



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE MICROAMBIENTE
TUMORAL PARA REALIZAR ANÁLISIS PROTEÓMICOS DE UNA
LÍNEA CELULAR DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA.

P R E S E N T A:

DIANA BRENDA VIGUERAS RAMÍREZ

JURADO DE EXAMEN

DIRECTOR DE TESIS: DR. HÉCTOR QUEZADA PABLO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

ASESOR: DR. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ASESOR: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

SINODAL: Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLAN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

SINODAL: M. EN C. MARIA TERESA GRISELDA FUENTES LARA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Ciudad de México

Octubre de 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1) AGRADECIMIENTOS Y / O DEDICATORIAS

A Dios, por bendecir y alumbrar mi camino en todo momento, por darme fortaleza y permitirme llegar hasta este lugar.

A la UNAM, por formarme profesionalmente y como ser humano, por brindarme sus recursos y ser siempre una ventana hacia un mundo lleno de posibilidades. La FES ZARAGOZA me permitió un camino lleno de tantas hermosas experiencias e increíbles amigos; es un honor ser parte de esta universidad.

Al laboratorio de Inmunología y Proteómica del Hospital Infantil de México, por permitirme involucrarme en esta área y realizar mi proyecto de investigación.

A mi director de tesis, Héctor Quezada Pablo, a quien admiro y respeto. Siempre estaré agradecida por ayudarme a mejorar, por creer en mí, por su paciencia y constante motivación.

A mis padres, por darme la oportunidad de seguir estudiando y apoyarme en cada decisión, y, sobre todo, por su amor tan grande e incondicional. Sus consejos y palabras de aliento siempre han sido mi consuelo e inspiración. Los amo muchísimo, los admiro y me siento muy orgullosa y afortunada de ser su hija. No hubiera llegado hasta aquí sin ustedes.

A mis hermanos, cómplices en mis travesuras y compañeros de vida. Los amo, Daniel y Sari, soy bendecida de tenerlos.

A mi pareja, Giovanni, gracias por tu amor incondicional, por tu apoyo inquebrantable, tus cuidados y amistad. Es un placer compartir contigo mi vida. Cada día a tu lado es un regalo, y aprecio cada momento que hemos compartido y aquellos que aún tenemos por delante.

A mis tíos Porfirio y Luz por brindarme un espacio en su hogar cuando más lo necesite, por sus consejos, cobijo y cariño.

A mis primos Guadalupe, Pedro, Francisco y mi tía Francisca, por su cariño y siempre ser un apoyo incondicional en todos los aspectos.

A mis amigos con los que comencé este camino:

A mi querida amiga Dulce, por ser mi confidente en esas largas tardes que se convertían en noches de desvelo antes de un examen. Hiciste más ameno mi camino; tu sinceridad y tu cariño han dejado huellas profundas en mi corazón.

A Julio, por cuidarme y acompañarme con paciencia, motivación, cariño y por brindarme buenos recuerdos.

A Anayeli, qué buen día fue cuando nuestros caminos se cruzaron y descubrimos que compartíamos la pasión por la danza. Luego, creamos una bonita amistad. Eres una persona especial en mi vida, y me siento agradecida por tu confianza y comprensión.

A Vicky, por brindarme tu confianza y una genuina amistad. Agradezco tus gestos de amabilidad y tu disposición para estar ahí cuando te he necesitado.

A mis compañeros Laura y Abraham, a quienes deseo expresar mi más sincera gratitud por su invaluable amistad y apoyo durante la elaboración de este trabajo. Siempre han estado para enseñarme. Son increíbles; hicieron mi estancia inolvidable.

Este trabajo está dedicado en memoria de mis tíos: Carmen Ramírez y Eduardo Cerecedo, y mi abuelita Paty Rivas, quienes han partido, sin embargo, siempre los llevo en mi corazón.

2) ÍNDICE

1) AGRADECIMIENTOS Y / O DEDICATORIAS	2
2) ÍNDICE	4
3) RESUMEN	10
4) INTRODUCCIÓN	12
5) MARCO TEÓRICO	13
LEUCEMIA	13
CULTIVO CELULAR Y MICROAMBIENTE	20
VINCRISTINA.....	27
PROTEÓMICA.....	28
6) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
7) HIPÓTESIS	32
8) OBJETIVOS	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
9) MATERIAL Y MÉTODO	33
A) DISEÑO DEL ESTUDIO.....	33
B) UNIVERSO	33
C) VARIABLES	34
D) TÉCNICAS O INSTRUMENTOS.....	34
E) PROCEDIMIENTO	35
F) ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	49
10) RESULTADOS	50
GENERACIÓN DE COCULTIVO 3D.	50
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (IC50) DE VINCRISTINA A LAS 24 HORAS	52

ESCALAMIENTO DEL COCULTIVO 3D	61
ANÁLISIS PROTEÓMICOS.....	62
11) ANÁLISIS DE RESULTADOS	62
12) CONCLUSIÓN.....	80
13) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
14) ANEXOS	93
ANEXO I	93
ANEXO II	98
ANEXO III	99

ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribonucleico

Ara C Arabinósido de citosina o citarabina

CAR Células del estroma perivascular reticular abundante, por sus siglas en inglés *cells abundant reticular*.

CCRF-CEM ATCC® CCL-120™ Células de leucemia linfoblástica B humana

CD Grupos o antígenos de diferenciación, por sus siglas en inglés: *clusters of differentiation*.

