformático de la base de datos dbDEMC 2.0 database

Como resultado de la revisión de literatura se identificó que algunos miRNAs podrían estar participando en el establecimiento de respuestas pro-inflamatorias durante los procesos oncogénicos mediante su unión a TLR-7 y TLR-8. En esta línea, realizamos un análisis bioinformático para mapear miRNAs desregulados en cáncer con potencial de unirse a TLR-7 y TLR-8, de acuerdo a lo propuesto por Fabbri et al., 2012. Para este mapeo usamos la base dbDEMC 2.0 (Yang et al., 2017) que contiene miRNAs desregulados en células de diferentes tipos de cáncer, recopilados por curación manual a partir de experimentos de baja dimensionalidad. Usando R para el análisis bioinformático, se seleccionaron los miRNAs sobreexpresados en los diferentes tipos de cáncer incluidos en la base

de datos. Empleando la base de datos disponible para descarga de miRbase (<http://www.mirbase.org/ftp.shtml>), obtuvimos la secuencia de cada uno de los miRNAs sobreexpresados en cáncer. Con las secuencias, filtramos aquellos miRNAs que tuvieran motivos “GU” en la posición 18-21. La expresión de guanina-uracilo en la posición 18-21 fue identificado por Fabbri y colaboradores (Fabbri et al., 2012) como el motivo necesario para que un miRNA active la vía de señalización río abajo de los TLR-7 u 8. Para la visualización del análisis, se construyó una red que conecta los miRNAs con motivos GU en posición 18-21, con los diferentes tipos de cáncer en los cuales han sido reportados como sobreexpresados.

V.6 Análisis de expresión de miRNAs en células de LLA pediátrica

Para identificar miRNAs específicamente sobreexpresados en células de LLA pediátrica, analizamos dos bases de datos disponibles en Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (Barret et al., 2012): GSE56489 (Duyu et al., 2014) y GSE23024 plataforma GPL10708. La base GSE56489 contiene la información de un microarreglo de perfiles de expresión de miRNA de muestras de MO de pacientes pediátricos con LLA y de individuos sanos. La base GSE23024 plataforma GPL10708 contiene los perfiles de expresión de miRNAs de células provenientes de diferentes tipos de leucemias y de células normales. Para el análisis bioinformático se descartaron los perfiles de expresión de leucemias de linaje mixto, de células CD34+ y de timocitos.

El análisis bioinformático se realizó en la plataforma en línea GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>), una herramienta basada en la paquetería limma-Bioconductor de R. GEO2R permite generar comparaciones entre perfiles de expresión a partir de la selección y clasificación manual de muestras. Para la selección de miRNAs sobreexpresados, el análisis se realizó con los parámetros predeterminados de la herramienta GEO2R y se obtuvieron los 250 miRNAs con expresión diferencial significativa entre los grupos leucémico y control. Para la visualización de los miRNAs sobreexpresados y los p-value correspondientes, se generaron diagramas de dispersión usando los valores de salida del análisis de GEO2R y R.

VI. RESULTADOS

VI.1 Reconstrucción de la red de diferenciación temprana de células B

La red de regulación (Figura 6) y las reglas booleanas asociadas (Tabla 2), propuestas para la construcción del modelo de diferenciación temprana de células B, fueron generadas a partir de la curación manual de datos experimentales reportados en la literatura y bases de datos públicas. Los reportes revisados incluyen, principalmente, experimentos en líneas celulares y, experimentos *in vitro* e *in vivo* con células murinas y humanas. Los nodos semilla considerados para iniciar la reconstrucción de la red representan factores transcripcionales determinantes durante la linfopoyesis temprana, incluyendo Ikaros (nodo *Ikzf1*), PU.1, FoxO1 (nodo *Foxo1*), EBF1 (nodo *Ebf1*), E2A (nodo *Tcf3*), Aiolos (nodo *Ikzf3*), PAX5 e IRF4. Algunas de las regulaciones entre estos factores transcripcionales fueron tomadas de las referencias reportadas en redes de diferenciación hematopoyética publicadas previamente (Mendoza & Méndez 2015; Collombet et al. 2017).

Los factores Ikaros 1, PU.1 y FoxO1 participan en una etapa de diferenciación muy temprana, durante la especificación linfoide/mieloide. Cuando PU.1 se encuentra altamente expresado (nodo *Spi1_2*), las células progenitoras diferencian hacia la rama mieloide, mientras que su expresión intermedia (nodo *Spi1_1*) induce la especificación linfoide, mediante la regulación positiva de RUNX1 (nodo *Runx1*) e Ikaros. El nivel intermedio de PU.1 es mantenido por los factores transcripcionales GFI1 (nodo *Gfi1*) y E2A (Huang et al. 2008; Spooner et al. 2009; Rogers et al. 2016; Zarnegar & Rothenberg 2012). Para los dos niveles de expresión de PU.1, consideramos dos nodos independientes representados como *Spi1* y *Spi1_2* en la red. RUNX1 es también un activador de Ikaros, EBF1 y el factor de transcripción mieloide CEBP/α (nodo *Cebpa*) (Guo et al., 2012).

Durante el compromiso hacia el linaje linfoide, la expresión del receptor FLT3 (nodo *Flt3*) es inducida por Ikaros y PU.1. La señalización de FLT3 al unirse con su ligando (nodo *Flt3_a*), en cooperación con PU.1 y FoxO1, promueve la transcripción de IL-7Rα, una de las cadenas del receptor para IL7 (nodo *Il7r*). La expresión del receptor para IL7 define el fenotipo CLP (Welner, Pelayo & Kincade 2008; Nodland et al., 2011). La estimulación del receptor de IL-7 (*Il7_a*), activa la vía JAK2, responsable de la fosforilación de STAT5 (nodo *STAT5*) que induce su dimerización y translocación al núcleo, donde, al unirse a distintas secuencias promotoras, activa la transcripción de los genes codificantes para EBF1, IRF4 (nodo *Irf4*) y PAX5 (nodo *Pax5*).

La activación de EBF1 en las células pro-B completa el conjunto de factores de transcripción necesarios para inducir la expresión de las recombinasas 1 y 2 (nodo *Rag*). Las recombinasas RAG 1

y 2 realizan los re-arreglos genéticos necesarios para la expresión del pre-BCR (nodo pre-BCR) y la transición hacia células pre-B (Welner, Pelayo & Kincade 2008; Nodland et al., 2011). El mecanismo de activación del pre-BCR aún no está completamente claro pero se ha sugerido que después de localizarse en las balsas lipídicas de la membrana celular, el receptor es activado por la unión de sus cadenas λ 5 y/o su unión con un componente de matriz extracelular, galectina-1 (Übelhart et al. 2010; Gauthier et al. 2002). La señalización de pre-BCR está representada en la red por la proteína enlazadora de células B, BLNK, también conocida como SLP65 o BASH (nodo SLP65). La expresión de SLP65, previa a su activación por el pre-BCR, es inducida por FoxO1 y PAX5. A su vez, SLP65 antagoniza la señalización por IL-7. SLP65 incrementa la acumulación de FoxO1 en el núcleo, factor que permanece regulado a la baja por la señalización de IL-7 a través de PI3K (nodo PI3KIA). El incremento de actividad de FOXO1 en el núcleo consolida la expresión de IRF4 (nodo Irf4), que induce la transcripción de un segundo factor de dedos de zinc de la familia Ikaros, Aiolos (Ochiai et al. 2012).

La co-expresión de Ikaros y Aiolos disminuyen, en distintos tipos celulares, la expresión de integrinas como VLA-5, CD90 y L-selectina (Churchman & Mullighan 2017; Joshi et al. 2014; Li et al. 2014). Basándonos en estos reportes, proponemos que la co-expresión de estos factores puede también regular negativamente la expresión de la integrina VLA-4. Esta suposición es congruente con la disminución de la capacidad de las células pre-B, células con expresión concomitante de Ikaros y Aiolos, para adherirse al receptor VCAM-1 expresado por las células estromales (nodo VCAM1/VLA4) (Tokoyoda et al. 2004).

El paso final para la transición de células pre-B a células B inmaduras involucra una segunda activación de RAG1 y 2, que ocurre río abajo de la señalización de pre-BCR. Durante esta expresión de recombinasas se da lugar a la recombinación y unión de los segmentos V y J de la cadena ligera del BCR. Después de la expresión de las cadenas ligeras, el BCR se trasloca a la membrana celular (nodo BCR).

Considerando nuestro interés en extender el trabajo previo sobre la influencia de estímulos pro-inflamatorios en los ejes moleculares CXCR4/CXCL12 y VCAM1/VLA4 en el probable mantenimiento de enfermedades linfoproliferativas, incluimos las vías de señalización activadas río abajo de la activación y regulación de CXCR4 y de VLA4 en las células progenitoras hematopoyéticas previamente curadas para la red reportada en Enciso et al., 2016. Entre ellas, la regulación por la vía de NF- κ B (nodo NF κ B) de CXCR4 (nodo Cxcr4) y el receptor alternativo para CXCL12, CXCR7 (nodo Cxcr7). A su vez, la vía NF- κ B es activada por SLP65 río abajo de la activación del pre-BCR (Schebesta, Pfeffer & Busslinger, 2002; Kersseboom et al., 2003).

Las reglas booleanas de los nodos Il7r_a y Flt3_a, así como los nodos Ikzf3 y Rag, se sustituyeron directamente en las reglas booleanas de sus nodos blanco para reducir el tamaño de la red y facilitar las simulaciones computacionales del modelo Booleano (Tabla 2).

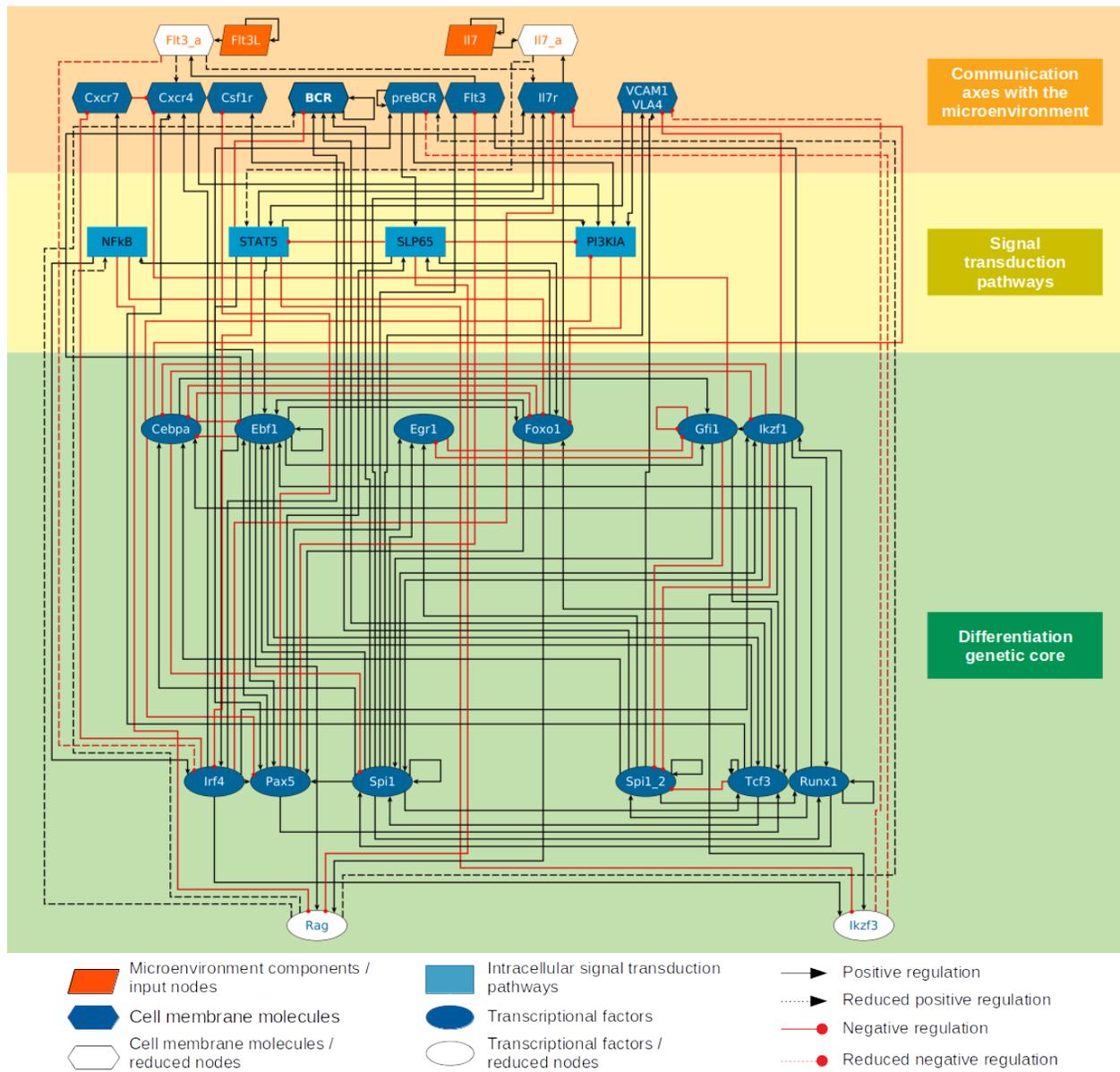


Figura 6. Red de regulación de la diferenciación temprana a linfocitos B (early B cell regulation, eBCR). La red está compuesta por 30 nodos, que fueron reducidos a 26 a través de la integración de la regla lógica de los nodos reducidos en la regla lógica los nodos que regulan, como se describe en Enciso, Pelayo & Villarreal 2019.

Tabla 2. Reglas lógicas propuestas para la simulación Booleana de la red eBCR. Las reglas lógicas de los componentes reducidos (gris) fueron introducidas directamente en las reglas lógicas de sus nodos blanco. Los operadores Booleanos están representados con los símbolos & (AND), | (OR) and ! (NOT).

Node	Boolean rule
Flt3L	Flt3L
Il7	Il7
BCR	Spi1 & Tcf3 & Irf4 & !STAT5 & (Rag BCR)
	Spi1 & Tcf3 & Irf4 & !STAT5 & ((Ebf1 & Foxo1 & !(SLP65 NFkB)) BCR)
VCAM1_VLA4	(Spi1 Spi1_2) & !(Ikzf1 & Ikzf3)
	(Spi1 Spi1_2) & !(Ikzf1 & Irf4 & !STAT5)
preBCR	Ebf1 & !Ikzf3 & (Rag preBCR)
	Ebf1 & !(Ikzf1 & Irf4 & !STAT5) & ((Ebf1 & Foxo1 & !(SLP65 NFkB)) preBCR)
Csf1r	Spi1_2 & !Pax5
Cxcr4	Tcf3 & !(Gfi1 Flt3_a Irf4) & !Cxcr7
	Tcf3 & !(Gfi1 (Flt3 & Flt3L) Irf4) & !Cxcr7
Cxcr7	NFkB & !Irf4
Flt3	Ikzf1 & Spi1 & !Pax5
Flt3_a	Flt3 & Flt3L
Il7r	Spi1 & Foxo1 & (Flt3_a (STAT5 & Ebf1)) & !(Cebpa Irf4)
	Spi1 & Foxo1 & ((Flt3 & Flt3L) (STAT5 & Ebf1)) & !(Cebpa Irf4)
Il7r_a	Il7r & Il7
STAT5	Il7r_a & VCAM1_VLA4 & !SLP65
	Il7r & Il7 & VCAM1_VLA4 & !SLP65
PI3KIA	(preBCR (VCAM1_VLA4 & Cxcr4) Cxcr7) & !SLP65 & !(Cebpa STAT5)
NFkB	SLP65 Rag
	SLP65 (Ebf1 & Foxo1 & !(SLP65 NFkB))
SLP65	preBCR & (Foxo1 Pax5)
Cebpa	(Spi1 Runx1) & !(Ebf1 Foxo1 Ikzf1) (Runx1 & Spi1_2)
Ebf1	Tcf3 & Runx1 & ((STAT5 & Foxo1) (Spi1 & Ebf1 & Pax5)) & !Cebpa
Egr1	(Spi1 & !Gfi1) Spi1_2 Pax5
Foxo1	(Tcf3 Ebf1) & !(PI3KIA !NFkB SLP65) & !Cebpa
Gfi1	((Ikzf1 Cebpa) & !(Egr1 Gfi1) Ebf1)
Ikzf1	(Runx1 & Spi1 & !Cebpa) Irf4
Ikzf3	Ikzf1 & Irf4 & !STAT5
Irf4	(NFkB Ebf1) & !((Flt3 & Flt3L) STAT5)
Pax5	Spi1 & (STAT5 (Ebf1 & Foxo1 & Irf4)) & !Cebpa
Rag	Ebf1 & Foxo1 & !(SLP65 NFkB)
Spi1	Runx1 & ((Gfi1 Tcf3) (Spi1 & Ikzf1)) & !Cebpa
Spi1_2	Runx1 & !(Gfi1 Tcf3) (Spi1_2 & !Ikzf1)
Tcf3	(Ikzf1 Spi1 Pax5) & (Tcf3 Ebf1 Gfi1)
Runx1	(Spi1 Spi1_2) & (Runx1 Ikzf1)

Mediante la integración de la información disponible de la linfopoyesis temprana de células B tanto en ratón como en humano, hemos reconstruido una red que integra tres módulos: factores transcripcionales reguladores de la diferenciación temprana de células B, ejes moleculares de comunicación con el microambiente y moléculas de transducción de vías de señalización. La red final está conformada por 26 nodos incluyendo dos nodos de entrada: Il7 y Flt3; seis moléculas de membrana celular: CXCR4, CXCR7, Flt3, Il7r, preBCR y VCAM1_VLA4; cuatro elementos de transducción de señales: NFkB, STAT5, SLP65 y PI3KIA; 12 factores transcripcionales: Cebpa, Ebf1, Egr1, Foxo1, Gfi1, Ikzf1, Irf4, Pax5, Spi1, Spi_2, Tcf3 y Runx1; y dos nodos de salida, Csf1r y BCR. Para fines prácticos la red resultante se identificará como red de regulación temprana de linfocitos B (eBCR).

La recopilación detallada de las referencias revisadas para la reconstrucción de la red y el desarrollo de las reglas lógicas se puede encontrar en el Anexo 1.

VI.2 Simulación Booleana de la red eBCR: recuperación de estadios de la diferenciación temprana de linfocitos B

La red de regulación genética fue simulada como un modelo Booleano de forma exhaustiva para los esquemas de actualización síncrono y asíncrono (Figura 7). De la simulación síncrona se recuperaron 20 atractores de los cuales cuatro corresponden a atractores nulos identificados como no hematopoyéticos o NH. Los atractores restantes se clasificaron en siete fenotipos de acuerdo al estado de activación de nueve factores de transcripción y moléculas de membrana.

Cuatro atractores de punto fijo se clasificaron como progenitores de granulocitos y macrófagos (GMP) por la activación de los nodos que representan el receptor del factor estimulante de colonias 1 (Csf1r), Cebp/ α (Cebpa), un alto nivel de PU1 (Spi1_2), así como la ausencia de activación de marcadores de linaje linfoide. Los siguientes cuatro atractores corresponden a un fenotipo LMPP caracterizado por un nivel intermedio de PU.1 (Spi1), la activación de Ikzf1, FoxO1, E2A/Tcf3 y particularmente FLT3. De los cuatro atractores LMPP, dos corresponden a atractores cíclicos que ciclan en la activación/inactivación de CXCR4, PI3KIA, Egr1 y Gfi1. Dichos atractores fueron identificados como mLMPP debido a su compatibilidad con un estado migratorio asociado a la modulación de Egr1 (Bettini, Milbrandt & Kersh 2002; Min et al., 2008). Como consecuencia a la activación intermitente Egr1, Gfi1 inhibe a CXCR4, involucrado en el mantenimiento de las células HSPC en proximidad con los nichos de diferenciación hematopoyética de la MO (Cordeiro Gomes et al., 2016). Con la activación del nodo de entrada FLT3L, se recuperan dos atractores CLP, cuya

característica principal es la expresión del receptor de IL-7 (Il7r). Al activar IL7, los atractores CLP transicionan a uno de los dos atractores cíclicos o complejos en el caso de las simulaciones asíncronas, con el fenotipo pre-B, identificado por la expresión del nodo preBCR y expresión intermitente de Pax5 e Irf4. Finalmente, cuatro atractores de punto fijo fueron asociados a células B inmaduras con expresión estable de los nodos BCR, Pax5 e Irf4.