CEM Células estromales mesenquimales

CMH Células madre hematopoyéticas

DTT DL-Dithiothreitol

ERO Especies reactivas de oxígeno

ESI Ionización por electrodispersión, por sus siglas en inglés, *electrospray ionization*

FAB Clasificación Francesa- Americana- Británica

FGF1 Factor de crecimiento de fibroblastos 1, por sus siglas en inglés *fibroblast growth factor 1*

GO Ontología de genes, por sus siglas en inglés *Gene ontology*

HPLC Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia, por sus siglas en inglés *high performance liquid chromatography*

IAM Iodoacetamida

IC50 Concentración inhibitoria media

Ig inmunoglobulina

INEGI Instituto Nacional de Estadística, Geografía

L₁, L₂ y L₃ Subtipos de criterios FAB

LCR líquido cefalorraquídeo

LLA Leucemia linfoblástica aguda

LLA-B Leucemia linfoblástica aguda de linaje B

LLC Leucemia linfoblástica crónica

LMA Leucemia mieloide aguda

LMC Leucemia mieloide crónica

m/z masa/carga

MO Médula ósea

NG2 Antígeno neuro-glial 2

nHPLC Nano cromatografía de líquidos de alta eficiencia, por sus siglas en inglés

nano high performance liquid chromatography

OP-9 ATCC® CRL-2749™ Células estromales mesenquimales de ratón.

SFB Suero Fetal Bovino

SNC Sistema nervioso central

TGF-β Factor de crecimiento transformante beta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Linajes de las células sanguíneas.....	13
Figura 2 Cultivos celulares en 2D.....	22
Figura 3. Técnicas comunes para la formación de esferoides.....	23
Figura 4 Descripción gráfica de los componentes de la médula ósea.....	27
Figura 5 Estructura química de fármaco vincristina.....	28
Figura 6 Análisis proteómicos tipo “shotgun”.....	31
Figura 7. Prueba de sensibilidad en monocultivo.....	39
Figura 8 Prueba de sensibilidad a vincristina en cocultivo 2D.....	39
Figura 9. Prueba de sensibilidad en cocultivo 3D.....	40
Figura 10 Descripción de secuencias para generar cocultivos 3D.....	51
Figura 11. Viabilidad celular en monocultivo.....	53
Figura 12. Gráfica del porcentaje de viabilidad de monocultivo transformada a logaritmo base 10 y regresión lineal.	54
Figura 13. Viabilidad celular en cocultivo 2D.....	56
Figura 14. Gráfica de porcentaje de viabilidad transformada a logaritmo base 10 y regresión lineal del cocultivo 2D	57
Figura 15. Viabilidad celular en cocultivo 3D.....	59
Figura 16 Gráfica porcentaje de viabilidad transformada a logaritmo base 10 y regresión lineal del cocultivo 3D.	60
Figura 17 Comparación del patrón de bandas en gel de poliacrilamida de los extractos de proteínas.....	63
Figura 18. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas con cada solución amortiguadora.....	65
Figura 19. Localización celular de las proteínas extraídas con B2 expresada en un diagrama circular.....	66
Figura 20. Localización celular de las proteínas extraídas con el B3 expresada en un diagrama circular.....	67
Figura 21. Comparación del proteoma entre las células CCRF-CEM obtenidas de monocultivo y cocultivo 3D.....	68

Figura 22. Gráfica de procesos celulares en función del factor de enriquecimiento (Fold Enrichment promedio).....	71
Figura 23. Porcentaje de procesos celulares presentes en monocultivo	72
Figura 24. Porcentajes de procesos celulares presentes en cocultivo 3D	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Anomalías citogenéticas comunes en LLA.....	19
Tabla 2. Composición de las diferentes soluciones amortiguadoras de lisis	42
Tabla 3. Gradiente de elución.....	48
Tabla 4 Viabilidad de células CCRF-CEM en monocultivo a diferentes concentraciones de vincristina.	52
Tabla 5 Concentración de vincristina contra el logaritmo del promedio de viabilidad.....	53
Tabla 6. Viabilidad de células CCRF-CEM en cocultivo 2D a diferentes concentraciones de vincristina.....	55
Tabla 7. Concentración de vincristina contra el logaritmo de la viabilidad de las células CCRF-CEM en cocultivo 2D.....	56
Tabla 8. Viabilidad de células CCRF-CEM en cocultivo 3D a diferentes concentraciones de vincristina.....	58
Tabla 9. Concentración de vincristina contra el logaritmo de la viabilidad de las células CCRF-CEM en cocultivo 3D.....	59
Tabla 10. Comparación de las IC50 obtenidas en los diferentes modelos de cultivo celular.	61
Tabla 11 Concentración de proteínas totales..	62
Tabla 12. Proteínas identificadas por nHPLC-MS/MS.	64
Tabla 13. Localización celular de las proteínas identificadas al lisar las células con B2 y B3.....	66
Tabla 14. Cantidad de proteínas identificadas en 3x10⁶ células de cada tipo celular provenientes de cocultivo 3D.....	68

3) RESUMEN

Introducción: En México el cáncer infantil es la primera causa de muerte por enfermedad en niños de 5 a 14 años y la sexta en menores de 5. La leucemia linfoblástica aguda es el cáncer más común en niños y adolescentes mexicanos; un 85 % de las leucemias linfoblásticas agudas son de estirpe B (LLA-B). Después de recibir el tratamiento, el 20 % de los pacientes presenta recaídas y la quimiorresistencia representa un serio problema, por lo que es de interés conocer el microambiente tumoral y su influencia sobre la tolerancia a los fármacos quimioterapéuticos, empleando estrategias globales como la proteómica. Es relevante mencionar que actualmente no hay reportes de análisis proteómicos de células de LLA-B en cocultivo 3D.

Objetivo: Establecer un modelo de microambiente tumoral que permita realizar análisis proteómicos basados en espectrometría de masas usando una línea celular de leucemia linfoblástica aguda en cocultivo 3D con una línea celular estromal mesenquimal de médula ósea.

Metodología: Se cultivaron las líneas celulares de células de leucemia linfoblástica T de humano (CCRF-CEM ATCC® CCL-119™) y células estromales mesenquimales de ratón (OP-9 ATCC® CRL-2749™) en monocultivo, cocultivo 2D y cocultivo 3D; y se determinó la sensibilidad a vincristina mediante el recuento manual empleando el colorante supra vital azul de tripán.

Se generaron 3×10^6 de células CCRF-CEM en monocultivo y cocultivo, se extrajeron las proteínas y se cuantificaron, redujeron, alquilaron y digirieron a péptidos. Los péptidos se inyectaron en un equipo de nano cromatografía de líquidos de alta eficiencia (nHPLC) Ultimate 3000 System con columna Acclaim PepMap™ 100 75 μm x 15 cm C18 marca Thermo acoplado a un espectrómetro de masas Impact II Q-TOF Bruker Daltonics. El análisis bioinformático se realizó con el software ProteinScape.

Resultados: Se logro establecer modelo de cultivo celular en monocultivo, cocultivo 2D y cocultivo 3D, por consiguiente, se determinó la concentración inhibitoria media

(IC50) para cada uno al fármaco vincristina cuyo valor fue de 6nM, 15nM y 55nM, respectivamente. Con respecto al tipo de cultivo modelo 2D tuvo un factor de protección de 2.5 veces, mientras que el cocultivo 3D de 8.5. En los análisis proteómicos de las células CCRF-CEM en monocultivo se identifican 1157 proteínas y 1108 en el cocultivo 3D.

Conclusiones: En el presente estudio se estableció el modelo experimental que reproduce la protección contra fármacos quimioterapéuticos mediada por el microambiente tumoral y con el cuál es posible realizar análisis proteómicos de una línea celular de leucemia linfoblástica aguda de linaje T, en monocultivo y cocultivo 3D.

Palabras Clave: leucemia linfoblástica aguda, cultivo celular, cocultivo 2D, cocultivo 3D, proteómica, espectrometría de masas.

4) INTRODUCCIÓN

En México, el cáncer infantil es la primera causa de muerte en niños de 5 a 14 años, y la sexta en menores de 5(1). Cabe mencionar que el 85 % de las leucemias linfoblásticas son de precursor de células B(2), cerca del 80 % de los pacientes que completan su esquema de tratamiento se mantienen libres de cáncer, mientras que el 20 % presenta recaídas, y en este grupo la quimiorresistencia compromete el éxito del tratamiento(3,4); es por lo que éste trabajo se enfoca en la leucemia linfoblástica aguda de linaje B (LLA-B), ésta enfermedad se caracteriza por presentar un cuadro clínico con palidez, fiebre, cansancio, debilidad, en algunas ocasiones hepatomegalia y esplenomegalia(5–7).

El cultivo celular es una técnica que permite reproducir células provenientes de un tejido de interés o líneas celulares (inmortalizadas)(8). Se ha podido realizar monocultivo, cocultivo 2D bidimensionales, cocultivo 3D esferoides(9,10) y tricultivo (tres líneas celulares)(11). Estos modelos han permitido estudiar la fisiología celular de células normales o tumorales, la acción de los fármacos, la producción de proteínas, entre otros(12). Se ha reportado su uso en múltiples investigaciones en el estudio de las leucemias para elucidar los principales mecanismos de quimiorresistencia y para conocer el impacto que tiene el microambiente celular en el desarrollo y progresión de la enfermedad(13–17).

Con el objetivo de obtener nuevos conocimientos sobre la enfermedad, revelar biomarcadores para diagnóstico, o posibles blancos terapéuticos, se puede emplear la proteómica (estudio a gran escala de las proteínas)(18), que proporciona una visión global de los cambios en la expresión de las proteínas bajo diferentes condiciones(19).

Actualmente existen diversos estudios proteómicos sobre el microambiente tumoral de la leucemia(20–22), sin embargo, no se ha reportado uno de leucemia linfoblástica aguda de tipo B en cocultivo 3D.

5) MARCO TEÓRICO

LEUCEMIA

DEFINICIÓN

La palabra leucemia (Leukämie) significa “sangre blanca”, término propuesto por el médico Rudolf Virchow en 1846(23,24).

La leucemia es un cáncer en el tejido sanguíneo y la médula ósea (MO). Se caracteriza por el crecimiento desmedido de glóbulos blancos inmaduros, los cuales son incapaces de combatir infecciones y deterioran la capacidad de la médula ósea para producir glóbulos rojos y plaquetas(24–26). Dada la diversidad de células, es necesaria clasificarla adecuadamente.

CLASIFICACIÓN

De manera general las leucemias se clasifican dependiendo de la estirpe celular afectada: linfoide o mieloide (Figura 1). También de acuerdo con la rapidez con la que evoluciona la enfermedad: se denomina aguda cuando lo hace rápidamente y crónica cuando el progreso de la enfermedad es de forma lenta(24,27).