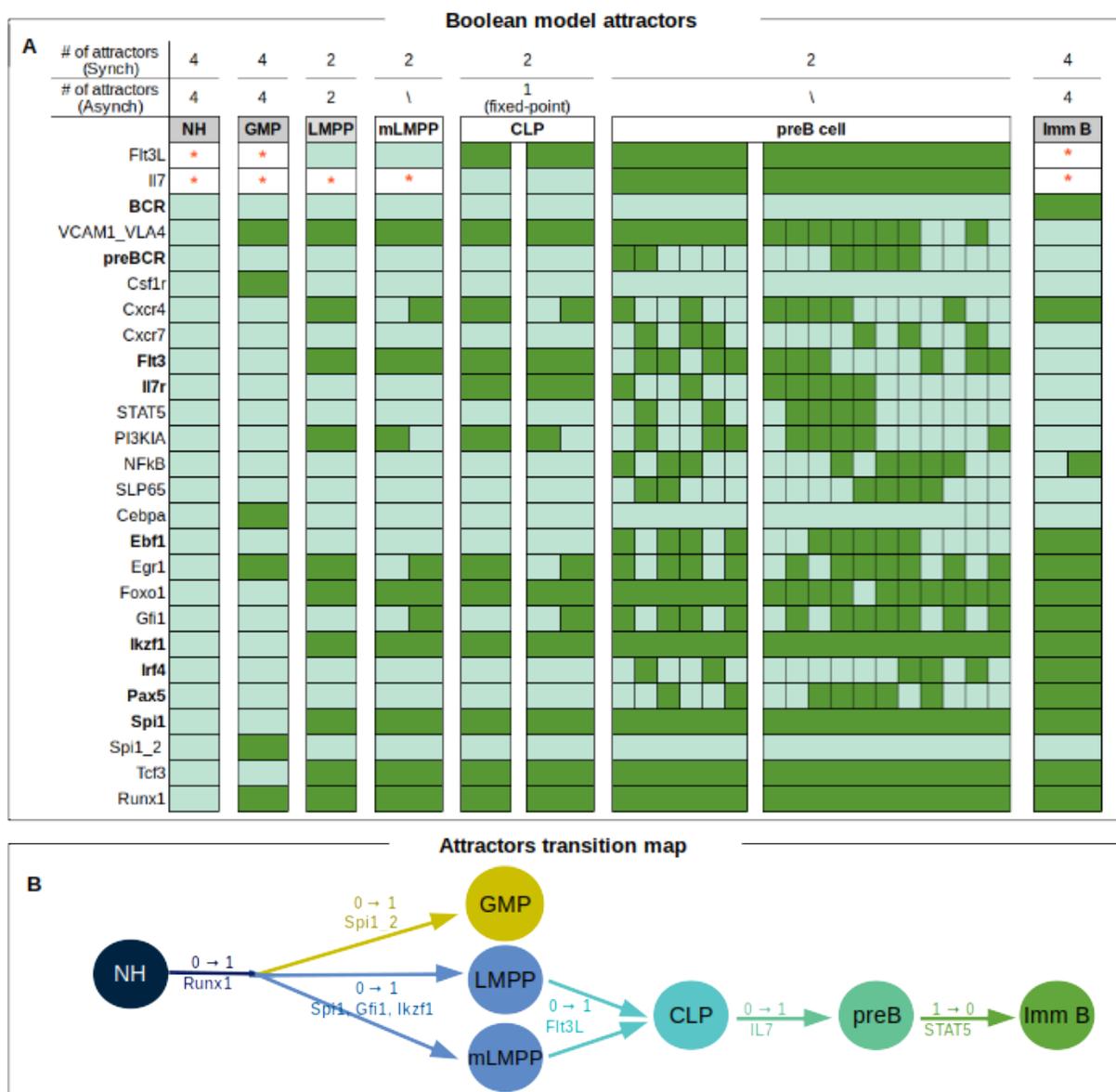


Figura 7. Atractores síncronos y asíncronos recuperados después de la simulación computacional de la red eBCR como modelo Booleano. Los atractores fueron etiquetados de acuerdo con su compatibilidad con las etapas celulares de la linfopoyesis B. Los marcadores linfoides utilizados para esta clasificación se destacan en negritas. La transición entre los fenotipos recuperados se asemeja a los eventos *in vivo* que ocurren durante la diferenciación de células B en la MO.

VI.3 Transformación del modelo Booleano a semi-continuo: recuperación de estadios linfoides intermedios

La red Booleana fue transformada a modelo semi-continuo reemplazando las reglas lógicas con funciones que satisfacen la lógica de Zadeh basada en mínimos y máximos. Las nuevas funciones fueron introducidas en un sistema de ecuaciones diferenciales de acuerdo al método propuesto por Villarreal y colaboradores. Como estado inicial de la red para todas las simulaciones, se fijó la configuración de red mínima necesaria para la progresión a LMPP en presencia de IL7 y Flt3L: FLT3L=1, IL7=1, BCR=0, VCAM1_VLA4=1, preBCR=0, Cxf1r=0, Cxcr4=1, Cxcr7=0, Flt3=1, Il7r=0, STAT5=0, PI3KIA=1, NFkB=0, SLP65=0, Cebpa=0, Ebf1=0, Egr1=1, Foxo1=1, Gfi1=0, Ikzf1=1, Irf4=0, Pax5=0, Spi1=1, Spi1_2=0, Tcf3=1, Runx1=1.

La simulación continua recuperó la transición gradual de LMPP hacia CLP, preB y estabilizándose en el atractor de célula B inmadura (Imm B). La simulación continua (Figura 8A) evidencia estados transitorios y progresivos de los nodos como la modulación del factor mieloide Cebpa durante los estadios LMPP y CLP, tipos celulares que experimentalmente muestran potencial granulocítico residual (Guo et al., 2018; Karamitros et al., 2018). En la etapa pre-B, se evidencia el aumento y la posterior modulación de SLP65 y NF- κ B río abajo de la activación del preBCR, que a su vez se regula a la baja después de la activación de Irf4. La activación transitoria de la vía NF- κ B durante la linfopoyesis se ha asociado a un ciclo de retroalimentación negativa con RAG para estabilizar los eventos de recombinación de ADN (Ochodnicka-Mackovicova et al., 2015).

En la simulación continua de LMPP a B inmadura se identificaron 5 etapas de acuerdo a la expresión de IL7r y CXCR4 que podrían dar soporte a la hipótesis sobre la transición entre nichos durante la diferenciación linfóide (Uto-Konomi et al., 2013; Zabel et al., 2009): IL7r⁺CXCR4^{high} (CLP y prepro-B), IL7r^{high}CXCR4⁻ (pro-B), IL7r^{low}CXCR4^{low} (pre-B) y IL7r⁻CXCR4^{high} (B inmadura). A lo largo de estas etapas observables en la Figura 8A el incremento de IL7r, cuya máxima activación es alcanzada en los fenotipos de células pre-proB, indicaría una mayor probabilidad de estas células de encontrarse o migrar hacia nichos mesenquimales con expresión de IL7, un factor necesario para la progresión de la diferenciación de linfocitos B. Posterior a la máxima expresión de IL7r y CXCR4, se observa la disminución de la activación de CXCR4 en paralelo al incremento gradual de la activación de CXCR7, un receptor que inhibe a CXCR4 por formación dímeros y que es más responsivo a CXCL12. El incremento de CXCR7 sugeriría que las células pro-B son capaces de migrar

nuevamente hacia un nicho con baja producción de CXCL12 cuyas concentraciones no pueden inducir eficientemente la migración a través de CXCR4, o incluso una inducción de la migración por algún ligando específico de CXCR7.

Incluso cuando no hay evidencia directa de actividad CXCR7 en estadios tempranos de la linfopoyesis, el promotor CXCR7 contiene sitios de unión para el factor transcripcional c-Myb, cuya inhibición en los progenitores linfoides bloquea la transición de CLP a célula Prepro-B (Greig et al., 2010). Además, el análisis de microarreglos de RNA de células progenitoras linfoides muestran expresión de CXCR7 (datos no mostrados, análisis de la base GEO:GSE64919 en Geo2R), sugiriendo un probable papel durante estadios de diferenciación en la médula ósea. De especial interés, datos recientes de nuestro laboratorio han revelado la formación de un nicho hematopoyético CXCL11+ en la leucemia (Balandrán, 2019, datos no publicados). El nicho especializado CXCL11+, que está ausente en condiciones normales, es probablemente colonizado por células CXCR7+ encontradas en LLA (Jalili et al., 2008).

Hallazgos principales

- *Con la simulación y visualización del modelo continuo se identifican los estadios transitorios entre LMPP y el atractor correspondiente a célula B inmadura.*
- *Entre las transiciones de interés, se identifica la modulación de CXCR4 en presencia de NF- κ B y CXCR7, y su posterior reactivación inducida directa e indirectamente por IRF4.*

VI.4 Evaluación de redes mutantes con modelos semi-continuos

Para validar la red eBCR, generamos redes con mutaciones puntuales de expresión constitutiva y expresión nula para cada uno de los nodos de la red y simulamos su transición desde el atractor LMPP. Luego, comparamos las transiciones de cada una de las 52 simulaciones mutantes con la transición de la red silvestre y evaluamos la divergencia calculando índice de Jaccard en cada paso de tiempo (Figura 8B). Con la excepción de tres redes mutantes, el efecto de las activaciones constitutivas y expresiones nulas replicaron perturbaciones o arrestos en los mismos estadios de diferenciación que en observaciones experimentales reportadas en la literatura. Las tres excepciones incluyen redes con mutaciones Flt3, knock-out (KO) y expresión constitutiva (OA), y la red con OA de Egr1.

La evidencia experimental de la inhibición de Flt3 indica que la perturbación en la diferenciación ocurre en el estadio de LMPP y no en el estadio CLP como sugieren las simulaciones (Zriwil et al., 2018). Por otro lado, los reportes experimentales de expresión constitutiva de Flt3 indican una perturbación en la transición de CLPs hacia progenitores de células B en lugar de los estadios pro-B/pre-B (Holmes et al., 2006). Esta discrepancia puede resultar de la regulación de factores río abajo de la expresión de Flt3, elementos que no fueron incluidos en la red eBCR. En el caso de la simulación de Egr1 OA, se observó un bloqueo completo del desarrollo de células B en la etapa LMPP, en contraste con la literatura que indica que el aumento de la expresión de Egr1 afecta a la población más primitiva LT-HSC y participa en el desarrollo de diferentes tipos de leucemia (Tian et al., 2016).

La simulación de las redes mutantes también proporciona información sobre la influencia de las perturbaciones en el núcleo de diferenciación transcripcional. Las mutaciones se pueden agrupar en i) aquellas que bloquean completamente la diferenciación y ii) aquellas que perturban la transición pero convergen en el atractor de célula B inmadura. En el último grupo, encontramos nodos que representan vías de señalización (i.e. PI3KIA OA y KO, Cxcr4 OA y KO, Cxcr7 OA y NFkB KO) y nodos que representan factores de transcripción con participación en la inducción de apoptosis o proliferación (i.e. Tcf3 OA, Gfi1 OA y Ebf1 OA). Entre los nodos que bloquean la diferenciación agrupamos a aquellos que arrestan el proceso en el estadio LMPP, CLP, pre-B o, en la transición entre preB y pro-B. Estos grupos que indican la etapa de perturbación se identifican por el código de colores a la derecha del mapa de calor en la Figura 8B. La información sobre el efecto de cada una de las perturbaciones en el modelo y los reportes experimentales se encuentra detallada y referenciada en el Anexo 2.

Entre las mutantes incluidas en las simulaciones, la sobreexpresión de Egr1, Gfi1 e IL7r ha sido asociada al desarrollo de leucemias. La ganancia de función del receptor para IL7 y Egr1 que en nuestras simulaciones generan un arresto en el fenotipo LMPP, han sido asociadas al desarrollo de leucemias mieloides, leucemias linfoides y linfomas (Shochat et al., 2011; Tian et al., 2016). Por otro lado, la sobreexpresión de Gfi1, que genera una perturbación transitoria respecto a la simulación de la red silvestre, ha sido sugerida como inductor de la proliferación de las células de LLA (Purizaca et al., 2013).

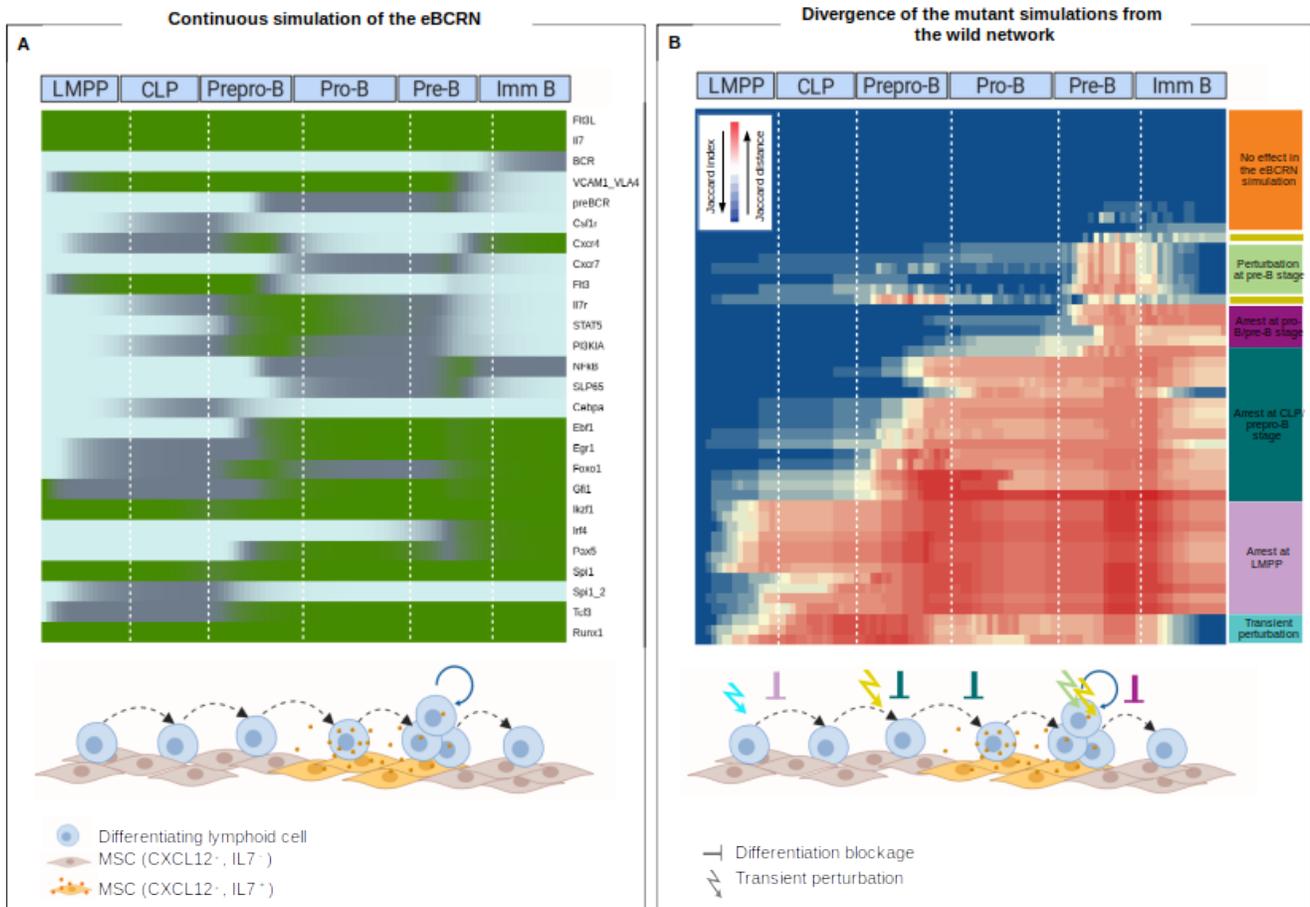


Figura 8. Redes eBCR de tipo silvestre (*wt*) y mutantes simuladas como modelos semi-continuos. A) Simulación de la red *wt*. La ilustración representa la transición entre nichos de la MO inducida por los ejes IL7/CXCL12 durante el proceso de diferenciación. El mapa de calor refleja el estado de activación para cada nodo simulado durante 100 iteraciones (azul claro = nulo o bajo nivel de activación, gris = valores intermedios de activación, verde = valores altos de activación). Las etiquetas superiores indican el fenotipo celular compatible con el patrón de activación de los nodos a lo largo de la simulación continua de la red. B) Representación de la divergencia entre las simulaciones de las redes mutantes respecto a la simulación de la red *wt*, empleando índices de Jaccard. Las redes mutantes están agrupadas de acuerdo a una clasificación jerárquica no supervisada según la etapa de desarrollo donde la simulación diverge de la simulación de la red *wt*. Cada grupo de mutantes es identificado por los bloques en el eje X identificados en la columna derecha del mapa de calor, indicando la etapa de la simulación en la cual ocurre la mayor perturbación o arresto en la diferenciación (menor índice de Jaccard representado por el color rojo en el mapa de color). Las redes mutantes que integran cada bloque pueden ser consultadas en la tabla complementaria a esta figura en donde también se comparan los resultados de la simulación de mutantes con los hallazgos experimentales (Anexo 2).

VI.5 Inducción de NF-kB: obtención de precursores B aberrantes CXCR7⁺

En seguimiento a hallazgos previos de nuestro laboratorio sobre la influencia de moléculas proinflamatorias en la generación de un microambiente patológico de onco-promoción (Vilchis-Ordoñez et al., 2015; Balandrán et al., 2016; Enciso et al., 2016), decidimos analizar el efecto de perturbaciones de NF-kB en la red de diferenciación temprana de linfocitos B. Por un lado, la red nula para NF-kB (NFkB KO) convergió después de 20 pasos al mismo atractor que la red de tipo silvestre. Sin embargo, la expresión constitutiva de NF-kB resultó en un atractor arrestado entre el fenotipo CLP y el prepro-B (Figura 9A). En la literatura, la sobreexpresión de NF-KB induce la movilización de los progenitores linfoides a sitios extramedulares por la disminución de expresión de CXCL12 por las células estromales (Ueda et al., 2004; Enciso, Mendoza & Pelayo, 2015).

El atractor híbrido CLP/pre-proB, obtenido con una activación constitutiva de NF-kB, mostró un nivel de expresión alto de Flt3, una activación intermedia de Gfi1 y Egr1, y baja activación de Cebpa. La expresión constitutiva de NF-kB inhibe a Foxo1, un factor indispensable para la expresión de Il7r, impidiendo la progresión completa a prepro-B. Al analizar la transición del estado inicial hasta el atractor híbrido CLP/prepro-B, encontramos que los nodos mieloides Csfr1 y Spi1_2 extendieron su activación en comparación con la transición normal, mientras que los marcadores linfoides como Gfi1 y Foxo1 fueron regulados a la baja (Figura 8B). Esto implica un hallazgo interesante ya que se ha reportado que los ligandos TLR, a través de la vía de señalización canónica Myd88/NF-kB, son capaces de redirigir la hematopoyesis en la MO hacia un destino mieloides, acompañado de la salida de progenitores linfoides hacia sitios extramedulares (Nagai et al., 2006).

Sin embargo, mientras que la inflamación aguda, entendida como un proceso biológico abrupto que ocurre generalmente como una respuesta inmediata ante un estímulo externo al organismo (por ejemplo, la entrada de un alérgeno al organismo, un corte o golpe que lleve a la ruptura de un tejido), puede entenderse como un fenómeno de todo o nada -como en las simulaciones KO y OA-, nuestra hipótesis es que el proceso proinflamatorio que participa en el origen y progresión de la LLA es un fenómeno crónico, continuo y de progresión lenta. Para probar esta hipótesis computacionalmente, modificamos la regla lógica de NF-kB, reemplazando las regulaciones de otros nodos por una autorregulación negativa que induce una activación constitutiva intermedia (NFkB=0.5). Esta condición produjo la aparición de un atractor tipo pre-B (*preB-like*) alrededor de la iteración 40, mientras que todas las simulaciones anteriores llegaron a sus atractores entre los pasos 20 y 30 (Figura 9A). A diferencia del perfil pre-B, el atractor emergente *preB-like* expresa valores intermedios para los nodos Egr1, Ebf1, Gfi1 y Pax5 (Figura 9B). Al graficar de manera independiente,

el valor de activación de para cada nodo en la red silvestre y en la red con expresión intermedia de NF-kB notamos que la exoesión ocurre de manera similar en ambas redes hasta el punto de transición de pro-B a pre-B, en donde algunos nodos no alcanzan los niveles de activación observados en la simulación de la red silvestre, entre ellos los nodos Cxcr4, Il7r, STAT5, Ebf1, Foxo1 y Gfi1 (Figura 9D).

Para evaluar si la progresión al atractor preB-like depende del estado de diferenciación en el que se induce la activación intermedia de NF-kB, ejecutamos múltiples simulaciones variando el estado inicial de la red de acuerdo a los atractores recuperados en el modelo Booleano síncrono (Figura 9C). Solo ocho simulaciones de 26, convergieron en el atractor preB-like, incluyendo las simulaciones que iniciaron en LMPP, uno de los dos estados del atractor mLMPP cíclico y sólo cinco de los 17 estados que componen los atractores cíclicos pre-B. Ninguna de las simulaciones iniciadas en los estados del atractor CLP fueron susceptibles a la activación intermedia de NF-kB.

Estos resultados sugieren que el efecto de NF-kB en las células progenitoras y precursoras linfoides depende del nivel de activación y la etapa de diferenciación en la que ocurre la perturbación. NF-kB influye en los ejes de comunicación hematopoyético-microambiente, inhibiendo CXCR4, regulando positivamente a CXCR7 y manteniendo en un mayor nivel de activación a VCAM-1. Además, afecta directamente la función de los factores de transcripción involucrados en el proceso de diferenciación y estabiliza fenotipos aberrantes que conducen al bloqueo de la linfopoyesis. El fenotipo teórico de una población preB-like lo hace una población candidata a ocupar los nichos CXCL12 en la MO y, susceptible a las señales microambientales a través de Flt3 y IL7 promotoras de supervivencia y proliferación.

Hallazgos principales

- *La activación constitutiva de NF-kB induce un arresto en la diferenciación linfóide en un estadio híbrido o intermedio entre CLP y pre-proB, con una alta activación de CXCR7.*
 - *La activación intermedia de NF-kB (simulada con un valor de 0.5) redirige la diferenciación a un atractor aberrante de fenotipo preB-like. Este redireccionamiento es dependiente del estadio de diferenciación en el cual se induce la activación intermedia de NF-kB.*
-

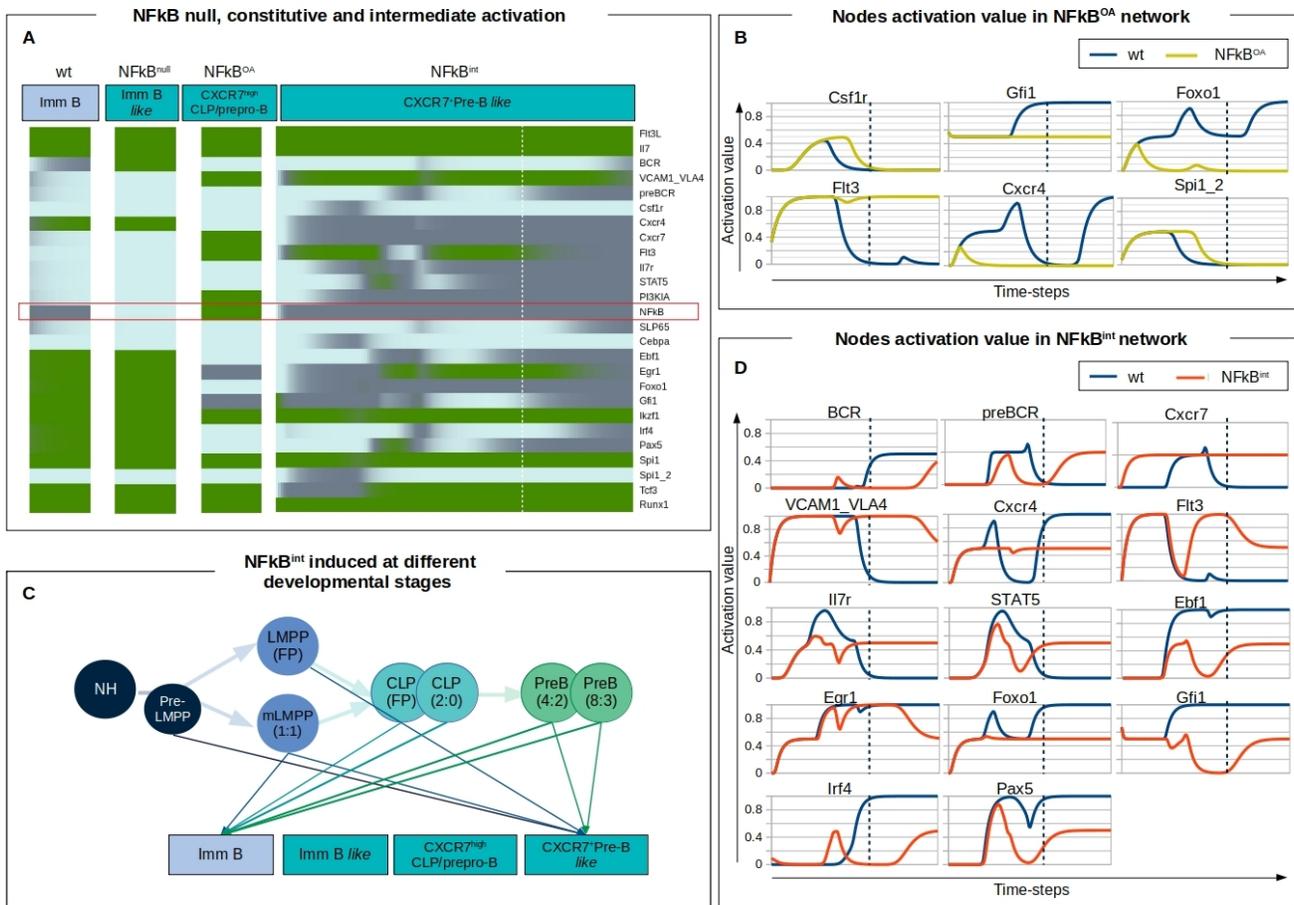


Figura 9. La activación constitutiva de NF-κB induce un bloqueo en fenotipos aberrantes. A) Simulación del modelo semi-continua de redes eBCR mutantes para NF-κB, incluida la inhibición completa (NFκB = 0) y dos niveles de activación constitutiva (OA, sobreactivación: NFκB = 1, e int, activación intermedia: NFκB = 0.5). B y D) Nodos representativos en la simulación de la red NFκB OA y NFκB int, respectivamente, representados de manera individual para comparar su estado de activación a lo largo de la simulación de ambas redes. La gráfica representa el estado de activación durante las simulaciones realizadas por 100 iteraciones. C) La inducción de un valor intermedio de NF-κB en diferentes etapas de desarrollo deriva en atractores diferentes, en algunos casos llegan al atractor final de célula B inmadura (Imm B), y en otros la simulación culmina en un fenotipo aberrante tipo pre-B.

VI.6 Identificación *in silico* del potencial de unión de miRNAs sobrepresados en cáncer y particularmente LLA, a TLR8

La gran acumulación de estudios realizados para identificar miRNAs desregulados en el cáncer, ha impulsado a la creación de bases de datos que tienen como objetivo reunir y organizar datos de diferentes recursos. Para determinar la influencia de la acción de los miRNAs como ligandos TLR en diferentes tipos de cáncer, analizamos un conjunto de base de datos dbDEMC 2.0, que recopila información de expresión diferencial de miRNAs en cánceres humanos (Yang et al., 2017). La base de datos utilizada contiene información recogida manualmente de 355 experimentos que

identifican la expresión diferencial de miRNAs por métodos de baja escala en células de 31 tipos de cáncer. Basados en la evidencia de Fabbri y colaboradores, que demostraron que los motivos GU en la región 18-21 de los miRNA del cáncer de pulmón eran cruciales para unir y activar el TLR8 (Fabbri et al., 2012), el análisis bioinformático realizado consistió en la identificación de miRNAs con motivos GU en la región de los nucleótidos 18-21. De los 355 miRNAs iniciales, 215 estaban sobreexpresados en los diferentes tipos de cáncer y 57 incluían el motivo GU entre la posición 18-21. Los 57 miRNAs estaban vinculados a 26 de los 31 tipos diferentes de cáncer en la base de datos (Figura 10). Cerebro, colon y linfoma fueron los tres tipos de cáncer vinculados a un mayor número de miRNAs con el motivo GU, miRNAs_{GU(18-21)}. Estos tres tipos de cáncer se encuentran entre los 10 cánceres con más miRNAs sobreexpresados en la base empleada, por lo que el alto número de miRNAs_{GU(18-21)} al final del análisis podría asociarse a la proporción de trabajos de investigación publicados y revisados para la curación de la base de datos, no necesariamente a un fenómeno biológico. Sin embargo, esto no disminuye la importancia de la abundancia de miRNAs_{GU(18-21)} en células cancerosas que predisponen al establecimiento de una inflamación mediada por TLR8, la cual podría estar involucrada en la progresión del cáncer.

Para evaluar la participación de miRNAs_{GU(18-21)} con mayor especificidad en la LLA, analizamos los perfiles de expresión de dos conjuntos de datos disponibles en la plataforma GEO (Barrett et al., 2012). A partir del conjunto de datos GSE56489_GPL10708 (Duyu et al., 2014) comparamos la expresión de miRNAs en 43 muestras de MO de pacientes pediátricos con LLA, contra los 14 perfiles de donantes pediátricos sanos. En el caso de la base GSE23024, comparamos las 71 muestras de LLA contra el perfil de expresión de 7 MO normales. Utilizando la herramienta en línea GEO2R, identificamos los miRNAs sobreexpresados en las muestras de LLA, y siguiendo los mismos criterios aplicados para la base de datos dbDEMC 2.0 indentificamos el conjunto de miRNAs_{GU(18-21)}. De las dos bases de datos elegimos los tres miRNAs con las expresiones más altas y los mejores p-values. Los tres candidatos potenciales sobreexpresados en la médula ósea de los pacientes con LLA que podrían estar desempeñando un papel como inductores de pro-inflamación en la MO leucémica, a través de su unión a TLR8 fueron: miR-146a-5p, miR-181b-5p y miR-199b-3p (Figura 11).

En colaboración con el laboratorio de Biología Computacional del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se realizaron análisis de docking molecular en Haddock mediante los cuales se confirmó el potencial de unión de miR-146a-5p, miR-181b-5p y miR-199b-3p a TLR8 (Anexo 2). Para dichas simulaciones se consideraron las interacciones moleculares con el sitio 2 del TLR8, reconocido como el sitio de unión y activación por hebras sencillas de ARN viral. De los tres miRNAs

VII. DISCUSIÓN

En el presente estudio, hemos reconstruido y evaluado una red que integra factores involucrados, a diferentes niveles, en la linfopoyesis B temprana. La simulación de la red eBCR como modelo Booleano fue capaz de recuperar los estados de activación para LMPP, CLP, células pre-B y células B inmaduras. Como modelo continuo, se recuperaron patrones adicionales: prepro-B y pro-B. La mayoría de las simulaciones mutantes mostraron los efectos reportados en la literatura, particularmente aquellas que inducen un bloqueo completo en alguna etapa de diferenciación. Las mutaciones que no provocaron efectos significativos en el atractor o que únicamente inducen perturbaciones temporales mostraron mayoritariamente un efecto en la etapa pre-B, una fase de caracterizada por una expansión clonal muy activa. A pesar de que la red transcripcional aparentemente no se ve afectada, su perturbación puede influir en la proliferación, recombinación y selección clonal (Benhamou et al., 2018).

El objetivo principal de este modelo fue visualizar la interconectividad de las vías de señalización canónica involucradas en la respuesta celular a las señales microambientales determinantes para la diferenciación temprana de células B, con énfasis en la activación proinflamatoria de NF- κ B. Después de la simulación del modelo continuo con activación constitutiva, nula e intermedia de NF- κ B, encontramos que NF- κ B no es indispensable para la diferenciación temprana de células B. Por otro lado, la alta activación de NF- κ B induce al sistema hacia un atractor aberrante que transita por un estadio intermedio largo con potencial mielóide, facilitando así el redireccionamiento de la diferenciación hacia un linaje no linfóide como ha sido reportado previamente en modelos murinos (Cheung et al., 2018). Finalmente, una población conspicua con un fenotipo tipo CXCR7⁺ tipo pre-B surgió en respuesta a la activación intermedia de NF- κ B (Figura 12A).

Se ha sugerido que durante la progresión leucémica el reemplazo de la hematopoyesis normal podría ocurrir a través de diferentes mecanismos, incluida la ocupación de nichos en la MO por células hiperproliferativas con la capacidad de inducir un microambiente oncopromotor e inadecuado para la hematopoyesis normal (Baladrán et al., 2016; Enciso et al., 2016; Cheung et al., 2018). Debido a la mayor afinidad de CXCR7 por CXCL12, sugerimos que las células emergentes tipo pre-B que expresan el receptor CXCR7 e IL7, representen un subconjunto de células con potencial para colonizar el nicho CXCL12+IL7⁺, donde pueden competir por el espacio en la MO y los factores de crecimiento producidos en ella, con una ventaja respecto a la producción normal de células B inmaduras (Figura 12B). Esta hipótesis podría modelarse *in vivo* a través de un experimento

colonización de organoides de células mesenquimales CXCL12+, co-cultivadas con 1) células hematopoyéticas normales y 2) células hematopoyéticas con sobreexpresión de CXCR7.

Una de las observaciones más importantes del presente trabajo es la expresión sostenida de CXCR7 por el fenotipo pre-B, un receptor de quimiocinas cuyo papel no ha sido estudiado a fondo en a pesar de que se ha relacionado con la migración y el retorno de otros tipos de células hacia la MO y bazo, incluida la leucemia mieloide aguda y las células progenitoras CD34+ (Melo et al., 2018). Este fenómeno puede conducir a la creación de nuevos ecosistemas CXCL11, relacionados con patologías neoplásicas. Además, nuestros resultados sugieren que una señal proinflamatoria puede conducir a diferentes resultados de desarrollo, producción de células B inmaduras normales o fenotipos pre-B aberrantes, dependiendo de la etapa de diferenciación en la que se produce el estímulo. Esto es de particular interés considerando la investigación en otro tipo de cánceres donde las moléculas proinflamatorias secretadas por células malignas están involucradas en la transformación maligna de células precancerosas o fenotipos no agresivos (Espinoza-Sánchez et al., 2018).

Como propuesta de molécula inductora de pro-inflamación, se realizó un análisis bioinformático para identificar la frecuencia de miRNAs sobexpresados en distintos tipos de cánceres y particularmente en LLA, con potencial de actuar como ligandos de TLR. Tres miRNAs con motivo GU en la posición 18-21 fueron identificados con una alta expresión en muestras de LLA pediátrica. En colaboración con el laboratorio de Biología Computacional del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se confirmó el potencial de unión de miR-146a-5p, miR-181b-5p y miR-199b-3p a TLR8. Nuestro grupo de trabajo tiene proyectos en curso para confirmar la participación de miRNAs como ligados de TLR, en la progresión y mantenimiento de la LLA.

Los resultados obtenidos de la reconstrucción y modelación de una red como modelos booleano y semi-continuo confirman la hipótesis del presente trabajo en la cual, se sugiere que la inflamación crónica, simulada por una activación constitutiva intermedia de NF- κ B, es capaz de inducir la expresión de atractores emergentes con un fenotipo con características podrían proveer una ventaja competitiva sobre células hematopoyéticas normales en los nichos de la MO. Además, mediante análisis bioinformáticos y *docking* molecular, proponemos la expresión aberrante de miRNAs con potencial de unirse y activar a TLR8 como probable inductor de la inflamación crónica en la MO leucémica.

Los resultados obtenidos abren las puertas a nuevas líneas de investigación para confirmar: 1) la existencia de una población leucémica CXCR7+, 2) la participación de miRNAs en el

establecimiento y mantenimiento de la LLA, 3) la participación de los miRNAs propuestos en la inducción de un fenotipo hematopoyético aberrante CXCR7+, y 4) la ventaja competitiva de un fenotipo hematopoyético CXCR7+ ante las células hematopoyéticas normales. Estas preguntas pueden ser abordadas a través de modelos *in vitro* con organoides o *in vivo* en modelo murino.

VIII. CONCLUSIONES

La integración de elementos genéticos y epigenéticos que orquestan al ecosistema de diferenciación de células B ha requerido esfuerzos adicionales a aquellos empleados para el estudio de otros tipos celulares no linfoides, para comprender los fenómenos emergentes que dependen de la interconexión de redes moleculares e interacciones celulares con su microambiente.

El modelado matemático se ha vuelto útil para el estudio de las propiedades dinámicas de redes reguladoras y vías de señalización, que proporcionan una herramienta explicativa y predictiva.

Consideramos que el estudio de la diferenciación con una perspectiva más amplia que incluya tanto factores transcripcionales como microambientales y las vías que los relacionan, podría ser útil para analizar fenómenos biológicos de implicaciones clínicas en enfermedades linfoproliferativas. Es de destacar que CXCR7, que no solo responde a CXCL12 sino también a CXCL11 y MIF dentro de la MO y en tejidos extramedulares, incluyendo hígado, bazo, y pulmón, podría ser una pieza clave en el complejo paisaje epigenético de las neoplasias linfoides.

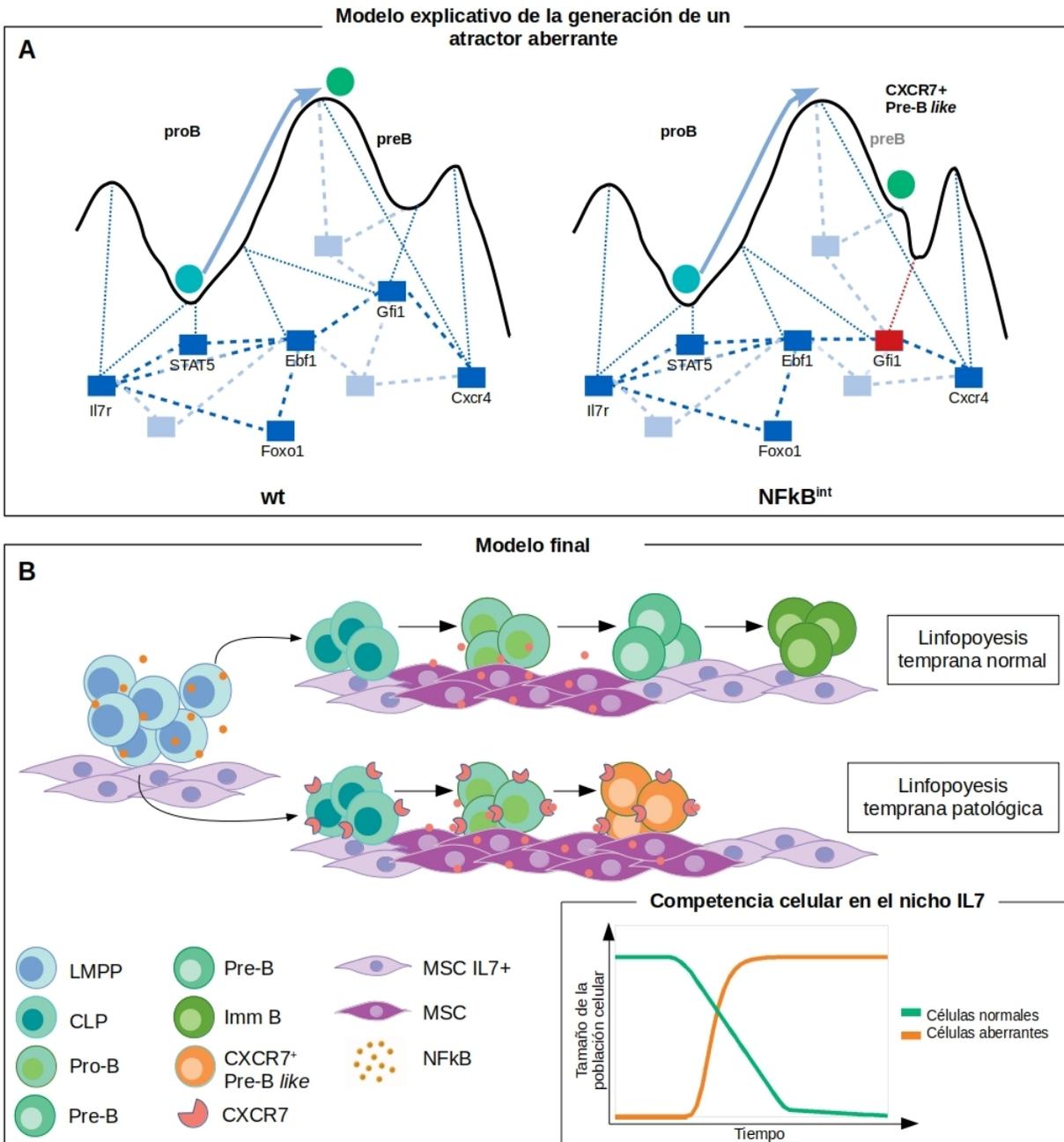


Figura 12. Modelo final: La activación de NF- κ B puede inducir la generación de una población de precursores aberrantes que podrían estar compitiendo con la hematopoyesis normal en los nichos de la MO. A) Las perturbaciones de red afectan el paisaje epigenético y pueden derivar en la generación de atractores aberrantes. La generación de atractores aberrantes depende del tipo de perturbación y la etapa en la que se induce la perturbación de la red. B) La producción de células hematopoyéticas normales y malignas se origina a partir de progenitores similares, sin embargo, la población maligna inducida por una señal proinflamatoria se detiene en una etapa progenitora y muestra una transición diferente a través de los nichos de la MO. La afinidad de la población aberrante a nichos particulares, sugerido por la expresión de moléculas involucradas en los ejes de comunicación del microambiente, puede representar una ventaja ecológica para el reemplazo progresivo de la hematopoyesis normal observada en tumores malignos leucémicos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Jaoudé, W. et al. Model checking to assess T-helper cell plasticity. (2015) *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2, 1–13.
- Acevedo Fernández, J. J. et al. Células troncales y medicina regenerativa. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2011).
- Albert, R. & Wang, R.-S. Discrete dynamic modeling of cellular signaling networks. *Methods Enzymol.* 467, 281–306 (2009).
- Albert, R. Scale-free networks in cell biology. 118, (2005).
- Aldana, M. Boolean dynamics of networks with scale-free topology. *Phys. D Nonlinear Phenom.* 185, 45–66 (2003).
- Altan-Bonnet, G. & Germain, R. N. Modeling T Cell Antigen Discrimination Based on Feedback Control of Digital ERK Responses. *PLoS Biol.* 3, e356 (2005).
- Assman, S. M. & Albert, R. Discrete dynamic modelling with asynchronous update or, how to model complex systems in the absence of quantitative information. *Methods Mol. Biol.* 553, 207–225 (2009).
- Ayala, F., Dewar, R., Kieran, M. & Kalluri, R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* 23, 2233–41 (2009).
- Balandrán, J. C. et al. Pro-inflammatory-Related Loss of CXCL12 Niche Promotes Acute Lymphoblastic Leukemic Progression at the Expense of Normal Lymphopoiesis. *Front. Immunol.* 7, 666 (2016).
- Balandrán J.C., Enciso J., Pelayo R. El sistema hematopoyético como paradigma de la diferenciación celular. En “Células Troncales: Biología y Aplicaciones en Biomedicina” (eds. Chávez-González, M.A., Chimal-Monroy, J., Flores-Figueroa, E. & Lamas M.) 209-238 (México, Ciudad de México: Universidad Nacional Universidad Nacional Autónoma de México, 2017).
- Baldazzi, V., Paci, P., Bernaschi, M. & Castiglione, F. Modeling lymphocyte homing and encounters in lymph nodes. *BMC Bioinformatics* 10, 387 (2009).
- Barrett, T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res.* 41, D991–D995 (2012).
- Bates, R. C. & Mercurio, A. M. Tumor Necrosis Factor- α Stimulates the Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Human Colonic Organoids. *Mol. Biol. Cell* 14, 1790–1800 (2003).
- Ben-Shoshan, J. et al. Constitutive expression of HIF-1 α and HIF-2 α in bone marrow stromal cells differentially promotes their proangiogenic properties. *Stem Cells* 26, 2634–43 (2008).
- Benhamou, D. et al. The c-Myc/miR17-92/PTEN axis tunes PI3K activity to control expression of recombination activating genes in early B cell development. *Front. Immunol.* 9:2715 (2018).
- Bettini, M., Xi, H., Milbrandt, J. & Kersh G.J. Thymocyte Development in Early Growth Response Gene 1-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* 169:1713–1720 (2002).
- Blank, U., Karlsson, G. & Karlsson, S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* 111, 492–503 (2008).
- Bonzanni, N. et al. Hard-wired heterogeneity in blood stem cells revealed using a dynamic regulatory network model. *Bioinformatics* 29, i80-8 (2013).
- Boulais, P. E. & Frenette, P. S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* 125, 2621–2630 (2015).
- Burger, J. a & Kipps, T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107, 1761–7 (2006).