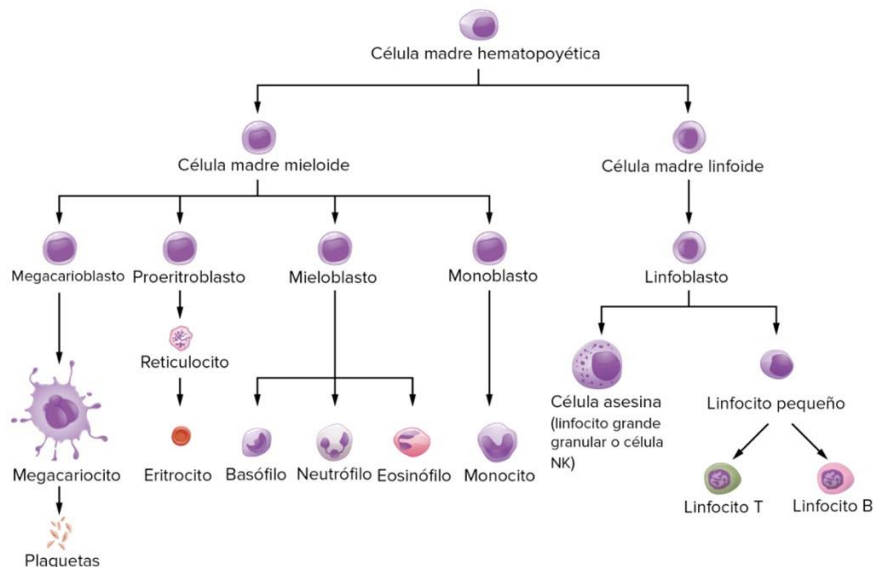


Figura 1 Linajes de las células sanguíneas. Las células sanguíneas derivan de la célula madre hematopoyética que se suelen encontrar en la médula ósea, tras la exposición a diferentes factores de crecimiento se promueve el desarrollo de las diferentes líneas celulares. Tomado de Tomas J., et al(88)

De acuerdo con lo anterior existen cuatro tipos principales de leucemia:

- Leucemia linfoblástica aguda (LLA)
- Leucemia mieloide aguda (LMA)
- Leucemia linfoblástica crónica (LLC)
- Leucemia mieloide crónica (LMC).

Es importante resaltar que los pacientes son afectados y tratados de forma diferente para cada tipo de leucemia(28). En este trabajo, nuestro enfoque se centrará en la leucemia linfoblástica aguda (LLA), que merece una atención particular debido a su impacto significativo en la población infantil. La LLA se clasifica como un grupo de neoplasias malignas de células linfoides en etapa precursora B/T. Estas neoplasias se originan a partir de alteraciones genéticas que interrumpen el proceso de diferenciación linfóide normal, impulsando, en su lugar, la proliferación y supervivencia celular de manera anómala(26).

EPIDEMIOLOGÍA

En México, el cáncer infantil es un problema de salud pública, debido a que es la primera causa de muerte por enfermedad en el grupo de edad de 5 a 14 años y la sexta en menores de 5 años(1). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más común en niños y adolescentes mexicanos. Madhusoodhan(2) menciona que la LLA tiene una incidencia mayor entre la población caucásica e hispana. El 85 %

de estas leucemias linfoblásticas son de precursor de células B, mientras que el 15 % deriva de células T(2).

Afortunadamente cerca del 80 % de los pacientes que completan su esquema de tratamiento, se mantienen libres de cáncer durante los siguientes 5 años, mientras que el 20 % presenta recaídas y en este grupo la quimiorresistencia compromete el éxito de los tratamientos(1,3,4,29). La resistencia de las células cancerosas a los tratamientos convencionales compromete aún más las tasas de supervivencia. En estos entornos, donde los recursos son limitados y las opciones terapéuticas pueden ser escasas, la resistencia a la quimioterapia se convierte en un obstáculo significativo para el logro de resultados exitosos en el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, comprender y abordar la quimiorresistencia de manera efectiva se vuelve esencial para mejorar las tasas de supervivencia.

PATOGENESIS DE LA LLA DE LINAJE B

El proceso de maduración de la célula madre hematopoyética pluripotente en la médula ósea (MO) hasta la célula B madura, está estrechamente controlado por la activación jerárquica de factores de transcripción y la selección a través de la transducción funcional de señales. Se ha encontrado que en LLA de linaje B (LLA-B) se tienen anomalías cromosómicas que bloquean la diferenciación linfoide e impulsan la proliferación y supervivencia celular aberrante, sin embargo, estas lesiones por sí solas son insuficientes para inducir leucemia y se requiere de lesiones cooperantes. Muchos de los genes implicados codifican proteínas clave en el desarrollo linfoide por lo que se sugiere que el evento inicial confiere autorrenovación y mutación, lo que detiene el desarrollo. Eventos cooperativos secundarios en la desregulación del ciclo celular, la supresión de tumores y la modificación de la cromatina, eventualmente conducen al establecimiento del clon leucémico(26,30).

FACTORES DE RIESGO DE LA LLA-B

- **GENÉTICOS**

Los factores genéticos tienen un papel importante en la etiología de las leucemias agudas, ya que existe una estrecha asociación de la LLA y algunas traslocaciones cromosómicas, la frecuencia de presentar la enfermedad es mayor en familiares de pacientes con leucemia y ciertas enfermedades genéticas donde los niños nacen con un sistema inmunológico anormal o deficiente por lo que también tienen mayor tendencia a contraer leucemia, tales como: el síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Down (aproximadamente dos tercios de los casos de leucemia aguda en niños con síndrome de Down son LLA), el síndrome de Klinefelter, síndrome de Wiscott-Aldrich y la anemia de Fanconi(6,31).

- **AMBIENTALES**

La radiación y exposición a productos químicos como el benceno, la exposición prenatal a los rayos X, la exposición postnatal a altas dosis de radiación, los pacientes tratados con radioterapia y quimioterapia por otros tipos de cáncer tienen un ligero riesgo de contraer un segundo cáncer, generalmente leucemia mieloide aguda. Los pacientes que reciben tratamiento intensivo para suprimir su función inmunológica, por ejemplo, pacientes con trasplantes de órganos, tienen mayor riesgo de contraer cáncer, especialmente del sistema linfóide y esto incluye la LLA(6,31).

- **INFECCIOSOS**

Se ha dado importancia al papel de los virus en la etiología de la leucemia debido a que la mayoría de las LLA se presentan cuando el sistema inmune está en desarrollo y podría ser susceptible a los efectos oncogénicos de determinados agentes virales(6), la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la expresión anormal de genes hematopoyéticos y de proliferación, los cuales persisten incluso después de la eliminación viral(32). Por ejemplo, se ha encontrado una clara asociación entre la infección por virus de Epstein-Barr en la LLA subtipo L₃, Clasificación Francesa- Americana- Británica "FAB" subtipos L₁, L₂ y L₃(6), y pacientes con antecedentes por parvovirus B19 quienes muestran una metilación anormal del ADN(32).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA LLA

Los síntomas más frecuentes para su diagnóstico son los relacionados con la insuficiencia medular: anemia (palidez, astenia), trombopenia (equimosis, petequias) y neutropenia (fiebre) por lo que el paciente puede presentar infecciones recurrentes. Son frecuentes la linfadenopatía, hepatoesplenomegalia. A veces por infiltración de la médula ósea los pacientes presentan dolores en huesos largos y artralgias. De manera menos común el compromiso meníngeo puede provocar cefalea, defectos craneales. También puede ocurrir infiltración cutánea e hinchazón de encías(6,7,30).

DIAGNÓSTICO Y SUBCLASIFICACIÓN DE LA LLA

La evaluación inicial consiste en realizar una biometría hemática completa con revisión del frotis, química sanguínea que evalúe urea, creatinina y ácido úrico. Electrolitos séricos completos incluyendo el calcio, pruebas de función hepática, análisis de coagulación, deshidrogenasa láctica, amilasa sérica y fosfatasa alcalina(33).

Los estudios de gabinete empleados son: radiografía de tórax, ecocardiograma, ultrasonografía, tomografía(33).

La toma de muestra de médula ósea se realiza de acuerdo con la edad, en menores de 18 meses en la superficie anteromedial de la tibia, mientras que en niños mayores se toma de la cresta iliaca posterior(34–36). Se toman 3 muestras, de diferentes volúmenes (de 0.2 a 0.3 mL)(33,36) Una muestra se utiliza para observar la morfología de los elementos de la médula ósea empleando la tinción de Wright-Giemsa, las tinciones de mieloperoxidasa y esterasas no específicas ayudan a la definición histoquímica del linaje celular y se hace la clasificación morfológica de acuerdo con los criterios FAB. La segunda muestra se emplea para analizar el reconocimiento por anticuerpos monoclonales; la LLA carece de hallazgos morfológicos y citoquímicos es importante llevar a cabo el inmunofenotipo empleando anticuerpos que reconocen los grupos o antígenos de diferenciación (*CD clusters of differentiation*, por sus siglas en inglés). La tercera muestra se usa para hacer el estudio citogenético y molecular, en la mayoría de los casos se

encuentran alteraciones cromosómicas debido a que las células malignas de LLA provienen de una célula madre linfopoyética que ha sufrido daño genético el cual le produce transformación maligna y proliferación descontrolada(27,33).

- **CRITERIOS FAB**

De acuerdo con los criterios FAB(37), las leucemias linfoblásticas agudas se clasifican en:

A) Subtipo FAB L1: los linfoblastos son pequeños y las características nucleares y citoplasmáticas parecen uniformes con escaso citoplasma azul, forma nuclear regular, cromatina parcialmente condensada con nucleolos apenas visibles y alta relación nucleocitoplasmática.

B) Subtipo FAB L2: los linfoblastos son de tamaño variable con contornos nucleares irregulares, cromatina de encaje heterogénea, citoplasma débilmente basófilo moderadamente abundante y relación nucleocitoplasmática variable.

C) Subtipo FAB L3 (Burkitt): los linfoblastos son muy grandes y bastante homogéneos con cromatina nuclear punteada finamente granular con nucleolos prominentes. El citoplasma es azul medianoche y está vacuolado. Actualmente se reconoce que la mayoría de estos casos representan linfoma no Hodgkin en lugar de LLA.

- **INMUNOFENOTIPO DE LLA**

En el linaje B, los marcadores más importantes para el diagnóstico diferencial y la subclasificación son: CD19, CD20, CD22, CD24 y CD79a. Los primeros para identificar al linaje B son CD19, CD22 y CD79a. Una reacción positiva para cualquiera de estos tres identifica la LLA pro-B. La presencia del antígeno CD10 define el subgrupo LLA "común". Los casos con identificación adicional de la inmunoglobulina (Ig) citoplasmática mu (μ) constituyen el grupo pre-B, mientras que la presencia de cadenas ligeras de inmunoglobulina de superficie define LLA-B maduro(6,37).

- **CITOGENÉTICA**

A partir de las técnicas de biología molecular se ha podido identificar las anomalías citogenéticas de las células leucémicas. Las más frecuentes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Anomalías citogenéticas comunes en LLA. Modificada de Lassaletta(6).