- Campana, D. & Pui, C.-H. Childhood Leukemia. in *Abeloff's Clinical Oncology* (eds. Abeloff, M., Armitage, J., Niederhuber, J., Kastan, M. & McKenna, W.) 2139–2169 (Elsevier, 2008). doi:10.1001/jama.291.4.514
- Carbo, A. et al. Systems Modeling of Molecular Mechanisms Controlling Cytokine-driven CD4+ T Cell Differentiation and Phenotype Plasticity. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003027 (2013).
- Cattoretti, G. et al. Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance. *J. Immunol.* 177, 6930–9 (2006).
- Chambers, S. M. et al. Hematopoietic Fingerprints: An Expression Database of Stem Cells and Their Progeny. *Cell Stem Cell* 1, 578–591 (2007).
- Cheung, L.C. et al. New therapeutic opportunities from dissecting the pre-B leukemia bone marrow microenvironment. *Leukemia* 32:2326–2338 (2018).
- Chotinantakul, K. & Leraanansaksiri, W. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res.* 2012, 270425 (2012).
- Churchman, M. L. & Mullighan, C. G. Ikaros: Exploiting and targeting the hematopoietic stem cell niche in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.* 46, 1–8 (2017).
- Clark, M. R., Mandal, M., Ochiai, K. & Singh, H. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 69–80 (2013).
- Collombet, S. et al. Logical modeling of lymphoid and myeloid cell specification and transdifferentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 5792–5799 (2017).
- Colmone, A. et al. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* (80-.). 322, 1861–1865 (2008).
- Constantinides, M. G., McDonald, B. D., Verhoef, P. A. & Bendelac, A. A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* 508, 397–401 (2014).
- Cordeiro Gomes, A. et al. Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity* (2016).
- Curado, M. P., Pontes, T., Guerra-Yi, M. E. & Cancela, M. D. C. Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Rev. Panam. Salud Publica* 29, 96–102 (2011).
- Das, J. et al. Digital Signaling and Hysteresis Characterize Ras Activation in Lymphoid Cells. *Cell* 136, 337–351 (2009).
- Davidich, M. I. & Bornholdt, S. Boolean Network Model Predicts Cell Cycle Sequence of Fission Yeast. *PLoS One* 3, e1672 (2008).
- Di Cara, A., Garg, A., De Micheli, G., Xenarios, I. & Mendoza, L. Dynamic simulation of regulatory networks using SQUAD. *BMC Bioinformatics* 8, 462 (2007).
- Dorantes-Acosta, E. & Pelayo, R. Lineage switching in acute leukemias: a consequence of stem cell plasticity? *Bone Marrow Res.* 2012, 406796 (2012).
- Dorantes-Acosta, E. et al. TLR Stimulation of Bone Marrow Lymphoid Precursors from Childhood Acute Leukemia Modifies Their Differentiation Potentials. *Biomed Res. Int.* 2013, 846724 (2013).
- Duyu, M. et al. Prospective evaluation of whole genome microRNA expression profiling in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Biomed Res. Int.* 2014, 967585 (2014).
- Eden, T. Aetiology of childhood leukaemia. *Cancer Treat. Rev.* 36, 286–297 (2010).
- Ehninger, A. & Trumpp, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J. Exp. Med.* 208, 421–8 (2011).
- Emamaullee, J. A. et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 58, 1302–11 (2009).

- Enciso, J., Balandrán, J. C. & Pelayo, R. The Pathobiological Complexity of Childhood Cancer: Acute Leukemias as a Paradigm of Study. in *Cancer: a complex disease* (eds. Miramontes, O. & Álvarez-Buylla, E.) 43–57 (Coplit-arXives, 2018).
- Enciso, J., Mayani, H., Mendoza, L. & Pelayo, R. Modeling the Pro-inflammatory Tumor Microenvironment in Acute Lymphoblastic Leukemia Predicts a Breakdown of Hematopoietic-Mesenchymal Communication Networks. *Front. Physiol.* 7, 349 (2016).
- Enciso, J., Mendoza, L., Álvarez-Buylla, E.R., Pelayo, R. Dynamical modeling predicts an inflammation-inducible CXCR7+ B cell precursor with potential implications in lymphoid blockage pathologies. *PeerJ* 8:e9902 (2020).
- Enciso, J., Mendoza, L. & Pelayo, R. Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology. *Front. Genet.* 6, 1–5 (2015).
- Enciso, J., Pelayo, R. & Villarreal, C. From Discrete to Continuous Modeling of Lymphocyte Development and Plasticity in Chronic Diseases. *Front. Immunol.* 10, 1927 (2019).
- Espinoza-Sánchez, N. A., Enciso, J., Pelayo, R. & Fuentes-Pananá, E. M. An NFκB-dependent mechanism of tumor cell plasticity and lateral transmission of aggressive features. *Oncotarget* 9, 26679–26700 (2018).
- Fabbri, M. et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *109*, (2012).
- Fathman, J. W. et al. Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow. *Blood* 118, 5439–47 (2011).
- Fauré, A. et al. Dynamical analysis of a generic Boolean model for the control of the mammalian cell cycle. *Bioinformatics* 22, e124–e131 (2006).
- Feinerman, O., Veiga, J., Dorfman, J. R., Germain, R. N. & Altan-Bonnet, G. Variability and robustness in T cell activation from regulated heterogeneity in protein levels. *Science* 321, 1081–4 (2008).
- Fistonich, C. et al. Cell circuits between B cell progenitors and IL-7 + mesenchymal progenitor cells control B cell development. *J. Exp. Med.* 215, 2586–2599 (2018).
- 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* 3, 459–73 (1995).
- Garcia, H. G., Tikhonov, M., Lin, A. & Gregor, T. Quantitative imaging of transcription in living *Drosophila* embryos links polymerase activity to patterning. *Curr. Biol.* 23, 2140–5 (2013).
- Garg, A., Di Cara, A., Xenarios, I., Mendoza, L. & De Micheli, G. Synchronous versus asynchronous modeling of gene regulatory networks. *Bioinformatics* 24, 1917–25 (2008).
- Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E., Schiff, C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *PNAS* 99:13014–9 (2002).
- Geremia, A. & Arancibia-Cárcamo, C. V. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Front. Immunol.* 8, 1296 (2017).
- Glodek, A. M., Honczarenko, M., Le, Y., Campbell, J. J. & Silberstein, L. E. Sustained Activation of Cell Adhesion Is a Differentially Regulated Process in B Lymphopoiesis. *J. Exp. Med.* 197, 461–473 (2003).
- Gómez Tejeda Zañudo, J., Scaltriti, M. & Albert, R. A network modeling approach to elucidate drug resistance mechanisms and predict combinatorial drug treatments in breast cancer. *Cancer Converg.* 1, 5 (2017).
- Greaves, M. & Müschen, M. Infection and the Perils of B-cell Activation. *Cancer Discov.* 5, 1244–6 (2015).

- Greaves, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 6, 193–203 (2006).
- Greenbaum, A. et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495, 227–30 (2013).
- Greig, K.T. et al. Critical roles for c-Myb in lymphoid priming and early B-cell development. *Blood* 115:2796–2805 (2010).
- Grosselin, J., Sii-Felice, K., Leboulch, P. & Tronik-Le Roux, D. Searching for the Key to Expand Hematopoietic Stem Cells. *Advances in hematopoietic stem cell research (InTech, 2012)*.
- Guo, H., Ma, O., Speck, N.A., Friedman, A.D. Runx1 deletion or dominant inhibition reduces Cebpa transcription via conserved promoter and distal enhancer sites to favor monopoiesis over granulopoiesis. *Blood* 119:4408–18 (2012).
- Guo, H., Barberi, T., Suresh, R. & Friedman, A. D. Progression from the Common Lymphoid Progenitor to B/Myeloid PreproB and ProB Precursors during B Lymphopoiesis Requires C/EBP α . *J. Immunol.* 201, 1692–1704 (2018).
- Han, Z.-B. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha directly enhances the transcriptional activity of stem cell factor (SCF) in response to hypoxia and epidermal growth factor (EGF). *Carcinogenesis* 29, 1853–61 (2008).
- Haxhinasto, S., Mathis, D. & Benoist, C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J. Exp. Med.* 205, 565–74 (2008).
- Herzog, S., Reth, M. & Jumaa, H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 195–205 (2009).
- Hitchon, C. et al. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 46, 2587–97 (2002).
- Ho, I. C., Hodge, M. R., Rooney, J. W. & Glimcher, L. H. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85, 973–83 (1996).
- Holmes ML, Carotta S, Corcoran LM, Nutt SL. Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes & development* 20:933–8 (2006).
- Huang, C. Y. & Ferrell, J. E. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10078–83 (1996).
- Huang G. et al. PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nature Genetics* 40:51–60 (2008).
- Huang, S., Ernberg, I. & Kauffman, S. Cancer attractors: A systems view of tumors from a gene network dynamics and developmental perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 869–876 (2009).
- Inlay, M. A. et al. Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. *Genes Dev.* 23, 2376–2381 (2009).
- Ivanovs, A. et al. Human haematopoietic stem cell development: from the embryo to the dish. *Development* 144, 2323–2337 (2017).
- Jalili, A. et al. CXCR7 is expressed in B Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) cells and mediates their transendothelial migration. *Blood* 112(11):1916 (2008).
- Jing, D. et al. Oxygen tension plays a critical role in the hematopoietic microenvironment in vitro. *Haematologica* 97, 331–9 (2012).
- Jordan, C. T. & Lemischka, I. R. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev.* 4, 220–32 (1990).
- Joshi, I. et al. Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Immunol.* 15, 294–304 (2014).

- Jouan Y, Patin EC, Hassane M, Si-Tahar M, Baranek T and Paget C (2018) Thymic Program Directing the Functional Development of $\gamma\delta T17$ Cells. *Front. Immunol.* 9:981.
- Kacena, MA. Et al. Megakaryocyte-osteoblast interaction revealed in mice deficient in transcription factors GATA-1 and NF-E2. *J Bone Miner Res.* 19(4):652-60 (2004).
- Kamel-Reid, S. & Dick, J. E. Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 242, 1706–9 (1988).
- Karamitros D, et al. Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells. *Nature immunology* 19:85–97 (2018).
- Karsunky, H., Inlay, M. A., Serwold, T., Bhattacharya, D. & Weissman, I. L. Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood* 111, 5562–5570 (2008).
- Kauffman, S. A. a. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J. Theor. Biol.* 22, 437–67 (1969).
- Kaufman, M. & Thomas, R. Model analysis of the bases of multistationarity in the humoral immune response. *J. Theor. Biol.* 129, 141–62 (1987).
- Kaufman, M., Urbain, J. & Thomas, R. Towards a logical analysis of the immune response. *J. Theor. Biol.* 114, 527–61 (1985).
- Keith, B., Johnson, R. S. & Simon, M. C. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* 12, 9–22 (2012).
- Kersseboom, R. et al. Bruton's tyrosine kinase cooperates with the B cell linker protein SLP-65 as a tumor suppressor in Pre-B cells. *The Journal of experimental medicine* 198:91–8 (2003).
- Khanin, R. & Wit, E. How Scale-Free Are Biological Networks. *J. Comput. Biol.* 13, 810–818 (2006).
- Kikuchi, K., Kasai, H., Watanabe, A., Lai, A. Y. & Kondo, M. IL-7 specifies B cell fate at the common lymphoid progenitor to pre-proB transition stage by maintaining early B cell factor expression. *J. Immunol.* 181, 383–92 (2008).
- Kim, C. H. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J. Blood Med.* 13–19 (2010).
- Kim, H.-Y. et al. Expression and functional roles of the chemokine receptor CXCR7 in acute myeloid leukemia cells. *Blood Res.* 50, 218–26 (2015).
- Kim, J. et al. Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 75, 2222–2232 (2015).
- Kim, J. I., Ho, I. C., Grusby, M. J. & Glimcher, L. H. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10, 745–51 (1999).
- Kim, K. & Sauro, H. M. In search of noise-induced bimodality. *BMC Biol.* 10, 89 (2012).
- Kim, M. J., et al. Age-related Deterioration of Hematopoietic Stem Cells. *Int J Stem Cells* 1(1), 55-63 (2008).
- Klamt, S., Saez-Rodriguez, J., Lindquist, J. A., Simeoni, L. & Gilles, E. D. A methodology for the structural and functional analysis of signaling and regulatory networks. *BMC Bioinformatics* 7, 56 (2006).
- Kode, A. et al. Leukemogenesis Induced by an Activating β -catenin mutation in Osteoblasts. *Nature* 506, 240–244 (2014).
- Kondo, M. et al. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* 407, 383–386 (2000).
- Lang, F. et al. Stem Cell Hierarchy and Clonal Evolution in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Stem Cells Int.* 2015, 137164 (2015).
- Lee G.Y., Kim J.A., Oh I.H. Stem cell niche as a prognostic factor in leukemia. *BMB Rep* (2015) 48:427–8.

- Li, X. et al. Aiolos Promotes Anchorage Independence by Silencing p66 Shc Transcription in Cancer Cells. *Cancer Cell* 25, 575–589 (2014).
- Lim, M. et al. Altered mesenchymal niche cells impede generation of normal hematopoietic progenitor cells in leukemic bone marrow. *Leukemia* 30, 154–62 (2016).
- Liquitaya-Montiel, A. J. & Mendoza, L. Dynamical Analysis of the Regulatory Network Controlling Natural Killer Cells Differentiation. *Front. Physiol.* 9, 1029 (2018).
- Lo-Coco, F. et al. Understanding the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 27, 3–9 (2014).
- MacLean, A. L., Lo Celso, C. & Stumpf, M. P. H. Population dynamics of normal and leukaemia stem cells in the haematopoietic stem cell niche show distinct regimes where leukaemia will be controlled. *J. R. Soc. Interface* 10, 20120968 (2013).
- Mahic, M. et al. Generation of highly suppressive adaptive CD8+CD25+FOXP3+ regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur. J. Immunol.* 38, 640–646 (2008).
- Mak, K. S., Funnell, A. P. W., Pearson, R. C. M. & Crossley, M. PU.1 and Haematopoietic Cell Fate: Dosage Matters. *Int. J. Cell Biol.* 2011, 808524 (2011).
- Martinez-Sanchez, M. E., Hiriart, M. & Alvarez-Buylla, E. R. The CD4+ T cell regulatory network mediates inflammatory responses during acute hyperinsulinemia: A simulation study. *BMC Syst. Biol.* 11, 64 (2017).
- Martinez-Sanchez, M. E., Mendoza, L., Villarreal, C. & Alvarez-Buylla, E. R. A Minimal Regulatory Network of Extrinsic and Intrinsic Factors Recovers Observed Patterns of CD4+ T Cell Differentiation and Plasticity. *PLOS Comput. Biol.* 11, e1004324 (2015).
- Mehr, R. Asynchronous differentiation models explain bone marrow labeling kinetics and predict reflux between the pre- and immature B cell pools. *Int. Immunol.* 15, 301–312 (2003).
- Melo, R. de CC., Ferro, K. P. V., Duarte, A. da S.S. & Olalla Saad, S.T. CXCR7 participates in CXCL12-mediated migration and homing of leukemic and normal hematopoietic cells. *Stem cell research & therapy* 9:34 (2018).
- Méndez-López, L. F. et al. Gene regulatory network underlying the immortalization of epithelial cells. *PLoS Comput. Biol.* 11, 24 (2017).
- Méndez, A. & Mendoza, L. A Network Model to Describe the Terminal Differentiation of B Cells. *PLOS Comput. Biol.* 12, e1004696 (2016).
- Mendoza, L. & Méndez, A. A dynamical model of the regulatory network controlling lymphopoiesis. *Biosystems* 137, 26–33 (2015).
- Mendoza, L. & Xenarios, I. A method for the generation of standardized qualitative dynamical systems of regulatory networks. *Theor. Biol. Med. Model.* 3, 13 (2006).
- Mendoza, L. A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *Biosystems* 84, 101–14 (2006).
- Min, I.M. et al. The Transcription Factor EGR1 Controls Both the Proliferation and Localization of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2:380–391 (2008).
- Mullighan, C. G. et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 453, 110–4 (2008).
- Müssel, C., Hopfensitz, M. & Kestler, H. a. BoolNet-an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics* 26, 1378–1380 (2010).
- Nagai, Y. et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 24, 801–812 (2006).
- Naldi, A., Carneiro, J., Chaouiya, C. & Thieffry, D. Diversity and plasticity of Th cell types predicted from regulatory network modelling. *PLoS Comput. Biol.* 6, e1000912 (2010).

- Nicholas, D. et al. The type 2 diabetes-associated Th17 cytokines IL-21 and IL-22 promote breast cancer cell survival. *J. Immunol.* 196, 124.56-124.56 (2016).
- Nodland, S. E. et al. IL-7R expression and IL-7 signaling confer a distinct phenotype on developing human B-lineage cells. *Blood* 118, 2116–27 (2011).
- Ochiai, K. et al. A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nature Immunology* 13:300–307 (2012).
- Ochodnicka-Mackovicova, K. et al. NF- κ B and AKT signaling prevent DNA damage in transformed pre-B cells by suppressing RAG1 / 2 expression and activity. *Blood* 126, 1324–1335 (2015).
- Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis : An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132, 631–644 (2008).
- Ortiz-Gutiérrez, E. et al. A Dynamic Gene Regulatory Network Model That Recovers the Cyclic Behavior of *Arabidopsis thaliana* Cell Cycle. *PLOS Comput. Biol.* 11, e1004486 (2015).
- Papaemmanuil, E. et al. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 46, 116–25 (2014).
- Park, S.-Y. et al. Focal adhesion kinase regulates the localization and retention of pro-B cells in bone marrow microenvironments. *J. Immunol.* 190, 1094–102 (2013).
- Pelayo, R., Dorantes-acosta, E., Vadillo, E. & Fuentes-pananá, E. From HSC to B-Lymphoid Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis. *InTech* 277–298 (2012).
- Peled, A. et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95, 3289–96 (2000).
- Pérez-Saldivar, M. L. et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 11, 355 (2011).
- Pui, C.-H. & Evans, W. E. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* 50, 185–96 (2013).
- Puniya, B. L. et al. A Mechanistic Computational Model Reveals That Plasticity of CD4+ T Cell Differentiation Is a Function of Cytokine Composition and Dosage. *Front. Physiol.* 9, 878 (2018).
- Purizaca, J. et al. 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, 349067 (2013).
- Purizaca, J., Meza, I. & Pelayo, R. Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Arch. Med. Res.* 43, 89–101 (2012).
- Raaijmakers, M. H. G. P. et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 464, 852–7 (2010).
- Raaijmakers, M. H. G. P. Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica* 96, 1041–8 (2011).
- Ramos, C. A. et al. Evidence for Diversity in Transcriptional Profiles of Single Hematopoietic Stem Cells. *PLoS Genet.* 2, e159 (2006).
- Riley, R. L. Impaired B lymphopoiesis in old age: a role for inflammatory B cells? *Immunologic research*, 57(1-3), 361–369 (2013)
- Riley, R. L., Khomtchouk, K., & Blomberg, B. B. Inflammatory immune cells may impair the preBCR checkpoint, reduce new B cell production, and alter the antibody repertoire in old age. *Experimental gerontology*, 105, 87–93 (2018).
- Roessler, S. et al. Distinct Promoters Mediate the Regulation of *Ebf1* Gene Expression by Interleukin-7 and *Pax5*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 579–594 (2007).

- Rogers, J.H. et al. E2A Antagonizes PU.1 Activity through Inhibition of DNA Binding. *BioMed Research International* 2016:1–11 (2016).
- Saez-Rodriguez, J. et al. A logical model provides insights into T cell receptor signaling. *PLoS Comput. Biol.* 3, e163 (2007).
- Salmon-Divon, M., Höglund, P., Johansson, M. H., Johansson, S. & Mehr, R. Computational modeling of human natural killer cell development suggests a selection process regulating coexpression of KIR with CD94/NKG2A. *Mol. Immunol.* 42, 397–403 (2005).
- Santisteban, M. et al. Immune-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition In vivo Generates Breast Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 69, 2887–2895 (2009).
- Sauer, S. et al. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 7797–7802 (2008).
- Schebesta M, Pfeffer PL, Busslinger M. Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity* 17:473–85 (2002).
- Schürch, C. M., Riether, C. & Ochsenbein, A. F. Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell* 14, 460–72 (2014).
- Serra, R., Villani, M. & Agostini, L. On the Dynamics of Scale-Free Boolean Networks. in *Neural Nets* (eds. Apolloni, B., Marinaro, M. & Tagliaferri, R.) 43–49 (Springer, 2003). doi:10.1007/978-3-540-45216-4_4
- Serwold, T., Richie Ehrlich, L. I. & Weissman, I. L. Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. *Blood* 113, 807–815 (2009).
- Shalapur, S., et al. Leukemia-associated genetic aberrations in mesenchymal stem cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Mol. Med.* 88(3):249-65 (2010).
- Shochat, C. et al. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *The Journal of Experimental Medicine* 208:901–908 (2011).
- Simonetta, F., Pradier, A. & Roosnek, E. T-bet and Eomesodermin in NK Cell Development, Maturation, and Function. *Front. Immunol.* 7, (2016).
- Spooner, C. J., Cheng, J. X., Pujadas, E., Laslo, P. & Singh, H. A Recurrent Network Involving the Transcription Factors PU.1 and Gfi1 Orchestrates Innate and Adaptive Immune Cell Fates. *Immunity* 31, 576–586 (2009).
- Sugiyama, T. & Nagasawa, T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 11, 201–206 (2012).
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977–88 (2006).
- Swaminathan, S. et al. Mechanisms of clonal evolution in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Immunol.* 16, (2015).
- Takubo, K. The hypoxia regulatory system in hematopoietic stem cells. *Adv. Hematop. stem cell Res.* (2011).
- Terashima A, Okamoto K, Nakashima T, Akira S, Ikuta K, Takayanagi H. Sepsis-Induced Osteoblast Ablation Causes Immunodeficiency. *Immunity* 44:1434–1443 (2016).
- Thomas, R. On the Relation Between the Logical Structure of Systems and Their Ability to Generate Multiple Steady States or Sustained Oscillations. in 180–193 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1981). doi:10.1007/978-3-642-81703-8_24

- Tian, J. et al. The progress of early growth response factor 1 and leukemia. *Intractable & Rare Diseases Research* 5:76–82 (2016).
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I. & Nagasawa, T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20, 707–18 (2004).
- Tsai, C.-C. et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* 117, 459–69 (2011).
- Übelhart R, Bach MP, Eschbach C, Wossning T, Reth M, Jumaa H. 2010. N-linked glycosylation selectively regulates autonomous precursor BCR function. *Nature Immunology* 11:759–765.
- Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. Inflammation Controls B Lymphopoiesis by Regulating Chemokine CXCL12 Expression. *J Exp Med* 199:47–58 (2004).
- Uto-Konomi, A. et al. CXCR7 agonists inhibit the function of CXCL12 by down-regulation of CXCR4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431:772–776 (2013).
- Vilchis-Ordoñez, A. et al. Bone marrow cells in acute lymphoblastic leukemia create a proinflammatory microenvironment influencing normal hematopoietic differentiation fates. *Biomed Res. Int.* 2015:386165 (2015).
- Villarreal, C., Padilla-Longoria, P. & Alvarez-Buylla, E. R. General Theory of Genotype to Phenotype Mapping: Derivation of Epigenetic Landscapes from N-Node Complex Gene Regulatory Networks. *Phys. Rev. Lett.* 109, 118102 (2012).
- Vogelstein, B. et al. Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–58 (2013).
- Wagegg, M. et al. Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. *PLoS One* 7, e46483 (2012).
- Wang, R.-S., Saadatpour, A. & Albert, R. Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications. *Phys. Biol.* 9, 1–14 (2012).
- Welner, R. S. et al. Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit Hi CD62L+ lymphoid progenitors. *Blood* 109, 4825–4831 (2007).
- Welner, R. S. et al. Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood* 112, 3753–3761 (2008).
- Welner R. S., Kincade P.W. 9-1-1: HSCs respond to emergency calls. *Cell Stem Cell* 3;14(4):415-6 (2014).
- Welner, R. S., Pelayo, R. & Kincade, P. W. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 95–106 (2008).
- Xia, C., Rao, X. & Zhong, J. Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation. *J. Diabetes Res.* 2017, 1–6 (2017).
- Xie, H., Ye, M., Feng, R. & Graf, T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117, 663–76 (2004).
- Xin, L. et al. Commensal microbes drive intestinal inflammation by IL-17-producing CD4+ T cells through ICOSL and OX40L costimulation in the absence of B7-1 and B7-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 10672–7 (2014).
- Yang, Z. et al. dbDEMC 2.0: updated database of differentially expressed miRNAs in human cancers. *Nucleic Acids Res.* 45, D812–D818 (2017).
- Yates, A., Callard, R. & Stark, J. Combining cytokine signalling with T-bet and GATA-3 regulation in Th1 and Th2 differentiation: a model for cellular decision-making. *J. Theor. Biol.* 231, 181–196 (2004).

- Yokota, T. & Kanakura, Y. Genetic abnormalities associated with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci.* (2016). doi:10.1111/cas.12927
- Zabel BA, et al. Elucidation of CXCR7-Mediated Signaling Events and Inhibition of CXCR4-Mediated Tumor Cell Transendothelial Migration by CXCR7 Ligands. *J. Immunol.* 183:3204–3211 (2009).
- Zarnegar, M. A. & Rothenberg, E. V. Ikaros represses and activates PU.1 cell-type-specifically through the multifunctional Sfp1 URE and a myeloid specific enhancer. *Oncogene* 31, 4647–54 (2012).
- Zehentmeier, S. & Pereira, J. P. Cell circuits and niches controlling B cell development. *Immunol. Rev.* 289, 142–157 (2019).
- Zhang, J. & Li, L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J. Biol. Chem.* 283, 9499–503 (2008).
- Zhang, R. et al. Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16308–16313 (2008).
- Zhao, J. L. et al. 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 (2014).
- Zhou, J. X., Bruschi, L. & Huang, S. Predicting pancreas cell fate decisions and reprogramming with a hierarchical multi-attractor model. *PLoS One* 6, e14752 (2011).
- Zlotoff, D. A. & Bhandoola, A. Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1217, 122–38 (2011).
- Zriwil, A. et al. Direct role of FLT3 in regulation of early lymphoid progenitors. *Br J Haematol* 183(4):588-600 (2018).

ANEXOS

Anexo 1. Justificación bibliográfica para las interacciones que conforman la red eBCR y las correspondientes reglas Booleanas. Los operadores Booleanos se encuentran representados por los símbolos & (AND), | (OR) y ! (NOT). Tomada de la Información Suplementaria de Enciso et al. 2020 (Artículo en inglés).

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference	
Flt3L	Flt3L		Input (input node)		
Il7	Il7		Input (input node)		
BCR	Spi1 & Tcf3 & Irf4 & !STAT5 & (Rag BCR)	Spi1	+	Spi1, Irf4, and Tcf3 bind to the κE3' intronic enhancer. Removal of the TCF3 binding sites impairs recombination by Rag.	(Perfetti et al., 2004; Ma et al., 2006; de Pooter & Kee, 2010; Hodawadekar et al., 2012)
		Tcf3	+		
		Irf4	+		
		Rag	+	RAG is reactivated during the pre-B stage to participate light chain (IgL) recombination.	
		STAT5	-	STAT5 maintains the the Igk locus repressed at the pro-B cell stage, inhibiting Tcf3 binding.	
		BCR *	+	BCR self-regulation replaces the single Igk recombination event promoted by Rag that determines the transition from pre-BCR to BCR.	*Assumption
VCAM1_V LA4	(Spi1 Spi1_2) & !(Ikzf1 & Ikzf3)	Spi1 Spi1_2	+	HPCs mutated in PU.1 lack integrins alpha-4, subunit of VLA-4.	(Welner, Pelayo & Kincade, 2008; Ochiai et al., 2012; Clark et al., 2013; Bendall et al., 2014)
		Ikzf1 & Ikzf3 *	-	Ikaros and Aiolos promote pro-B cell migration through the downregulation of adhesins. Because pre-B cells express both factors and have increased migration toward CXCL12 without adhering via VCAM-	*Assumption (Mullighan et al., 2008; Papaemmanuil et al., 2014; Ochodnicka-Mackovicova et al., 2015)

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference	
			1, we propose VLA4 as another Ikzf1/Ikzf3 target.		
preBCR	Ebf1 & !Ikzf3 & (Rag preBCR)	Ebf1	+	Binding sites for EBF can be found in the genes for λ5 and VpreB, participating in the assembly of pre-BCR.	(Ochiai et al., 2012)
		Ikzf3	-	Aiolos is a negative modulator of λ5, subunit of the pre-BCR surrogated light chain.	(Li et al., 2014; Joshi et al., 2014; Churchman & Mullighan, 2017)
		Rag	+	RAG1 and RAG2 initiate Ig heavy chain (Igh) recombination.	(Tokoyoda et al., 2004)
		preBCR	+	Pre-BCR self-regulation replaces the transient activation of Rag. In vivo, pre-BCR self-induction of activation in cooperation with its binding to stromal ligands like galectin-1.	(Bettini et al., 2002; Min et al., 2008)
Csf1r	Spi1_2 & !Pax5	Spi1_2	+	PAX5 interferes with PU.1 transactivation at the sense promoter of Csf1r gene and down regulates the frequency of binding of the basal transcription machinery.	(Cordeiro Gomes et al., 2016)
		Pax5	-		
Cxcr4	Tcf3 & (!Gfi1 Flt3_a Irf4) & ! Cxcr7	Tcf3	+	CXCR4 expression was down-regulated in a transcriptional profiling of E-protein-deficient activated B cells. Evaluated E-proteins include E2A and E2-2.	(Karamitros et al., 2018; Guo et al., 2018)
		Gfi1	-	In myeloid cells it has been reported an inhibitory interaction of Gfi1 after binding to Cxcr4 promoter. Additionally, HSCs from	(Ochodnicka-Mackovicova et al., 2015)

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference
			Gfi1ko/ko mice show an increased expression of CXCR4.	
		Flt3_a +	Flt3/Ras-dependent signals suppresses SOCS3, which in turn, negatively regulate CXCR4.	(Li et al., 2010)
		Irf4 +	IRF4 directly induces the expression of Cxcr4.	(Johnson et al., 2008)
		Cxcr7 -	Overexpression of CXCR7 inhibits CXCR4 expression, besides acting as an alternative receptor for CXCL12 with higher affinity than CXCR4.	(Uto-Konomi et al., 2013; Coggins et al., 2014)
Cxcr7	NFkB & !Irf4	NFkB +	Cxcr7 promoter contains three binding sites to NFkB with probed inhibitor functionality.	(Tarnowski, Kucia & Ratajczak, 2009; Tarnowski et al., 2010)
		Irf4 -	CXCR7 expression is up-regulated in IRF4-deficient B cells, controlling their positioning in lymphoid microenvironments.	(Simonetti et al., 2013)
Flt3	Ikzf1 & Spi1 & !Pax5	Ikzf1 +	Hematopoietic progenitors with inhibited expression of Ikaros or PU.1 are deficient in expression of Flt3.	(Nichogiannopoulou et al., 1999)
		Spi1 +		(DeKoter, Lee & Singh, 2002)
		Pax5 -	Progenitor B cells deficient in Pax1, show an abundant expression of Flt3, effect that is rapidly inverted upon the reinduction of Pax5 expression.	(Holmes et al., 2006; Ochiai et al., 2012)

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference
Il7r	Spi1 & Foxo1 & (Flt3_a (STAT5 & Ebf1)) & !(Cebpa Irf4)	Spi1 +	PU.1 directly regulates the transcription of the gene coding for the IL-7R α -chain.	(DeKoter, Lee & Singh, 2002)
		Foxo1 +	Foxo1 expression is required at early B cell developmental stages to sustain the expression of Il7ra.	(Dengler et al., 2008; Ochiai et al., 2012)
		Flt3_a +	Flt3 activation promote the expression of IL-7R α and suppresses SOCS genes that contribute to the inhibition of STAT5 signaling.	(Li et al., 2010)
		STAT5 +	EBF participates in a feedback loop that sustains and augments IL7r expression after initial activation.	(Singh, Pongubala & Medina, 2007; Pongubala et al., 2008)
		Ebf1 +		
		Cebpa -	ChIP-seq analysis revealed binding of C/EBP α at the cis-regulatory elements of Foxo1, Ebf1, Pax5, IL7r, and Mef2c genes, with inhibitory activity.	(Collombet et al., 2017)
		Irf4 -	Irf4 attenuates Il7r signaling by inducing Cxcr4 expression, promoting the migration of B progenitor cells towards CXCL12, which is expressed in a separated niche than the one composed by IL7-secreting stromal cells.	(Tokoyoda et al., 2004; Johnson et al., 2008)
STAT5	(Il7&Il7r) & VCAM1_VLA4 & ! SLP65	Il7&Il7r +	IL-7R signaling activates STAT5 and participates in the promotion of distal VH gene rearrangements.	(Bertolino et al., 2005)
		VCAM1_VLA4 * +	In endothelial cells, STAT5 pathway activation by IL3 requires the concomitant activation of JAK/STAT by β integrin, VLA4 subunit. We	*Assumption for hematopoietic cells (Tokoyoda et al., 2004; Defilippi et al., 2005)

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference
			assume that a similar requirement may be involved in the expansion of B cell progenitors in IL7-enriched bone marrow niches.	
		SLP65 -	Adaptor SLP65, also known as BLNK or BASH, inhibits JAK3/STAT5 signaling pathway through its binding to JAK3.	(Nakayama et al., 2008)
PI3KIA	(preBCR (VCAM1_VLA4 & Cxcr4) Cxcr7) & !SLP65 & (!Cebpa STAT5)	preBCR +	Independently of IL-7 signalling, pre-BCR stimulation induces the phosphorylation of AKT in human pre-B cells.	(Anbazhagan et al., 2013)
		SLP65 -	Activation of an inducible form of SLP65 results in markedly reduced levels of phosphorylated Akt/PKB, downstream phosphorylation target of PI3KIA.	(Herzog et al., 2008)
		VCAM1_VLA4 +	Downstream VLA4 binding to VCAM1, ILK induces the phosphorylation of Akt at Ser473 and GSK3b at Ser9.	(Tabe et al., 2007)
		Cxcr4 +	Inhibition of either CXCR4 or CXCR7, derives in decreased activation of PI3K pathway by β -arrestin in CD34+ hematopoietic cells.	(Chabanon et al., 2008; Torossian et al., 2014)
		Cxcr7 +		
		Cebpa -	Cebpa promotes the expression of miR-29b which in turn induces PTEN transcription, an inhibitor for PI3K pathway.	(Eyholzer et al., 2010; Wang et al., 2015)
		STAT5 +	The abundance of phosphorylated Akt was positively correlated with that of IL-7R in mice pre-B cells.	(Ochiai et al., 2012)

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference
NFkB	SLP65 Rag	SLP65 +	After pre-BCR incorporates into cell membrane lipid rafts it derives in the activation of a complex molecular module composed by Lyn, Syk, SLP65, PI3K, Btk, Vav, and PLCy2. The activation of PLCy2 induces calcium signaling and subsequently NF-kB activation.	(Schebesta, Pfeffer & Busslinger, 2002; Kersseboom et al., 2003)
		Rag +	Rag activity during V(D)J recombination, induce an ATM-dependent DNA damage response. Among other functions, ATM kinase phosphorylates IKK releasing the NF-kB complex.	(Ochodnicka-Mackovicova et al., 2016; Meek et al., 2016)
SLP65	preBCR & (Foxo1 Pax5)	preBCR +	BLNK transduce pre-BCR activation upon phosphorylation by Syk.	(Pappu et al., 1999; Kersseboom et al., 2003)
		Foxo1 +	Foxo1 in conjunction with Pax5, activates SLP65 coding gene expression in pre-B cells enabling an effective coupling of the pre-BCR with its downstream signaling components.	(Ochiai et al., 2012)
		Pax5 +	Pax5 upregulates the expression of Blnk gene, involved in the transduction of the pre-BCR activation.	(Schebesta, Pfeffer & Busslinger, 2002; Ochiai et al., 2012)
Cebpa	(Spi1 Runx1) & (! (Ebf1 Foxo1 Ikzf1) (Runx1 & Spi1_2))	Runx1 +	Runx1 gene deletion reduces Cebpa transcripts through binding to sites in the promoter region.	(Guo et al., 2012)
		Spi1 +	PU.1 inhibits GATA-1 that targets, as an inhibitor, Cebpa required for myeloid development.	(Burda et al., 2009)
		Spi1_2 +		
		Foxo1 -	ChIP-seq experiments probed the binding of FoxO1 to the Cebpa locus. A	(Collombet et al., 2017)

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference
			functional analysis revealed a negative regulation.	
		Ebf1 -	EBF1 and Ikaros bind to silencing regions in the Cebpa gene, having a probable redundant inhibitory role on Cebpa transcription.	(Rao et al., 2013; Bertolino, Reinitz & Manu, 2016)
		Ikzf1 -		
Ebf1	Tcf3 & Runx1 & ((STAT5 & Foxo1) (Spi1 & Ebf1 & Pax5)) & !Cebpa	Tcf3 +	E2A is required for initiating and maintaining the expression of EBF to ensure the B cell program specification.	(Kwon et al., 2008)
		Runx1 +	Runx1-binding to motifs in the proximal promoter of Ebf1 are essential to drive gene expression through the regulation of repressive histone marks.	(Seo et al., 2012)
		STAT5 +	The distal promoter of Ebf1 is controlled by IL7R signaling, E2A and EBF1. While the proximal promoter is upregulated by the binding of Pax5, Ets1 and PU.1.	(Roessler et al., 2007; Zandi et al., 2008)
		Pax5 +		
		Spi1 +		
		Ebf1 +		
		Foxo1 +	Increased expression of Foxo1 in combination with IL7R signaling, activate the transcription of the Ebf1 gene. In turn, Ebf1 activates the expression of FoxO1 forming a positive feedback loop.	(Mansson et al., 2012; Katerndahl et al., 2017)
Cebpa -	ChIP-seq analysis revealed binding of C/EBP α at the cis-regulatory elements of Foxo1, Ebf1, Pax5, IL7r, and Mef2c genes, with an inhibitory activity.	(Collombet et al., 2017)		
Egr1	(Spi1 & !Gfi1) Spi1_2 Pax5	Spi1 +	Egr1 expression is promoted with increased PU.1 levels and attenuated with Gfi1 overexpression.	(Laslo et al., 2006)
		Spi1_2 +		
		Gfi1 -		

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference
		Pax5 +	The induced expression of Pax2/5/8 promotes the upregulation of EGR1, in addition to B-cell related genes.	(Hart et al., 2018)
Foxo1	(Tcf3 Ebf1) & (!PI3KIA !NFkB SLP65) & !Cebpa	Tcf3 +	E2A binds to enhancer elements in the FoxO1 locus to activate Foxo1 expression.	(Welinder et al., 2011)
		Ebf1 +	Increased expression of Foxo1 in combination with IL7R signaling activate the transcription of the Ebf1 gene. In turn, Ebf1 activates the expression of FoxO1 in a positive feedback loop.	(Mansson et al., 2012)
		PI3KIA -	IL-7 signaling positively correlates with the abundance of phosphorylated Akt, and negatively correlates with the overall abundance of Foxo1 and Foxo3a proteins. Akt phosphorylates Foxo proteins and promote their degradation via ubiquitination.	(Ochiai et al., 2012)
		NFkB -	The treatment of Abl mouse pre-B cells and two human BCR-ABL-positive B-ALL cells with an IKKb inhibitor, negatively regulate FoxO1 stability.	(Ochodnicka-Mackovicova et al., 2015)
		SLP65 +	SLP65 activates p38 which in turn stimulates FoxO1 activity. Establishing a FoxO1-SPL65-p38 feedbackloop.	(Ochiai et al., 2012)
		Cebpa -	ChIP-seq analysis revealed binding of C/EBPα at the cis-regulatory elements of Foxo1, Ebf1, Pax5, IL7r, and Mef2c genes, with an	(Collombet et al., 2017)

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference	
			inhibitory activity.		
Gfi1	((Ikzf1 Cebpa) & !(Egr1 Gfi1) Ebf1)	Ikzf1	+	Ikaros, a transcription factor required for B cell development, promoted Gfi1 and antagonized PU.1 expression in MPPs.	(Spooner et al., 2009)
		Cebpa	+	C/EBP α interacts with a functional binding site in the Gfi gene and enhances Gfi-1 expression.	(Lidonnici et al., 2010)
		Egr1	-	Several putative Egr binding sites were identified in the promoter region of the Gfi-1 gene, one of them is bound with high affinity by Egr-1.	(Laslo et al., 2006)
		Gfi1	-	Their have been identified Gfi1 binding motifs conserved among rat, mice and human Gfi1 genes, suggesting a repressive self-regulation mechanism.	(Doan et al., 2004; Yücel et al., 2004; Martejijn et al., 2007)
		Ebf1	+	Predicted promoter/enhancer for GFI1 gene	GeneHancer (GH) Regulatory Elements for GFI1 Gene (Fishilevich et al., 2017)
Ikzf1	(Runx1 & Spi1 & ! Cebpa) Irf4	Runx1	+	Runx binding to E3 ligase CRBN inhibits its activity as promoter of Ikaros ubiquitylation and proteasome-dependent degradation.	(Zhou et al., 2019)
		Spi1	+	PU.1 indirectly induce Ikaros expression through Mef2c transcription factors. Mef2c is inhibited by Cebpa.	(Stehling-Sun et al., 2009; Herglotz et al., 2016)
		Cebpa	-		
		Irf4	+	Irf4 participates in the activation of Ikaros and Aiolos to down-regulate pre-B-cell receptor and promote cell-cycle withdrawal in pre-B-cell development.	(Ma et al., 2006, 2008; Thompson et al., 2007)

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference	
Ikzf3	Ikzf1 & Irf4 & ! STAT5	Ikzf1	+	Ikaros binds the Aiolos promoter, inducing its expression in cell lines and freshly isolated B and T cells.	(Ghadiri et al., 2007)
		STAT5	-	STAT5 binds to a large subset of genes that regulate normal progenitor B cell development, including IRF4 and AIOLOS.	(Katerndahl et al., 2017)
		Irf4	+	Irf4 participates in the activation of Ikaros and Aiolos to down-regulate pre-B-cell receptor and promote cell-cycle withdrawal in pre-B-cell development.	(Thompson et al., 2007; Ma et al., 2008)
Irf4	(NFkB Ebf1) & ! ((Flt3 & Flt3L) STAT5)	NFkB	+	C-Rel, a member of the NF-kB transcription factors, induces IRF4 expression in lymphocytes.	(Grumont & Gerondakis, 2000)
		Ebf1	+	Ebf1 directly binds to IRF4, IRF8, Myb, Mybl2, and Bcl2l1 sequences, shown by chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis.	(Györy et al., 2012)
		Flt3_a	-	Inhibition of Flt3 over the transcription factor IRF4 represents the inhibition of the plasmacytoid cell program in CLP cells. This inhibition may be mediated by STAT5, as reported for IRF8.	(Esashi et al., 2008; Mendoza & Méndez, 2015)
		STAT5	-	STAT5 binds to a large subset of genes that regulate normal progenitor B cell development, including IRF4 and AIOLOS.	(Katerndahl et al., 2017)
Pax5	Spi1 & (STAT5 (Ebf1 & Foxo1 & Irf4)) & !Cebpa	Spi1	+	PU.1 binds to an enhancer element in Pax5 gene. While, IRF4 at an intermediate level correlates	(Decker et al., 2009; Lu et al., 2014)
		Foxo1	+		
		Irf4	+		

Node	Boolean rule	Interaction		Observation	Reference
				with nuclear Foxo1 and Pax5 induction. PU.1 binding	
		STAT5	+	STAT5 directly regulates Pax5 transcription in early B cells through its binding to a motif in the gene promoter region that overlaps with an EBF-binding site.	(O’Riordan & Grosschedl, 1999; Hirokawa et al., 2003; Decker et al., 2009)
		Ebf1	+		
		Cebpa	-	ChIP-seq analysis revealed binding of C/EBPα with an inhibitory activity, at the cis-regulatory elements of Pax5, among other B cell promoting genes.	(Collombet et al., 2017)
Rag	Ebf1 & Foxo1 & ! (SLP65 NFkB)	Ebf1	+	Binding sites for EBF are found in a large number of B cell-specific genes including Rag1.	(O’Riordan & Grosschedl, 1999)
		Foxo1	+	FoxO1 induces Ikbzf1 splicing to promote immunoglobulin gene recombination through RAG.	(Alkhatib et al., 2012)
		SLP65	-	Evidence for a direct repression of RAG1 and RAG2 by pre-BCR signaling.	(Schebesta, Pfeffer & Busslinger, 2002)
		NFkB	-	Pre-B cells transduced with the IκBa-super repressor increases RAG activity. Additionally, IKKβ induces the expression of cyclin A/CDK2 that in its active form, restrict RAG2 expression in cycling cells.	(Ochodnicka-Mackovicova et al., 2015)
Spi1	Runx1 & ((Gfi1 Tcf3) (Spi1 & Ikbzf1)) & !Cebpa	Runx1	+	RUNX1 binds to an upstream regulatory element of Spi1.	(Roessler et al., 2007; Kikuchi et al., 2008)
		Gfi1	+	Gfi1 constrains the expression of PU.1 by displacing PU.1 from positive autoregulatory elements.	(Welner, Pelayo & Kincade, 2008)
		Spi1	+		