Traslocación	Frecuencia	Genes afectados	Características
*t(1:19) (q23;p13)	5-6%	<i>E2A-PBX1</i>	Fenotipo pre-B hiperleucocitosis.
t(9:22) (q34;p11)	3-5%	<i>BCR-ABL</i>	Cromosoma Filadelfia.
t(4:11) (q21;p23)	2%	<i>MLL-AF4</i>	Estirpe B asociada a LLA lactante. Hiperleucocitosis y es de pronóstico pobre.
t(12:21) (p13;q22)	25% de las LLA pre B	<i>TEL-AML</i>	Fenotipo B, buen pronóstico.

*Traslocación (t): En el primer paréntesis se indican los cromosomas y el segundo las regiones.

TRATAMIENTO DE LA LLA

El tratamiento se divide en tres fases que tienen objetivos distintos(33):

- 1) Inducción a la remisión:** es la fase inicial del tratamiento que tiene como objetivo reducir de 100 a 1000 veces (2 a 3 log) la carga leucémica, eliminando en lo posible las células con resistencia primaria. La remisión se ve reflejada en la desaparición clínica de enfermedad detectable, en la recuperación hematológica, en la disminución de los blastos en MO a menos de 5 %, ausencia de blastos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y nivel de enfermedad mínima residual detectable por PCR o citometría de flujo(33); en el caso de la LLA-B la sensibilidad de la detección dependerá del tratamiento usado, el momento en que se toma la muestra, debido a la proporción variable de células B normales, por consiguiente la sensibilidad es de una

célula en diez mil(38). Lo anterior puede ser logrado en 98 % de los casos empleando una combinación de 4 a 6 fármacos como la vincristina, corticosteroides (prednisona, prednisolona o dexametasona), asparaginasa y en aquellos pacientes cuya leucemia es de alto riesgo se agrega una antraciclina (doxorubicina o daunorrubicina) en un programa intensivo durante las primeras 4-6 semanas e incluye el uso de quimioterapia intratecal(33,39).

- 2) **Consolidación:** esta fase sigue a la inducción y uno de sus principales objetivos es intensificar de manera temprana el tratamiento a sitios santuarios (principalmente sistema nervioso central y testículo), empleando altas dosis de antimetabolitos con intervalos de 1 a 2 semanas por 3 a 4 dosis. Normalmente se utilizan los fármacos etopósido y arabinósido de citosina (Ara C)(33).
- 3) **Mantenimiento:** el objetivo de esta fase es eliminar la enfermedad residual que persiste al final de la inducción y erradicar la clona leucémica. Esta fase debe contemplar el uso de tratamiento presintomático al sistema nervioso central (SNC). Normalmente se utilizan los fármacos metotrexato y ácido folínico(33).

CULTIVO CELULAR Y MICROAMBIENTE

CULTIVO CELULAR

El cultivo celular es una técnica que consiste en obtener células ya sea de plantas o animales para hacerlas crecer en un ambiente artificial favorable. Se obtienen removiéndolas directamente de un tejido, también pueden provenir de una línea celular preestablecida(8).

Se inicia con un cultivo celular primario, que son las células que migraron de un tejido o que se dispersaron mecánica o enzimáticamente que pudieron sobrevivir y que cambian constantemente para poder adaptarse por lo que no son poblaciones homogéneas(40). Al realizar subcultivos de éste, las células suelen dividirse un número limitado de veces ya que pierden su habilidad de proliferar, a causa del proceso llamado senescencia, sin embargo, de una línea celular finita puede surgir una línea celular inmortal debido a que se han presentado variaciones genéticas como la sobreexpresión del gen de la telomerasa y la eliminación o mutación del gen p53, implicado en detener el ciclo celular cuando el ADN se encuentra dañado, esto da lugar a una transformación espontánea o puede ser inducida química o viralmente(8,40).

Para favorecer el crecimiento de las células en cultivo se deben mantener condiciones controladas que varían dependiendo del tipo celular, el entorno artificial en el que se cultivan las células consiste en un recipiente adecuado que sea provisto con:

- Un sustrato o medio que suministre los nutrientes esenciales (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales)
- Factores de crecimiento
- Hormonas
- Gases (oxígeno O₂, dióxido de carbono CO₂)
- Un entorno fisicoquímico regulado (pH, presión osmótica, temperatura)(8).

Los cultivos celulares permiten comprender la biología celular, la morfología de los tejidos, los mecanismos de las enfermedades, la acción de los medicamentos, la producción de proteínas y el desarrollo de la ingeniería de tejidos(12). Cabe mencionar que, dependiendo de la naturaleza celular, se realiza en condiciones adherentes en las que las células están unidas a un sustrato o están flotando en el medio denominado cultivo en suspensión(12).

En la mayoría de los experimentos de cultivo celular se utilizan células en mono capa bidimensional (2D)(9). Estos modelos celulares *in vitro* son fáciles de manipular permitiendo el control de las condiciones en las que crecen por lo que son altamente reproducibles, es por estas cualidades que, se emplean para el estudio de la biología celular por los grupos de investigación, así como en la industria farmacéutica ya que favorece el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos(41,42). En este modelo las células crecen en una superficie plana, reciben de forma homogénea los nutrientes, factores de crecimiento y O₂. La mayoría se encuentran proliferando debido a la facilidad de retirar los restos celulares y las células en estado necrótico(9). En la Figura 2 se ilustran el monocultivo en monocapa cultivo en suspensión y el cocultivo 2D (43).