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference	
		Tcf3	+	E2A directly binds to PU.1 antagonizing its activity and inhibiting myeloid differentiation.	(Welner, Pelayo & Kincade, 2008; Nodland et al., 2011)
		Ikzf1	+	Ikaros, which is required for B-cell development, might constrain PU.1 expression by blocking PU.1 autoregulation through the URE.	(Greenbaum et al., 2013)
		Cebpa	-	Cebp/α induction of Pu.1 expression is required during myeloid differentiation, characterized by a high level expression of PU.1.	(Peled et al., 2000; Glodek et al., 2003)
Spi1_2	Runx1 & !(Gfi1 Tcf3) (Spi1_2 & !Ikzf1)	Runx1	+	RUNX1 binds to an upstream regulatory element of Spi1.	(Tokoyoda et al., 2004; Sugiyama et al., 2006; Pérez-Saldivar et al., 2011; Greenbaum et al., 2013; Baladrán et al., 2016; Enciso et al., 2016)
		Gfi1	-	Gfi1 constrains the expression of PU.1 by displacing PU.1 from positive autoregulatory elements.	(Tokoyoda et al., 2004; Park et al., 2013; Clark et al., 2013)
		Spi1_2	+		
		Tcf3	-	E2A directly binds to PU.1 antagonizing its activity and inhibiting myeloid differentiation.	(Cordeiro Gomes et al., 2016; Fistonich et al., 2018; Zehentmeier & Pereira, 2019)
		Ikzf1	-	Ikaros constrains PU.1 expression by blocking PU.1 autoregulation through the URE.	(Lévesque et al., 2003; Enciso et al., 2016; Terashima et al., 2016; Zehentmeier & Pereira, 2019)
Tcf3	(Ikzf1 Spi1 Pax5) & !(Tcf3 Ebf1 Gfi1)	Ikzf1	+	Ikaros knockout results in loss of lymphocytes as seen with E2a knockout. Additionally, Ikaros-binding sites were identified at the E2a promoter in B cells	(Assman & Albert, 2009; Albert & Wang, 2009)
		Spi1	+	Physical interaction observed through ChIP-seq	(Müssel, Hopfensitz & Kestler, 2010)

Node	Boolean rule	Interaction	Observation	Reference
			meta-analysis.	
		Pax5 +	Physical interaction observed through ChIP-seq meta-analysis.	(Albert & Wang, 2009)
		Tcf3 -	E47 binds to the promoter region of Id3, an E2A inhibitory factor.	(Mendoza & Xenarios, 2006)
		Ebf1 +	EBF1 and Gfi1 inhibit ID2, an inhibitor of E2A expression and critical for specification towards the B cell lineage.	(Villarreal, Padilla-Longoria & Alvarez-Buylla, 2012)
		Gfi1 +		
Runx1	(Spi1 Spi1_2) & (Runx1 Ikzf1)	Spi1 Spi1_2 +	RUNX1 functionally binds to upstream regulatory element of PU.1 regulating its expression. However, PU.1 induced expression is not sufficient to rescue ablation of RUNX1.	(Mendoza & Méndez, 2015; Collombet et al., 2017)
		Runx1 +	RUNX1 regulates its own expression through binding sites in the distal promoter P1 region of Runx1 gene.	(Huang et al., 2008; Spooner et al., 2009; Zarnegar & Rothenberg, 2012; Rogers et al., 2016)
		Ikzf1 +	Ikaros consensus binding sites were found in the proximal promoter regions of the Runx1 gene.	(Gauthier et al., 2002; Übelhart et al., 2010)

Bibliografía del Anexo 1

- Albert R, Wang R-S. 2009. Discrete dynamic modeling of cellular signaling networks. *Methods in enzymology* 467:281–306. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)67011-7.
- Alkhatib A, Werner M, Hug E, Herzog S, Eschbach C, Faraidun H, Köhler F, Wossning T, Jumaa H. 2012. FoxO1 induces Ikaros splicing to promote immunoglobulin gene recombination. *The Journal of experimental medicine* 209:395–406. DOI: 10.1084/jem.20110216.
- Anbazhagan K, Rabbind Singh A, Isabelle P, Stella I, Céline A-DM, Bissac E, Bertrand B, Rémy N, Naomi T, Vincent F, Rochette J, Lassoued K. 2013. Human pre-B cell receptor signal transduction: evidence for distinct roles of PI3kinase and MAP-kinase signalling pathways. *Immunity, inflammation and disease* 1:26–36. DOI: 10.1002/iid3.4.

- Assman SM, Albert R. 2009. Discrete dynamic modelling with asynchronous update or, how to model complex systems in the absence of quantitative information. *Methods in molecular biology* 553:207–225. DOI: 10.1007/1-4020-0613-6_16551.
- Balandrán JC, Purizaca J, Enciso J, Dozal D, Sandoval A, Jiménez-Hernández E, et al. 2016. Pro-inflammatory-Related Loss of CXCL12 Niche Promotes Acute Lymphoblastic Leukemic Progression at the Expense of Normal Lymphopoiesis. *Frontiers in immunology* 7:666. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00666.
- Bendall SC, Davis KL, Amir ED, Tadmor MD, Simonds EF, Chen TJ, et al. 2014. Single-Cell Trajectory Detection Uncovers Progression and Regulatory Coordination in Human B Cell Development. *Cell* 157:714–725. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.005.
- Bertolino E, Reddy K, Medina KL, Parganas E, Ihle J, Singh H. 2005. Regulation of interleukin 7–dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nature Immunology* 6:836–843. DOI: 10.1038/ni1226.
- Bertolino E, Reinitz J, Manu. 2016. The analysis of novel distal Cebpa enhancers and silencers using a transcriptional model reveals the complex regulatory logic of hematopoietic lineage specification. *Developmental biology* 413:128–44. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.02.030.
- Bettini M, Xi H, Milbrandt J, Kersh GJ. 2002. Thymocyte Development in Early Growth Response Gene 1-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* 169:1713–1720. DOI: 10.4049/jimmunol.169.4.1713.
- Burda P, Curik N, Kokavec J, Basova P, Mikulenkova D, Skoultchi AI, Zavadil J, Stopka T. 2009. PU.1 Activation Relieves GATA-1-Mediated Repression of Cebpa and Cbfb during Leukemia Differentiation. *Molecular Cancer Research* 7:1693–1703. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0031.
- Chabanon A, Desterke C, Rodenburger E, Clay D, Guerton B, Boutin L, et al. 2008. A cross-talk between stromal cell-derived factor-1 and transforming growth factor-beta controls the quiescence/cycling switch of CD34(+) progenitors through FoxO3 and mammalian target of rapamycin. *Stem cells* 26:3150–3161. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0219.
- Churchman ML, Mullighan CG. 2017. Ikaros: Exploiting and targeting the hematopoietic stem cell niche in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Hematology* 46:1–8. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.11.002.
- Clark MR, Mandal M, Ochiai K, Singh H. 2013. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 14:69–80. DOI: 10.1038/nri3570.
- Coggins NL, Trakimas D, Chang SL, Ehrlich A, Ray P, Luker KE, Linderman JJ, Luker GD. 2014. CXCR7 controls competition for recruitment of β -arrestin 2 in cells expressing both CXCR4 and CXCR7. *PloS one* 9:e98328. DOI: 10.1371/journal.pone.0098328.
- Collombet S, van Oevelen C, Sardina Ortega JL, Abou-Jaoudé W, Di Stefano B, Thomas-Chollier M, Graf T, Thieffry D. 2017. Logical modeling of lymphoid and myeloid cell specification and transdifferentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114:5792–5799. DOI: 10.1073/pnas.1610622114.

- Cordeiro Gomes A, Hara T, Lim VY, Herndler-Brandstetter D, Nevius E, Sugiyama T, Tani-Ichi S, Schlenner S, Richie E, Rodewald H-R, Flavell RA, Nagasawa T, Ikuta K, Pereira JP. 2016. Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity*. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.11.004.
- Decker T, Pasca di Magliano M, McManus S, Sun Q, Bonifer C, Tagoh H, Busslinger M. 2009. Stepwise Activation of Enhancer and Promoter Regions of the B Cell Commitment Gene Pax5 in Early Lymphopoiesis. *Immunity* 30:508–520. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.01.012.
- Defilippi P, Rosso A, Dentelli P, Calvi C, Garbarino G, Tarone G, Pegoraro L, Brizzi MF. 2005. β 1 Integrin and IL-3R coordinately regulate STAT5 activation and anchorage-dependent proliferation. *The Journal of cell biology* 168:1099–108. DOI: 10.1083/jcb.200405116.
- DeKoter RP, Lee H-J, Singh H. 2002. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* 16:297–309. DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00269-8.
- Dengler HS, Baracho G V, Omori SA, Bruckner S, Arden KC, Castrillon DH, DePinho RA, Rickert RC. 2008. Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nature immunology* 9:1388–98. DOI: 10.1038/ni.1667.
- Doan LL, Porter SD, Duan Z, Flubacher MM, Montoya D, Tschlis PN, Horwitz M, Gilks CB, Grimes HL. 2004. Targeted transcriptional repression of Gfi1 by GFI1 and GFI1B in lymphoid cells. *Nucleic acids research* 32:2508–2519. DOI: 10.1093/nar/gkh570.
- Enciso J, Mayani H, Mendoza L, Pelayo R. 2016. Modeling the Pro-inflammatory Tumor Microenvironment in Acute Lymphoblastic Leukemia Predicts a Breakdown of Hematopoietic-Mesenchymal Communication Networks. *Frontiers in physiology* 7:349. DOI: 10.3389/fphys.2016.00349.
- Enciso J, Mendoza L, Álvarez-Buylla ER, Pelayo R. 2020. Dynamical modeling predicts an inflammation-inducible CXCR7+ B cell precursor with potential implications in lymphoid blockage pathologies. *PeerJ* 8:e9902 <https://doi.org/10.7717/peerj.9902>
- Esashi E, Wang Y-H, Perng O, Qin X-F, Liu Y-J, Watowich SS. 2008. The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8. *Immunity* 28:509–20. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.02.013.
- Eyholzer M, Schmid S, Wilkens L, Mueller BU, Pabst T. 2010. The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML. *British journal of cancer* 103:275–84. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605751.
- Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, Hadar R, Plaschkes I, Iny Stein T, Rosen N, Kohn A, Twik M, Safran M, Lancet D, Cohen D. 2017. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database : the journal of biological databases and curation* 2017. DOI: 10.1093/database/bax028.
- Fistonich C, Zehentmeier S, Bednarski JJ, Miao R, Schjerven H, Sleckman BP, Pereira JP. 2018. Cell circuits between B cell progenitors and IL-7 + mesenchymal progenitor cells control B cell development. *The Journal of Experimental Medicine* 215:2586–2599. DOI: 10.1084/jem.20180778.
- Gauthier L, Rossi B, Roux F, Termine E, Schiff C. 2002. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-

- BCR triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:13014–9. DOI: 10.1073/pnas.202323999.
- Ghadiri A, Duhamel M, Fleischer A, Reimann A, Dessauge F, Rebollo A. 2007. Critical function of Ikaros in controlling Aiolos gene expression. *FEBS Letters* 581:1605–1616. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.03.025.
- Glodek AM, Honczarenko M, Le Y, Campbell JJ, Silberstein LE. 2003. Sustained Activation of Cell Adhesion Is a Differentially Regulated Process in B Lymphopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 197:461–473. DOI: 10.1084/jem.20021477.
- Greenbaum A, Hsu Y-MS, Day RB, Schuettpeiz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, Nagasawa T, Link DC. 2013. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495:227–30. DOI: 10.1038/nature11926.
- Grumont RJ, Gerondakis S. 2000. Rel induces interferon regulatory factor 4 (IRF-4) expression in lymphocytes: modulation of interferon-regulated gene expression by rel/nuclear factor kappaB. *The Journal of experimental medicine* 191:1281–92.
- Guo H, Barberi T, Suresh R, Friedman AD. 2018. Progression from the Common Lymphoid Progenitor to B/Myeloid PreproB and ProB Precursors during B Lymphopoiesis Requires C/EBP α . *The Journal of Immunology* 201:1692–1704. DOI: 10.4049/jimmunol.1800244.
- Guo H, Ma O, Speck NA, Friedman AD. 2012. Runx1 deletion or dominant inhibition reduces Cebpa transcription via conserved promoter and distal enhancer sites to favor monopoiesis over granulopoiesis. *Blood* 119:4408–18. DOI: 10.1182/blood-2011-12-397091.
- Györy I, Boller S, Nechanitzky R, Mandel E, Pott S, Liu E, Grosschedl R. 2012. Transcription factor Ebf1 regulates differentiation stage-specific signaling, proliferation, and survival of B cells. *Genes & development* 26:668–82. DOI: 10.1101/gad.187328.112.
- Hart MR, Anderson DJ, Porter CC, Neff T, Levin M, Horwitz MS. 2018. Activating PAX gene family paralogs to complement PAX5 leukemia driver mutations. *PLOS Genetics* 14:e1007642. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007642.
- Herglotz J, Unrau L, Hauschildt F, Fischer M, Kriebitzsch N, Alawi M, Indenbirken D, Spohn M, Müller U, Ziegler M, Schuh W, Jack H-M, Stocking C. 2016. Essential control of early B-cell development by Mef2 transcription factors. *Blood* 127:572–581. DOI: 10.1182/blood-2015-04-643270.
- Herzog S, Hug E, Meixlsperger S, Paik J-H, DePinho R a, Reth M, Jumaa H. 2008. SLP-65 regulates immunoglobulin light chain gene recombination through the PI(3)K-PKB-Foxo pathway. *Nature immunology* 9:623–631. DOI: 10.1038/ni.1616.
- Hirokawa S, Sato H, Kato I, Kudo A. 2003. EBF-regulating Pax5 transcription is enhanced by STAT5 in the early stage of B cells. *European Journal of Immunology* 33:1824–1829. DOI: 10.1002/eji.200323974.
- Hodawadekar S, Park K, Farrar MA, Atchison ML. 2012. A Developmentally Controlled Competitive STAT5–PU.1 DNA Binding Mechanism Regulates Activity of the Ig κ E3' Enhancer. *The Journal of Immunology* 188:2276–2284. DOI: 10.4049/JIMMUNOL.1102239.

- Höfer T, et al. GATA-3 Transcriptional Imprinting in Th2 Lymphocytes: A Mathematical Model. 2002. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 14, pp. 9364–9368.
- Holmes ML, Carotta S, Corcoran LM, Nutt SL. 2006. Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes & development* 20:933–8. DOI: 10.1101/gad.1396206.
- Huang G, Zhang P, Hirai H, Elf S, Yan X, Chen Z, Koschmieder S, Okuno Y, Dayaram T, Growney JD, Shivdasani RA, Gilliland DG, Speck NA, Nimer SD, Tenen DG. 2008. PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nature Genetics* 40:51–60. DOI: 10.1038/ng.2007.7.
- Johnson K, Hashimshony T, Sawai CM, Pongubala JM, Skok JA, Aifantis I, Singh H. 2008. Regulation of Immunoglobulin Light-Chain Recombination by the Transcription Factor IRF-4 and the Attenuation of Interleukin-7 Signaling. *Immunity* 28:335–345. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.12.019.
- Joshi I, Yoshida T, Jena N, Qi X, Zhang J, Van Etten RA, Georgopoulos K. 2014. Loss of Ikaros DNA-binding function confers integrin-dependent survival on pre-B cells and progression to acute lymphoblastic leukemia. *Nature immunology* 15:294–304. DOI: 10.1038/ni.2821.
- Karamitros D, Stoilova B, Aboukhalil Z, Hamey F, Reinisch A, Samitsch M, et al. 2018. Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells. *Nature immunology* 19:85–97. DOI: 10.1038/s41590-017-0001-2.
- Katerndahl CDS, Heltemes-Harris LM, Willette MJL, Henzler CM, Fietze S, Yang R, et al. 2017. Antagonism of B cell enhancer networks by STAT5 drives leukemia and poor patient survival. *Nature immunology* 18:694–704. DOI: 10.1038/ni.3716.
- Kersseboom R, Middendorp S, Dingjan GM, Dahlenborg K, Reth M, Jumaa H, Hendriks RW. 2003. Bruton's tyrosine kinase cooperates with the B cell linker protein SLP-65 as a tumor suppressor in Pre-B cells. *The Journal of experimental medicine* 198:91–8. DOI: 10.1084/jem.20030615.
- Kikuchi K, Kasai H, Watanabe A, Lai AY, Kondo M. 2008. IL-7 specifies B cell fate at the common lymphoid progenitor to pre-proB transition stage by maintaining early B cell factor expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181:383–92.
- Kwon K, Hutter C, Sun Q, Bilic I, Cobaleda C, Malin S, Busslinger M. 2008. Instructive Role of the Transcription Factor E2A in Early B Lymphopoiesis and Germinal Center B Cell Development. *Immunity* 28:751–762. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2008.04.014.
- Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, Lancki DW, Lee H-J, Sciammas R, Gantner BN, Dinner AR, Singh H. 2006. Multilineage Transcriptional Priming and Determination of Alternate Hematopoietic Cell Fates. *Cell* 126:755–766. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.052.
- Lévesque J, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. 2003. Disruption of the CXCR4 / CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *The Journal of clinical investigation* 111:187–196. DOI: 10.1172/JCI200315994. Introduction.
- Li L-X, Goetz CA, Katerndahl CDS, Sakaguchi N, Farrar MA. 2010. A Flt3- and Ras-dependent pathway primes B cell development by inducing a state of IL-7 responsiveness. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184:1728–36. DOI: 10.4049/jimmunol.0903023.

- Li X, Xu Z, Du W, Zhang Z, Wei Y, Wang H, Zhu Z, Qin L, Wang L, Niu Q, Zhao X, Girard L, Gong Y, Ma Z, Sun B, Yao Z, Minna JD, Terada LS, Liu Z. 2014. Aiolos Promotes Anchorage Independence by Silencing p66 Shc Transcription in Cancer Cells. *Cancer Cell* 25:575–589. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.03.020.
- Lidonnici MR, Audia A, Soliera AR, Prisco M, Ferrari-Amorotti G, Waldron T, Donato N, Zhang Y, Martinez R V., Holyoake TL, Calabretta B. 2010. Expression of the Transcriptional Repressor Gfi-1 Is Regulated by C/EBP and Is Involved in Its Proliferation and Colony Formation-Inhibitory Effects in p210BCR/ABL-Expressing Cells. *Cancer Research* 70:7949–7959. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1667.
- Lu D, Nakagawa R, Lazzaro S, Staudacher P, Abreu-Goodger C, Henley T, et al. 2014. The miR-155–PU.1 axis acts on Pax5 to enable efficient terminal B cell differentiation. *The Journal of Experimental Medicine* 211:2183. DOI: 10.1084/JEM.20140338.
- Ma S, Pathak S, Trinh L, Lu R. 2008. Interferon regulatory factors 4 and 8 induce the expression of Ikaros and Aiolos to down-regulate pre-B-cell receptor and promote cell-cycle withdrawal in pre-B-cell development. *Blood* 111:1396–1403. DOI: 10.1182/blood-2007-08-110106.
- Ma S, Turetsky A, Trinh L, Lu R. 2006. IFN regulatory factor 4 and 8 promote Ig light chain kappa locus activation in pre-B cell development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177:7898–904.
- Mansson R, Welinder E, Åhsberg J, Lin YC, Benner C, Glass CK, Lucas JS, Sigvardsson M, Murre C. 2012. Positive intergenic feedback circuitry, involving EBF1 and FOXO1, orchestrates B-cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:21028–33. DOI: 10.1073/pnas.1211427109.
- Marteijn JAF, van der Meer LT, Van Emst L, de Witte T, Jansen JH, van der Reijden BA. 2007. Diminished proteasomal degradation results in accumulation of Gfi1 protein in monocytes. *Blood* 109:100–108. DOI: 10.1182/blood-2006-02-003590.
- Meek K, Xu Y, Bailie C, Yu K, Neal JA. 2016. The ATM Kinase Restrains Joining of Both VDJ Signal and Coding Ends. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 197:3165–3174. DOI: 10.4049/jimmunol.1600597.
- Mendoza L, Méndez A. 2015. A dynamical model of the regulatory network controlling lymphopoiesis. *Biosystems* 137:26–33. DOI: 10.1016/j.biosystems.2015.09.004.
- Mendoza L, Xenarios I. 2006. A method for the generation of standardized qualitative dynamical systems of regulatory networks. *Theoretical biology & medical modelling* 3:13. DOI: 10.1186/1742-4682-3-13.
- Min IM, Pietramaggiore G, Kim FS, Passequé E, Stevenson KE, Wagers AJ. 2008. The Transcription Factor EGR1 Controls Both the Proliferation and Localization of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2:380–391. DOI: 10.1016/J.STEM.2008.01.015.
- Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips L a, Dalton J, Ma J, White D, Hughes TP, Le Beau MM, Pui C-H, Relling M V, Shurtleff S a, Downing JR. 2008. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 453:110–4. DOI: 10.1038/nature06866.

- Müssel C, Hopfensitz M, Kestler H a. 2010. BoolNet-an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics* 26:1378–1380. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq124.
- Nakayama J, Yamamoto M, Hayashi K, Satoh H, Bundo K, Kubo M, Goitsuka R, Farrar MA, Kitamura D. 2008. BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood* 113:1483–1492. DOI: 10.1182/blood-2008-07-166355.
- Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. 1999. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *The Journal of experimental medicine* 190:1201–14. DOI: 10.1084/JEM.190.9.1201.
- Nodland SE, Berkowska M a, Bajer A a, Shah N, de Ridder D, van Dongen JJM, LeBien TW, van Zelm MC. 2011. IL-7R expression and IL-7 signaling confer a distinct phenotype on developing human B-lineage cells. *Blood* 118:2116–27. DOI: 10.1182/blood-2010-08-302513.
- O’Riordan M, Grosschedl R. 1999. Coordinate Regulation of B Cell Differentiation by the Transcription Factors EBF and E2A. *Immunity* 11:21–31. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80078-3.
- Ochiai K, Maienschein-Cline M, Mandal M, Triggs JR, Bertolino E, Sciammas R, Dinner AR, Clark MR, Singh H. 2012. A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nature Immunology* 13:300–307. DOI: 10.1038/ni.2210.
- Ochodnicka-Mackovicova K, Bahjat M, Bloedjes TA, Maas C, Bruin AM De, Bende RJ, Noesel CJM Van, Guikema JEJ. 2015. NF- κ B and AKT signaling prevent DNA damage in transformed pre-B cells by suppressing RAG1 / 2 expression and activity. *Blood* 126:1324–1335. DOI: 10.1182/blood-2015-01-621623.K.O.-M.
- Ochodnicka-Mackovicova K, Bahjat M, Maas C, van der Veen A, Bloedjes TA, de Bruin AM, et al. 2016. The DNA Damage Response Regulates RAG1/2 Expression in Pre-B Cells through ATM-FOXO1 Signaling. *The Journal of Immunology* 197:2918–2929. DOI: 10.4049/jimmunol.1501989.
- Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, Potter NE, Wedge DC, Tubio J, et al. 2014. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics* 46:116–25. DOI: 10.1038/ng.2874.
- Pappu R, Cheng AM, Li B, Gong Q, Chiu C, Griffin N, White M, Sleckman BP, Chan AC. 1999. Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. *Science (New York, N.Y.)* 286:1949–54.
- Park S-Y, Wolfram P, Canty K, Harley B, Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Manis J, Beggs HE, Silberstein LE. 2013. Focal adhesion kinase regulates the localization and retention of pro-B cells in bone marrow microenvironments. *The Journal of Immunology* 190:1094–102. DOI: 10.4049/jimmunol.1202639.
- Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, et al. 2000. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95:3289–96.
- Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R, Martínez-Avalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L, et al. 2011. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC cancer* 11:355. DOI: 10.1186/1471-2407-11-355.