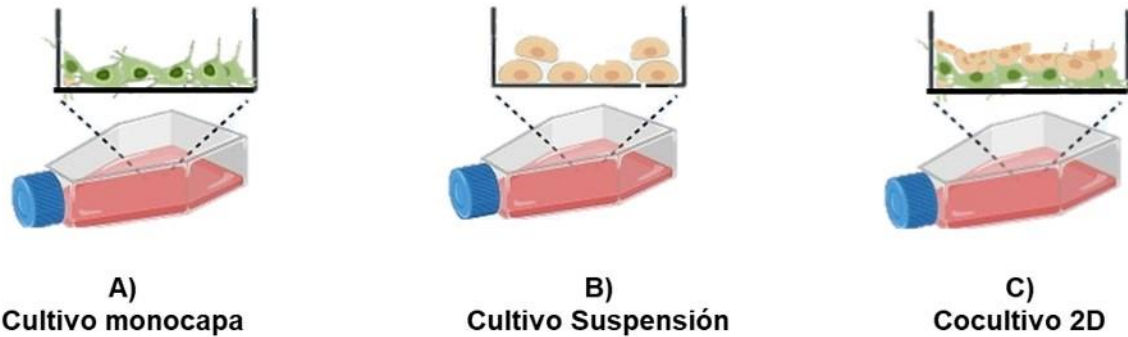


Figura 2 Cultivos celulares en 2D. A) Monocultivos en monocapa de células adherentes. B) monocultivos de células en suspensión, las células no se adhieren al sustrato ni entre ellas. C) Cocultivo 2D, dos tipos celulares crecen sobre una superficie plana. Figura modificada de Cucchi, et al.(43).

No obstante, estos tipos de cultivo celular tienen limitaciones para simular adecuadamente las condiciones de las células *in vivo* debido a que en su estado natural las células y la matriz extracelular (ME) se disponen en forma tridimensional (3D)(41,44–46). Se han desarrollado cultivos de células en tres dimensiones (3D) o también denominados esferoides que, se forman de manera espontánea cuando en el entorno predominan las interacciones célula-célula sobre las interacciones célula-sustrato las células cultivadas en forma de esferoides muestran diferencias en las comunicaciones célula-célula(32), en las interacciones ME-célula, así como en algunos procesos fisiológicos y bioquímicos relacionados con la tolerancia a fármacos cuando se comparan con células cultivadas en cultivos 2D(41,44–46).

Existen varios métodos para la generación de esferoides. En la Figura 3 se describen los más comunes (47).