- Perfetti V, Vignarelli MC, Palladini G, Navazza V, Giachino C, Merlini G. 2004. Insights into the regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements via analysis of the kappa light chain locus in lambda myeloma. *Immunology* 112:420–7. DOI: 10.1046/j.1365-2567.2004.01902.x.
- Pongubala JMR, Northrup DL, Lancki DW, Medina KL, Treiber T, Bertolino E, et al. 2008. Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nature Immunology* 9:203–215. DOI: 10.1038/ni1555.
- de Pooter RF, Kee BL. 2010. E proteins and the regulation of early lymphocyte development. *Immunological reviews* 238:93–109. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00957.x.
- Purizaca J, Meza I, Pelayo R. 2012. Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Archives of medical research* 43:89–101. DOI: 10.1016/j.arcmed.2012.03.005.
- Rao KN, Smuda C, Gregory GD, Min B, Brown MA. 2013. Ikaros limits basophil development by suppressing C/EBP- expression. *Blood* 122:2572–2581. DOI: 10.1182/blood-2013-04-494625.
- Roessler S, Gyory I, Imhof S, Spivakov M, Williams RR, Busslinger M, Fisher AG, Grosschedl R. 2007. Distinct Promoters Mediate the Regulation of Ebf1 Gene Expression by Interleukin-7 and Pax5. *Molecular and Cellular Biology* 27:579–594. DOI: 10.1128/MCB.01192-06.
- Rogers JH, Owens KS, Kurkewich J, Klopfenstein N, Iyer SR, Simon MC, Dahl R. 2016. E2A Antagonizes PU.1 Activity through Inhibition of DNA Binding. *BioMed Research International* 2016:1–11. DOI: 10.1155/2016/3983686.
- Schebesta M, Pfeffer PL, Busslinger M. 2002. Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity* 17:473–85. DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00418-1.
- Seo W, Ikawa T, Kawamoto H, Taniuchi I. 2012. Runx1-Cbfb facilitates early B lymphocyte development by regulating expression of Ebf1. *The Journal of experimental medicine* 209:1255–62. DOI: 10.1084/jem.20112745.
- Simonetti G, Carette A, Silva K, Wang H, De Silva NS, Heise N, Siebel CW, Shlomchik MJ, Klein U. 2013. IRF4 controls the positioning of mature B cells in the lymphoid microenvironments by regulating NOTCH2 expression and activity. *Journal of Experimental Medicine* 210.
- Singh H, Pongubala JMR, Medina KL. 2007. Gene regulatory networks that orchestrate the development of B lymphocyte precursors. *Advances in experimental medicine and biology* 596:57–62. DOI: 10.1007/0-387-46530-8_5.
- Spooner CJ, Cheng JX, Pujadas E, Laslo P, Singh H. 2009. A Recurrent Network Involving the Transcription Factors PU.1 and Gfi1 Orchestrates Innate and Adaptive Immune Cell Fates. *Immunity* 31:576–586. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.07.011.
- Stehling-Sun S, Dade J, Nutt SL, DeKoter RP, Camargo FD. 2009. Regulation of lymphoid versus myeloid fate “choice” by the transcription factor Mef2c. *Nature Immunology* 10:289–296. DOI: 10.1038/ni.1694.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25:977–88. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.10.016.

- Tabe Y, Jin L, Tsutsumi-Ishii Y, Xu Y, McQueen T, Priebe W, Mills GB, Ohsaka A, Nagaoka I, Andreeff M, Konopleva M. 2007. Activation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Research* 67:684–694. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3166.
- Tarnowski M, Kucia M, Ratajczak MZ. 2009. Isolation and Functional Analysis of CXCR7 Promoter - a Novel Receptor for Stromal Derived Factor-1 (SDF-1): Different Regulation of Expression in Human Hematopoietic Cells Versus Pediatric Sarcomas. *Blood* 114.
- Tarnowski M, Liu R, Wysoczynski M, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. 2010. CXCR7: A new SDF-1-binding receptor in contrast to normal CD34+ progenitors is functional and is expressed at higher level in human malignant hematopoietic cells. *European Journal of Haematology* 85:472–483. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2010.01531.x.
- Terashima A, Okamoto K, Nakashima T, Akira S, Ikuta K, Takayanagi H. 2016. Sepsis-Induced Osteoblast Ablation Causes Immunodeficiency. *Immunity* 44:1434–1443. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.05.012.
- Thompson EC, Cobb BS, Sabbattini P, Meixlsperger S, Parelho V, Liberg D, Taylor B, Dillon N, Georgopoulos K, Jumaa H, Smale ST, Fisher AG, Merkenschlager M. 2007. Ikaros DNA-Binding Proteins as Integral Components of B Cell Developmental-Stage-Specific Regulatory Circuits. *Immunity* 26:335–344. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.02.010.
- Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi B-I, Nagasawa T. 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20:707–18. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.05.001.
- Torossian F, Anginot A, Chabanon A, Clay D, Guerton B, Desterke C, et al. 2014. CXCR7 participates in CXCL12-induced CD34+ cell cycling through b-arrestin-dependent Akt activation. *Blood* 123:191–202. DOI: 10.1182/blood-2013-05-500496.
- Übelhart R, Bach MP, Eschbach C, Wossning T, Reth M, Jumaa H. 2010. N-linked glycosylation selectively regulates autonomous precursor BCR function. *Nature Immunology* 11:759–765. DOI: 10.1038/ni.1903.
- Uto-Konomi A, McKibben B, Wirtz J, Sato Y, Takano A, Nanki T, Suzuki S. 2013. CXCR7 agonists inhibit the function of CXCL12 by down-regulation of CXCR4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431:772–776. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.032.
- Villarreal C, Padilla-Longoria P, Alvarez-Buylla ER. 2012. General Theory of Genotype to Phenotype Mapping: Derivation of Epigenetic Landscapes from N-Node Complex Gene Regulatory Networks. *Physical Review Letters* 109:118102. DOI: 10.1103/PhysRevLett.109.118102.
- Wang H, Guan X, Tu Y, Zheng S, Long J, Li S, Qi C, Xie X, Zhang H, Zhang Y. 2015. MicroRNA-29b attenuates non-small cell lung cancer metastasis by targeting matrix metalloproteinase 2 and PTEN. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 34:59. DOI: 10.1186/s13046-015-0169-y.
- Welinder E, Mansson R, Mercer EM, Bryder D, Sigvardsson M, Murre C. 2011. The transcription factors E2A and HEB act in concert to induce the expression of FOXO1 in the common lymphoid progenitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:17402–7. DOI: 10.1073/pnas.1111766108.

- Welner RS, Pelayo R, Kincade PW. 2008. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nature reviews. Immunology* 8:95–106. DOI: 10.1038/nri2234.
- Yokota, T. "Hierarchy" and "Holacracy"; A Paradigm of the Hematopoietic System. *Cells*. 8(10):1138. (2019). DOI:10.3390/cells8101138
- Yücel R, Kosan C, Heyd F, Möröy T. 2004. Gfi1: Green fluorescent protein knock-in mutant reveals differential expression and autoregulation of the growth factor independence 1 (Gfi1) gene during lymphocyte development. *The Journal of biological chemistry* 279:40906–17. DOI: 10.1074/jbc.M400808200.
- Zandi S, Mansson R, Tsapogas P, Zetterblad J, Bryder D, Sigvardsson M. 2008. EBF1 Is Essential for B-Lineage Priming and Establishment of a Transcription Factor Network in Common Lymphoid Progenitors. *The Journal of Immunology* 181:3364–3372. DOI: 10.4049/jimmunol.181.5.3364.
- Zarnegar MA, Rothenberg E V. 2012. Ikaros represses and activates PU.1 cell-type-specifically through the multifunctional Sfpi1 URE and a myeloid specific enhancer. *Oncogene* 31:4647–54. DOI: 10.1038/onc.2011.597.
- Zehentmeier S, Pereira JP. 2019. Cell circuits and niches controlling B cell development. *Immunological Reviews* 289:142–157. DOI: 10.1111/imr.12749.
- Zhou N, Gutierrez-Uzquiza A, Zheng XY, Chang R, Vogl DT, Garfall AL, Bernabei L, Saraf A, Florens L, Washburn MP, Illendula A, Bushweller JH, Busino L. 2019. RUNX proteins desensitize multiple myeloma to lenalidomide via protecting IKZFs from degradation. *Leukemia*:1. DOI: 10.1038/s41375-019-0403-2.

Anexo 2. Tabla complementaria de la Figura 8B con la comparación entre los atractores obtenidos de las simulaciones de redes mutantes y los reportes experimentales de inhibición y expresión constitutiva. El código de colores de la primera columna corresponde a los bloques representados del lado izquierdo del mapa de calor presentado en la Figura 8B. Tomada de la Información Suplementaria de Enciso et al. 2020 (Artículo en inglés).

Node	Mut	Model interpretation	Observation	References	
Csf1r	KO	No effect in the transcriptional core during B cell differentiation	Output		
BCR	KO		Output		
Flt3L	OA		Input		
IL7	OA		Input		
BCR	OA		Output		
Csf1r	OA		Output		
Ikzf1	OA		No effect, as they are active since the LMPP stage and maintain their activation through all early B cell differentiation stages recovered by the wild-type model.		
Spi1	OA				
Runx1	OA				
Cxcr7	KO		No effect, in concordance with its low expression in normal lymphoid cell lines and hematopoietic progenitors.		(Tarnowski et al., 2010)
Egr1	KO	Egr1 do not have an evident role in the lymphopoietic transcription factor network, at least until cells migrate to the spleen, where B cells upregulate their expression.		(Collombet et al., 2017)	
VCAM1_VLA4	OA	VCAM-1/VLA-4 involvement in lymphoid differentiation, is related to migration between niches and not directly to an effect in the transcriptional network.		(Peled et al., 2000)	
PI3KIA	OA	Perturbation at the pro-B/pre-B cell stage without affecting the differentiation process	PI3KIA overactivation affects FOXO1 at the pre-B stage when NFkB also, a FOXO1 repressor, is activated downstream the pre-BCR. The inhibition of PTEN, a PI3K regulator, revealed only poor reduction in cell numbers of the developmental stages	(Powers et al., 2012)	

Node	Mut	Model interpretation	Observation	References
			following pro-B cells.	
PI3KIA	KO	Determinant during pre-B cell stage, but not in the main core Regulating cellular transition to immature B-cell	In mice deficient for the regulatory or the catalytic subunit of PI3K Class I, B cell development was slightly blocked at the pre-B cell stage.	(Fruman et al., 1999; Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002)
Cxcr4	KO		Pro-B and pre-B cell numbers were severely reduced in the BM of mutant mice with a disrupted expression of SDF-1/CXCL12 or its receptor CXCR4.	(Nagasawa et al., 1996; Ma et al., 1998)
Cxcr4	OA		Overexpression of CXCR4 in hematopoietic progenitor cells alter their homing and reconstitution potential, having a role on migration and proliferation.	(Kahn et al., 2004)
Cebpa	KO		Absence of C/EBP α prevents formation of GMPs and myeloid colony-forming units, in addition it has been reported that LMPPs keep some capacity to generate granulocytic, monocyte/macrophage and granulocyte-macrophage colonies. When Cebpa is inhibited, the transition towards Immature B cell is reduced and in consequence, some intermediate stages are outdated.	(Heath et al., 2004; Karamitros et al., 2018)
Spi1_2	KO		Similar to Cebpa, Spi1_2 mutation in the model inhibits, since the first time-steps the option of activating myeloid lineage elements, accelerating the establishment of the nodes determining the lymphoid lineage.	Inferred explanation, no specific reference.
Cxcr7	OA	No clear effect	The effect of Cxcr7 on PI3K and Cxcr4 activation is not sufficient to affect B cell differentiation, but generate transient perturbations in two particular stages: prepro-B and	(Melo et al., 2014)

Node	Mut	Model interpretation	Observation	References
			pre-B.	
Irf4	KO	B cell arrest at late pro-B/pre-B stage	B-cell development of IRF-4,8-/- double mutant mice, is arrested at the pre-B stage. IRF-4 and IRF-8 have redundant activities, but IRF-8 was not included in the current model.	(Lu et al., 2003)
Flt3	OA		Enforced expression of FLT3 in mice HSC affects B-cell precursors frequency, CLP transitioning to B cell progenitors, but not committed B cells.	(Holmes et al., 2006)
SLP65	KO		Inadequate signaling of pre-BCR, as observed with BLNK gene mutations, induces a block in B-cell development at the pro-B-cell to pre-B-cell transition.	(Minegishi et al., 1999)
preBCR	KO			
Pax5	KO		Pax-5-/- mice do not commit to the immature B stage and get arrested at the pro-B stage.	(Urbánek et al., 1994; Cobaleda et al., 2007)
STAT5	KO	Blockage CLP or early pre-pro-B stage	STAT5 knock-outs lead to hematopoietic defects with particular deficiency in pre-proB or pro-B development.	(Teglund et al., 1998; Goetz et al., 2004; Yao et al., 2006)
Il7r	KO		Adult mice expressing mutated IL-7, or any of the two chains comprising IL-7R, show a significant arrest at the pre-pro-B cell stage or even early, at the CLP stage.	(Miller et al., 2002; Kikuchi et al., 2005)
Ebf1	KO		EBF deficient mice lack immunoglobulin-expressing B-cells, but contain progenitor cells expressing IL-7 receptor transcripts	(Lin & Grosschedl, 1995)
NFkB	KO		Loss of NF-kB pathway members leads to an accumulation of HSCs and a decrease of myeloid and lymphoid progenitors. Additionally, the inhibition of NF-kB activity on pro-B	(Cadera et al., 2009; Stein & Baldwin, 2013)

Node	Mut	Model interpretation	Observation	References
			cells, inhibits light chain rearrangements for pre-BCR.	
Foxo1	KO		Deletion of Foxo 1,3 and 4 in HSCs leads to a severe block in the generation of CLPs. While, Foxo1 conditional mutation in early B-cell progenitors derives in a reduction of immature and circulating B-cells, and an increase in the percentage of BM pro-B cells.	(Tothova et al., 2007; Dengler et al., 2008)
VCAM1_VLA4	KO		Mice chimeric for the expression of $\alpha 4$, a subunit of VLA-4 integrin, showed a significant reduction on pre-B cells and mature B cells, suggesting a severe failure in B cell development before pre-B stage.	(Arroyo et al., 1996)
Flt3	KO		FLT3 conditional KO significantly decreases the numbers of LMPPs and ETPs in adult mice, but not CLPs and B cell progenitors. However, Flt3-deleted LMPPs or CLPs, showed a disadvantage in producing B-cell progenitors compared to non-deleted progenitors.	(Zriwil et al., 2018)
preBCR	OA		There is no biological interpretation, as there is no report of pre-BCR expression and activation at an earlier stage. However, pre-BCR constitutive activation at the pro-B stage, derives in enhanced proliferation without progressing to pre-B cell.	(Schebesta, Pfeffer & Busslinger, 2002)
Irf4	OA		Irf4 OA, blocks simulation before CLP stage because because it inhibits IL7r activation.	(Johnson et al., 2008; Ma et al., 2008)
Il7	KO		Adult mice expressing mutated IL-7, or any of the two chains comprising IL-7R, show a significant arrest at the	(Miller et al., 2002; Kikuchi et al., 2005)

Node	Mut	Model interpretation	Observation	References
			pre-pro-B cell stage or even early, at the CLP stage.	
Flt3L	KO		Flt3 deficient mice showed a reduction in leukocyte cellularity and a severe ablation of dendritic and NK cells, suggesting that it affects at a progenitor stage.	(McKenna et al., 2000)
SLP65	OA		There is no biological interpretation, as there is no report of pre-BCR expression and activation at an earlier stage. However, pre-BCR constitutive activation at the pro-B stage, derives in enhanced proliferation without progressing to pre-B cell.	(Schebesta, Pfeffer & Busslinger, 2002)
NFKB	OA		Inflammation, probably mediated by NF-kB responses, induce lymphocyte mobilization to extramedullar niches and enhances granulopoiesis in the BM. However its induction in the model blocks differentiation at the CLP due to the negative regulation of Rag and early IRF4 activation.	(Ueda et al., 2004; Enciso, Mendoza & Pelayo, 2015)
Tcf3	KO		E2A deletion completely inhibits immunoglobulin gene recombination for B cell production but has little effect on T lineage precursors, suggesting that it is dispensable for ELP production but blocks CLP progression to pro-B cells.	(Bain et al., 1997; Borghesi et al., 2005)
Spi1_2	OA	Complete B cell blockage at LMPP	Overexpression of PU. 1 in normal hematopoietic progenitors blocks B cell development	(DeKoter, Lee & Singh, 2002)
Gfi1	KO		Gfi1 deficiency impairs lymphopoiesis in MPPs and LMPPs showing to be critical to sustain B-cell commitment.	(Spooner et al., 2009; Fraszczak et al., 2016)

Node	Mut	Model interpretation	Observation	References
Egr1	OA		No reports of Egr1 OA effects on early B-cell differentiation were found. However, its increased expression has been associated to maintenance of LT-HSC, and development of leukemia.	(Tian et al., 2016)
Cebpa	OA		C/EBP α levels increase as long-term stem cells progress to granulocyte–monocyte progenitors (GMP). Over-expression of WT C/EBP α in cordon blood-derived Lin- cells, led to a significant reduction in the total number of CFUs.	(Quintana-Bustamante et al., 2012)
Runx1	KO		RUNX1 is required for the maintenance of platelets and lymphocytes, probably with a greater participation during development than in adult hematopoiesis.	(Ichikawa et al., 2004)
Spi1	KO		PU.1 -/- hematopoietic multipotential progenitors produce defects in lymphoid differentiation at a progenitor stage, in addition to the effects caused by the loss of IL-7R expression.	(DeKoter, Lee & Singh, 2002)
Ikzf1	KO		Null Ikaros mice lack B lymphocytes and their earliest progenitors	(Wang et al., 1996)
Foxo1	OA		Forced activation of FOXO1 lower the proliferation rate of ALL cells.	(Köhler et al., 2016)
Il7r	OA		Gain-of-function mutations in acute lymphoblastic leukemias has been associated to an enhanced growth of progenitor lymphoid cells.	(Shochat et al., 2011)
Pax5	OA		Pax5 overactivation produces the phenotype reported experimentally for Flt3 KO, where LMPP compartment is affected. Eventhough, FLT3 KO in our model	(Holmes et al., 2006; Zriwil et al., 2018)

Node	Mut	Model interpretation	Observation	References
			didn't showed this behavior.	
STAT5	OA		Induced overexpression of STAT5 induces erythropoiesis through the induction of GATA-1, a transcription factor that participates in a negative feedback loop with the lymphoid factor Ikaros.	(Wierenga, Vellenga & Schuringa, 2010; Malinge et al., 2013)
Tcf3	OA	Perturbation during lymphoid commitment without differentiation blockage.	Overexpression of E47, one of the proteins encoded by Tcf3 gene, derives in the induction of cellular proliferation.	(Zhao et al., 2001; Schwartz et al., 2006)
Gfi1	OA		A role of Gfi1 overactivation in acute lymphoblastic leukemia cells, has been suggested. However its contribution is probably not related to the transcriptional differentiation core but to other related mechanisms involved in lymphopoiesis.	(Purizaca et al., 2013)
Ebf1	OA		Enforced expression of EBF1 in hematopoietic progenitors, restricts lymphopoiesis to the B cell lineage limiting other lymphoid phenotypes.	(Zhang et al., 2003)

Referencias del Anexo 2

- Arroyo AG, Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. 1996. Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* 85:997–1008. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81301-x.
- Bain G, Robanus Maandag EC, te Riele HP, Feeney AJ, Sheehy A, Schlissel M, Shinton SA, Hardy RR, Murre C. 1997. Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity* 6:145–54.
- Borghesi L, Aites J, Nelson S, Lefterov P, James P, Gerstein R. 2005. E47 is required for V(D)J recombinase activity in common lymphoid progenitors. *The Journal of experimental medicine* 202:1669–77. DOI: 10.1084/jem.20051190.
- Cadera EJ, Wan F, Amin RH, Nolla H, Lenardo MJ, Schlissel MS. 2009. NF-kappaB activity marks cells engaged in receptor editing. *The Journal of experimental medicine* 206:1803–16. DOI: 10.1084/jem.20082815.

- Clayton E, Bardi G, Bell SE, Chantry D, Downes CP, Gray A, Humphries LA, Rawlings D, Reynolds H, Vigorito E, Turner M. 2002. A Crucial Role for the p110 δ Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase in B Cell Development and Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 196:753–763. DOI: 10.1084/jem.20020805.
- Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. 2007. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature Immunology* 8:463–470. DOI: 10.1038/ni1454.
- Collombet S, van Oevelen C, Sardina Ortega JL, Abou-Jaoudé W, Di Stefano B, Thomas-Chollier M, Graf T, Thieffry D. 2017. Logical modeling of lymphoid and myeloid cell specification and transdifferentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114:5792–5799. DOI: 10.1073/pnas.1610622114.
- DeKoter RP, Lee H-J, Singh H. 2002. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* 16:297–309. DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00269-8.
- Dengler HS, Baracho G V, Omori SA, Bruckner S, Arden KC, Castrillon DH, DePinho RA, Rickert RC. 2008. Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nature immunology* 9:1388–98. DOI: 10.1038/ni.1667.
- Enciso J, Mendoza L, Pelayo R. 2015. Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology. *Frontiers in Genetics* 6:1–5. DOI: 10.3389/fgene.2015.00290.
- Fraszczak J, Helness A, Chen R, Vadnais C, Robert F, Khandanpour C, Möröy T. 2016. Threshold Levels of Gfi1 Maintain E2A Activity for B Cell Commitment via Repression of Id1. *PLOS ONE* 11:e0160344. DOI: 10.1371/journal.pone.0160344.
- Fruman DA, Snapper SB, Yballe CM, Davidson L, Yu JY, Alt FW, Cantley LC. 1999. Impaired B Cell Development and Proliferation in Absence of Phosphoinositide 3-Kinase p85. *Science* 283:393–397. DOI: 10.1126/science.283.5400.393.
- Goetz CA, Harmon IR, O'Neil JJ, Burchill MA, Farrar MA. 2004. STAT5 activation underlies IL7 receptor-dependent B cell development. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172:4770–8. DOI: 10.4049/jimmunol.172.8.4770.
- Heath V, Suh HC, Holman M, Renn K, Gooya JM, Parkin S, Klarmann KD, Ortiz M, Johnson P, Keller J. 2004. C/EBP deficiency results in hyperproliferation of hematopoietic progenitor cells and disrupts macrophage development in vitro and in vivo. *Blood* 104:1639–1647. DOI: 10.1182/blood-2003-11-3963.
- Holmes ML, Carotta S, Corcoran LM, Nutt SL. 2006. Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes & development* 20:933–8. DOI: 10.1101/gad.1396206.
- Ichikawa M, Asai T, Saito T, Yamamoto G, Seo S, Yamazaki I, et al. 2004. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nature Medicine* 10:299–304. DOI: 10.1038/nm997.

- Johnson K, Hashimshony T, Sawai CM, Pongubala JM, Skok JA, Aifantis I, Singh H. 2008. Regulation of Immunoglobulin Light-Chain Recombination by the Transcription Factor IRF-4 and the Attenuation of Interleukin-7 Signaling. *Immunity* 28:335–345. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.12.019.
- Jou S-T, Carpino N, Takahashi Y, Piekorz R, Chao J-R, Carpino N, Wang D, Ihle JN. 2002. Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Molecular and cellular biology* 22:8580–91. DOI: 10.1128/mcb.22.24.8580-8591.2002.
- Kahn J, Byk T, Jansson-Sjostrand L, Petit I, Shvitiel S, Nagler A, Hardan I, Deutsch V, Gazit Z, Gazit D, Karlsson S, Lapidot T. 2004. Overexpression of CXCR4 on human CD34+ progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation. *Blood* 103:2942–2949. DOI: 10.1182/blood-2003-07-2607.
- Karamitros D, Stoilova B, Aboukhalil Z, Hamey F, Reinisch A, Samitsch M, Quek L, Otto G, Repapi E, Doondeea J, Usukhbayar B, Calvo J, Taylor S, Goardon N, Six E, Pflumio F, Porcher C, Majeti R, Göttgens B, Vyas P. 2018. Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells. *Nature immunology* 19:85–97. DOI: 10.1038/s41590-017-0001-2.
- Kikuchi K, Lai AY, Hsu C-L, Kondo M. 2005. IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *The Journal of Experimental Medicine* 201:1197. DOI: 10.1084/JEM.20050158.
- Köhler S, Havranek O, Seyfried F, Hurtz C, Coffey GP, Kim E, et al. 2016. Pre-BCR signaling in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia regulates PI3K/AKT, FOXO1 and MYC, and can be targeted by SYK inhibition. *Leukemia* 30:1246–1254. DOI: 10.1038/leu.2016.9.
- Lin H, Grosschedl R. 1995. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 376:263–267. DOI: 10.1038/376263a0.
- Lu R, Medina KL, Lancki DW, Singh H. 2003. IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes & development* 17:1703–8. DOI: 10.1101/gad.1104803.
- Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:9448–9453.
- Ma S, Pathak S, Trinh L, Lu R. 2008. Interferon regulatory factors 4 and 8 induce the expression of Ikaros and Aiolos to down-regulate pre-B-cell receptor and promote cell-cycle withdrawal in pre-B-cell development. *Blood* 111:1396–1403. DOI: 10.1182/blood-2007-08-110106.
- Malinge S, Thiollier C, Chlon TM, Doré LC, Diebold L, Bluteau O, Mabialah V, Vainchenker W, Dessen P, Winandy S, Mercher T, Crispino JD. 2013. Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signaling. *Blood* 121:2440–2451. DOI: 10.1182/BLOOD-2012-08-450627.
- McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD, Peschon JJ. 2000. Mice lacking flt3

ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95:3489–97.

Melo R, Longhini AL, Louzao Bigarella C, Ozello Baratti M, Traina F, Favaro P, De Melo Campos P, Olalla Saad ST. 2014. CXCR7 Is Highly Expressed in Acute Lymphoblastic Leukemia and Potentiates CXCR4 Response to CXCL12. *PLoS ONE* 9:e85926. DOI: 10.1371/journal.pone.0085926.

Miller JP, Izon D, DeMuth W, Gerstein R, Bhandoola A, Allman D. 2002. The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. *The Journal of experimental medicine* 196:705–11. DOI: 10.1084/JEM.20020784.

Minegishi Y, Rohrer J, Coustan-Smith E, Lederman HM, Pappu R, Campana D, Chan AC, Conley ME. 1999. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science (New York, N.Y.)* 286:1954–7. DOI: 10.1126/science.286.5446.1954.

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and BM myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF-SDF1. *Nature* 382:635–638.

Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. 2000. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95:3289–96.

Powers SE, Mandal M, Matsuda S, Miletic A V., Cato MH, Tanaka A, Rickert RC, Koyasu S, Clark MR. 2012. Subnuclear cyclin D3 compartments and the coordinated regulation of proliferation and immunoglobulin variable gene repression. *The Journal of Experimental Medicine* 209:2199–2213. DOI: 10.1084/jem.20120800.

Purizaca J, Contreras-Quiroz A, Dorantes-Acosta E, Vadillo E, Arriaga-Pizano L, Fuentes-Figueroa S, et al. 2013. Lymphoid progenitor cells from childhood acute lymphoblastic leukemia are functionally deficient and express high levels of the transcriptional repressor *gfi-1*. *Clinical & developmental immunology* 2013:349067. DOI: 10.1155/2013/349067.

Quintana-Bustamante O, Lan-Lan Smith S, Griessinger E, Rey Y, Vargaftig J, Lister TA, Fitzgibbon J, Bonnet D. 2012. Overexpression of wild-type or mutants forms of CEBPA alter normal human hematopoiesis. *Leukemia* 26:1537–46. DOI: 10.1038/leu.2012.38.

Schebesta M, Pfeffer PL, Busslinger M. 2002. Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity* 17:473–85. DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00418-1.

Schwartz R, Engel I, Fallahi-Sichani M, Petrie HT, Murre C. 2006. Gene expression patterns define novel roles for E47 in cell cycle progression, cytokine-mediated signaling, and T lineage development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:9976–9981. DOI: 10.1073/pnas.0603728103.

Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, Cario G, Cazzaniga G, Kulozik AE, Stanulla M, Schrappe M, Biondi A, Basso G, Bercovich D, Muckenthaler MU, Izraeli S. 2011.

- Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *The Journal of Experimental Medicine* 208:901–908. DOI: 10.1084/jem.20110580.
- Spooner CJ, Cheng JX, Pujadas E, Laslo P, Singh H. 2009. A Recurrent Network Involving the Transcription Factors PU.1 and Gfi1 Orchestrates Innate and Adaptive Immune Cell Fates. *Immunity* 31:576–586. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.07.011.
- Stein SJ, Baldwin AS. 2013. Deletion of the NF- κ B subunit p65/RelA in the hematopoietic compartment leads to defects in hematopoietic stem cell function. *Blood* 121:5015–24. DOI: 10.1182/blood-2013-02-486142.
- Tarnowski M, Liu R, Wysoczynski M, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. 2010. CXCR7: A new SDF-1-binding receptor in contrast to normal CD34+ progenitors is functional and is expressed at higher level in human malignant hematopoietic cells. *European Journal of Haematology* 85:472–483. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2010.01531.x.
- Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93:841–50. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81444-0.
- Tian J, Li Z, Han Y, Jiang T, Song X, Jiang G. 2016. The progress of early growth response factor 1 and leukemia. *Intractable & Rare Diseases Research* 5:76–82. DOI: 10.5582/irdr.2015.01049.
- Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegué E, DePinho RA, Gilliland DG. 2007. FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell* 128:325–339. DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.003.
- Ueda Y, Yang K, Foster SJ, Kondo M, Kelsoe G. 2004. Inflammation Controls B Lymphopoiesis by Regulating Chemokine CXCL12 Expression. *The Journal of Experimental Medicine* 199:47–58. DOI: 10.1084/jem.20031104.
- Urbánek P, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M. 1994. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 79:901–12. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90079-5.
- Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, Georgopoulos K. 1996. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 5:537–49.
- Wierenga ATJ, Vellenga E, Schuringa JJ. 2010. Down-regulation of GATA1 uncouples STAT5-induced erythroid differentiation from stem/progenitor cell proliferation. *Blood* 115:4367–76. DOI: 10.1182/blood-2009-10-250894.
- Yao Z, Cui Y, Watford WT, Bream JH, Yamaoka K, Hissong BD, Li D, Durum SK, Jiang Q, Bhandoola A, Hennighausen L, O’Shea JJ. 2006. Stat5a/b are essential for normal lymphoid development and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:1000–5. DOI: 10.1073/pnas.0507350103.

- Zhang Z, Cotta C V, Stephan RP, deGuzman CG, Klug CA. 2003. Enforced expression of EBF in hematopoietic stem cells restricts lymphopoiesis to the B cell lineage. *The EMBO Journal* 22:4759–4769. DOI: 10.1093/emboj/cdg464.
- Zhao F, Vilaridi A, Neely RJ, Choi JK. 2001. Promotion of cell cycle progression by basic helix-loop-helix E2A. *Molecular and cellular biology* 21:6346–57. DOI: 10.1128/mcb.21.18.6346-6357.2001.
- Zriwil A, Böiers C, Kristiansen TA, Wittmann L, Yuan J, Nerlov C, Sitnicka E, Jacobsen SEW. 2018. Direct role of FLT3 in regulation of early lymphoid progenitors. *British journal of haematology* 183:588–600. DOI: 10.1111/bjh.15578.

Anexo 3. Análisis *in silico* de unión de miRNAs a TLR8

Predicted TLR8 miRNA-agonists overexpressed in ALL			
	Cluster population (Minimum)	miRNAs sequence (5' to 3')	Binding Affinity (kJ/mol)
miR-146a	1°	¹ UG ² A ³ GA ⁴ A ⁵ C ⁶ U ⁷ G ⁸ AAU ⁹ CC ¹⁰ AUGGGUU ²²	-35.17
	2°	¹ UGAGAACUG ⁵ AAU ¹² UCCA ¹⁶ U ¹⁷ G ¹⁸ G ¹⁹ GUU ²²	-29.31
miR-181	1°	¹ AA ² C ³ AU ⁴ UC ⁷ A ⁸ UUGCUGUCGGUGGGU ²³	-29.73
	2°	¹ AACAUU ⁶ CA ⁸ U ⁹ U ¹⁰ G ¹¹ C ¹² U ¹³ GUCGGUGGGU ²³	-24.7
miR-199	1°	¹ AC ² A ³ G ⁴ U ⁵ A ⁶ G ⁷ U ⁸ C ⁹ UGCACA ¹⁵ UUGGUUA ²²	-32.24
	2°	¹ ACAGUAGUC ⁹ U ¹⁰ G ¹¹ C ¹² A13C14A ¹⁵ U ¹⁶ U ¹⁷ GGUUA ²²	-27.63
Wildtype and mutated lung cancer miRNA			
miR-21	1°	¹ UAGCU ³ U ⁴ A ⁵ U ⁶ C ⁹ A ¹⁰ GACUG ¹⁵ AUG ¹⁸ UUGA ²²	-30.98
	2°	¹ UAGCUUAUCAGACUGAUG ¹⁸ U ¹⁹ U ²⁰ GA ²²	-27.63
miR-21 G18	1°	¹ UA ² G ³ C ⁴ UU ⁵ A ⁷ U ⁸ CA ¹⁰ G ¹¹ ACUG ¹⁵ A ¹⁶ U ¹⁷ UUUGA ²²	-30.14
	2°	¹ UAGCUUAUCAG ¹¹ A ¹² CUGAU ¹⁷ UU ¹⁹ U ²⁰ G ²¹ A ²²	-30.14
miR-21 U20	1°	¹ UAGCU ³ UAUC ⁹ A ¹⁰ GACUGAUGUGGA ²²	-28.89
	2°	¹ UAGCU ³ A ⁷ UCAGACUGA ¹⁶ U ¹⁷ G ¹⁸ U ¹⁹ GGA ²²	-23.45

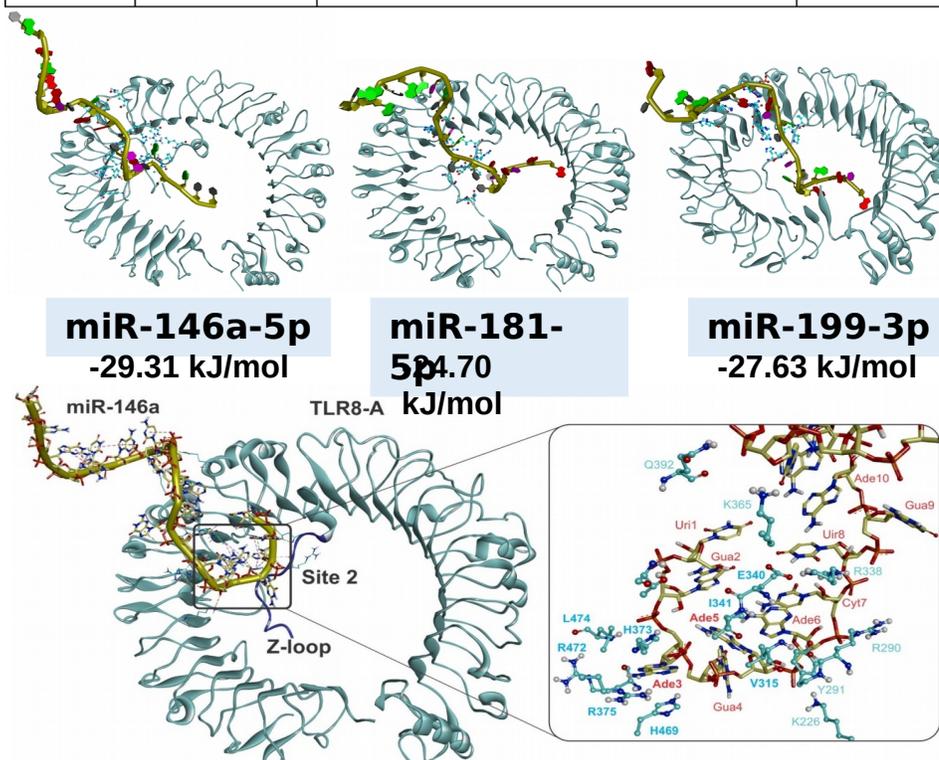


Figura Anexo 2. Evaluación *in silico* del potencial de unión de miR-146a-5p, miR-181-5p y miR-199-3p, a TLR8. Comparación de las afinidades de unión calculadas para los tres miRNAs sobreexpresados en LLA y con motivos GU en la posición 18-21, y los miRNAs estudiados por Fabbri y colaboradores en cáncer de pulmón. El miR-146a tuvo la menor afinidad de unión (-35,17 kJ/mol) al monómero A de TLR8. En las ilustraciones con los complejos miRNA/TLR8 se resaltan los residuos de la bolsa de unión de TLR8 que interactúan con los nucleótidos de los miRNAs. En letras azules los residuos de TLR8 y en letras rojas, los nucleótidos de miRNA.

Anexo 4. Publicaciones realizadas durante los estudios e investigación de doctorado.

Artículo de revisión: Enciso J, Mendoza L, Álvarez-Buylla ER, Pelayo R. 2020. Dynamical modeling predicts an inflammation-inducible CXCR7+ B cell precursor with potential implications in lymphoid blockage pathologies. PeerJ 8:e9902 <https://doi.org/10.7717/peerj.9902>



From Discrete to Continuous Modeling of Lymphocyte Development and Plasticity in Chronic Diseases

Jennifer Enciso^{1,2,3}, Rosana Pelayo¹ and Carlos Villarreal^{3,4*}

¹ Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico, ² Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ³ Centro de Ciencias de la Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ⁴ Departamento de Física Cuántica y Fotónica, Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Gennady Bocharov,
Institute of Numerical Mathematics
(RAS), Russia

Reviewed by:

Y-h. Taguchi,
Chuo University, Japan
Sylvain Cussat-Blanc,
Université de Toulouse, France

*Correspondence:

Carlos Villarreal
carlos@fisica.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Innate Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 12 December 2018

Accepted: 30 July 2019

Published: 20 August 2019

The molecular events leading to differentiation, development, and plasticity of lymphoid cells have been subject of intense research due to their key roles in multiple pathologies, such as lymphoproliferative disorders, tumor growth maintenance and chronic diseases. The emergent roles of lymphoid cells and the use of high-throughput technologies have led to an extensive accumulation of experimental data allowing the reconstruction of gene regulatory networks (GRN) by integrating biochemical signals provided by the microenvironment with transcriptional modules of lineage-specific genes. Computational modeling of GRN has been useful for the identification of molecular switches involved in lymphoid specification, prediction of microenvironment-dependent cell plasticity, and analyses of signaling events occurring downstream the activation of antigen recognition receptors. Among most common modeling strategies to analyze the dynamical behavior of GRN, discrete dynamic models are widely used for their capacity to capture molecular interactions when a limited knowledge of kinetic parameters is present. However, they are less powerful when modeling complex systems sensitive to biochemical gradients. To compensate it, discrete models may be transformed into regulatory networks that includes state variables and parameters varying within a continuous range. This approach is based on a system of differential equations dynamics with regulatory interactions described by fuzzy logic propositions. Here, we discuss the applicability of this method on modeling of development and plasticity processes of adaptive lymphocytes, and its potential implications in the study of pathological landscapes associated to chronic diseases.

Keywords: lymphocytes, chronic diseases, boolean, fuzzy logic, computational modeling

Artículo de investigación. Enciso J, Pelayo R and Villarreal C. 2019. From Discrete to Continuous Modeling of Lymphocyte Development and Plasticity in Chronic Diseases. *Front. Immunol.* 10:1927. doi: <https://10.3389/fimmu.2019.01927>



Dynamical modeling predicts an inflammation-inducible CXCR7⁺ B cell precursor with potential implications in lymphoid blockage pathologies

Jennifer Enciso^{1,2,3}, Luis Mendoza⁴, Elena R. Álvarez-Buylla⁵ and Rosana Pelayo¹

¹ Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Delegación Puebla, Instituto Mexicano del Seguro Social, Metepec, Puebla, Mexico

² Centro de Ciencias de la Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

³ Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

⁴ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

⁵ Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

ABSTRACT

Background. The blockage at the early B lymphoid cell development pathway within the bone marrow is tightly associated with hematopoietic and immune diseases, where the disruption of basal regulatory networks prevents the continuous replenishment of functional B cells. Dynamic computational models may be instrumental for the comprehensive understanding of mechanisms underlying complex differentiation processes and provide novel prediction/intervention platforms to reinvigorate the system.

Methods. By reconstructing a three-module regulatory network including genetic transcription, intracellular transduction, and microenvironment communication, we have investigated the early B lineage cell fate decisions in normal and pathological settings. The early B cell differentiation network was simulated as a Boolean model and then transformed, using fuzzy logic, to a continuous model. We tested null and overexpression mutants to analyze the emergent behavior of the network. Due to its importance in inflammation, we investigated the effect of NFκB induction at different early B cell differentiation stages.

Results. While the exhaustive synchronous and asynchronous simulation of the early B cell regulatory network (eBCRN) reproduced the configurations of the hematopoietic progenitors and early B lymphoid precursors of the pathway, its simulation as a continuous model with fuzzy logics suggested a transient IL-7R⁺ ProB-to-Pre-B subset expressing pre-BCR and a series of dominant B-cell transcriptional factors. This conspicuous differentiating cell population up-regulated CXCR7 and reduced CXCR4 and FoxO1 expression levels. Strikingly, constant but intermediate NFκB signaling at specific B cell differentiation stages allowed stabilization of an aberrant CXCR7⁺ pre-B *like* phenotype with apparent affinity to proliferative signals, while under constitutive overactivation of NFκB, such cell phenotype was aberrantly exacerbated from the earliest stage of common lymphoid progenitors. Our mutant models revealed an abnormal delay in the BCR assembly upon NFκB activation, concomitant to sustained Flt3 signaling, down-regulation of Ebf1, Irf4 and Pax5 genes transcription, and reduced Ig recombination, pointing to a potential lineage commitment blockage.

Submitted 24 March 2020
Accepted 18 August 2020
Published 29 September 2020

Corresponding author
Rosana Pelayo,
rosana.pelayo.c@gmail.com,
rosana.pelayo@imss.gob.mx

Academic editor
Gwyn Gould

Additional Information and
Declarations can be found on
page 20

DOI 10.7717/peerj.9902

© Copyright
2020 Enciso et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

How to cite this article Enciso J, Mendoza L, Álvarez-Buylla ER, Pelayo R. 2020. Dynamical modeling predicts an inflammation-inducible CXCR7⁺ B cell precursor with potential implications in lymphoid blockage pathologies. *PeerJ* 8:e9902 <http://doi.org/10.7717/peerj.9902>

Capítulo de libro: Enciso, J., Balandrán J.C., Pelayo R. 2018. "The Pathobiological Complexity of Childhood Cancer: Acute Leukemias as a Paradigm of Study" in Cancer: a complex disease. 1st ed., eds. O. Miramontes and E.R. Alvarez-Buylla (Mexico, CDMX: CopIt-arXives), 43-57. ISBN: 978-1-938128-15-8 ebook.

Capítulo de libro: Balandrán J.C., Enciso J., Pelayo R. 2017. "El sistema hematopoyético como paradigma de la diferenciación celular" in Células Troncales: Biología y Aplicaciones en Biomedicina. 1st ed., eds. M.A. Chávez-González, J. Chimal-Monroy, E. Flores-Figueroa and M. Lamas (México, Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México), 209-238.