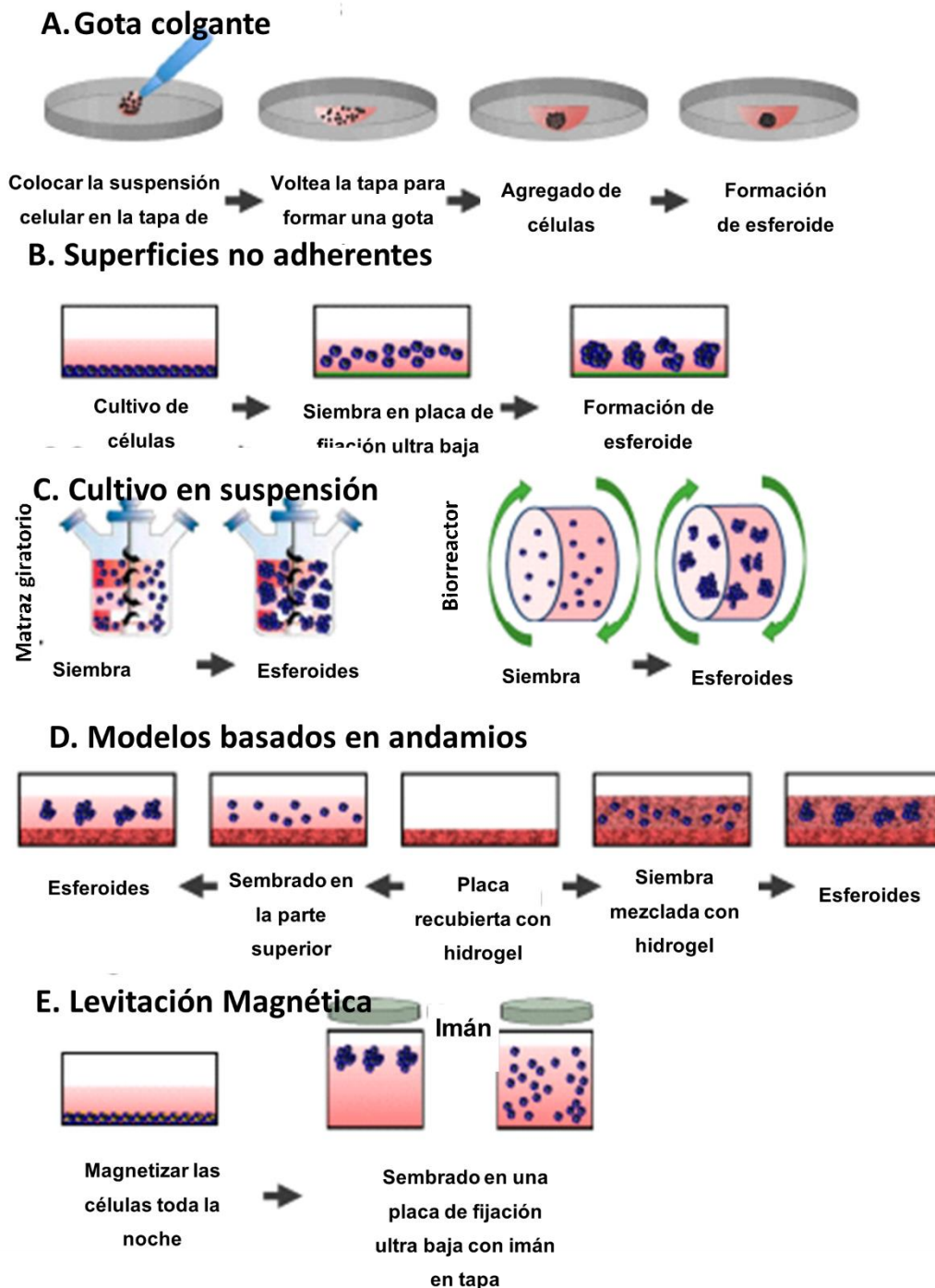


Figura 3. Técnicas comunes para la formación de esferoides. (A) Gota colgante. Emplean gotas de una suspensión celular que cuelgan en la parte inferior de la tapa de una placa de cultivo debido a la tensión superficial y a la gravedad que induce la agregación de células en un esferoide. **(B) Superficies no adherentes.** Siembra en placas de pozos de fondo cóncavo con superficies no adherentes, favoreciendo la unión entre células. **(C) Cultivo en suspensión.** Las células crecen suspendidas en medios, los esferoides se

forman debido al constante movimiento giratorio que impide que se asienten (48,49). **(D) Matrices sintéticas o andamios artificiales:** Se generan dispersando células en una matriz líquida seguida de solidificación o polimerización. Las matrices derivadas biológicamente contienen extracto de membrana basal y ácido hialurónico, mientras que los andamios sintéticos emplean polietilenglicol y alcohol polivinílico (9). **(E) Levitación magnética.** Se usan hidrogeles que contienen nanopartículas de oro y óxido de hierro, las células se magnetizan en cultivo y se atraen por un imán ubicado en la tapa del frasco de cultivo (47). Figura tomada de Hoarau-Véchet, et al (47).

Dependiendo el objetivo experimental y el tiempo que se requiera mantener el cultivo, se puede escoger el modelo que favorezca la investigación. Para este proyecto se empleó convenientemente el sistema de superficie no adherentes para recrear un microambiente tumoral de leucemia.

MICROAMBIENTE

Las células leucémicas interactúan con células de la médula ósea intercambiando señales a través de proteínas solubles donde participan las citocinas y quimiocinas, contactos célula-célula o canales citoplásmicos llamados nanotubos(50–52). En estas interacciones también intervienen parámetros fisicoquímicos el pH o la concentración de O₂, el resultado es que tanto las células tumorales como las de la MO presentan alteraciones que a menudo favorecen la supervivencia y proliferación de las células malignas(50,51). Stephen Paget desarrolló la hipótesis de la semilla (células tumorales) y el suelo (microambiente), basándose en investigaciones donde se demuestra el desarrollo de células tumorales en diferentes microambientes(53). En un estado saludable, el microambiente de la MO favorece el mantenimiento y desarrollo de las células madre hematopoyéticas (CMH), sin embargo, cuando las células son disfuncionales, los nichos de la MO pueden contribuir a la progresión de la leucemia. Por lo que caracterizar las células y los mecanismos que las regulan en un estado saludable es imprescindible para comprender las enfermedades que surgen en este entorno(54).

- **MEDULA ÓSEA**

Es un tejido graso y suave localizado en las cavidades dentro del hueso, el cual, en conjunto con el estroma, dan sostén física y fisiológicamente al tejido hematopoyético. Existen dos tipos de MO; la medula roja que es activa

hematopoyéticamente durante los primeros años de vida y se localiza en todo el organismo, aun que, conforme avanza el crecimiento de los huesos largos y grandes, su médula va siendo reemplazada por un tejido medular denominado médula amarilla o grasa reduciendo así su actividad hematopoyética(55).

En la MO se encuentran diferentes tipos celulares, las células no hematopoyéticas pertenecen a diferentes linajes celulares, incluidos osteoblastos, osteoclastos, adipocitos, células reticulares, células endoteliales, células de músculo liso, células estromales mesenquimales (CEM) y células del sistema nervioso simpático. Estas células no solo rodean físicamente a las células hematopoyéticas, también regulan activamente los procesos hematopoyéticos mediante la secreción de citocinas, hormonas, factores de crecimiento, la expresión de receptores y moléculas de adhesión(56,57). Aunque son una población poco común, las CEM son elementos clave de la MO. Son células similares a fibroblastos con la capacidad multipotente de diferenciarse, bajo estímulos apropiados, en células de los tres linajes mesodérmicos: osteocitos, adipocitos y condrocitos. Las CEM incluyen diferentes subconjuntos de células caracterizados por diferente localización, expresión de antígenos específicos y secreción de diferentes moléculas(57).

Las CMH pueden diferenciarse, autorrenovarse o permanecer en reposo dependiendo del ambiente circundante, los microambientes especializados en la MO llamados nichos; están formados por componentes celulares, bioquímicos y físicos(58).

A continuación, se describe el nicho endosteal, el cual se encuentra en la superficie interna del hueso y contiene una fina capa celular de osteoblastos y osteoclastos. Es un sitio hematopoyético importante, donde los osteoblastos secretan la quimiocina CXCL12 que es crucial para la diferenciación linfoide y es responsable del mantenimiento temprano de las CMH. Por lo tanto, los osteoblastos regulan la proliferación de las CMH y la diferenciación eritroide mediante la producción de osteopontina y eritropoyetina. No obstante, se ha demostrado que menos del 20 % de las CMH están en contacto directo con el endostio, por lo que el nicho de las

CMH es principalmente perivascular, notablemente alrededor de las arteriolas y sinusoides(56,58).

El nicho arteriolar hace referencia a las arteriolas, que están cerca del endostio. Se constituye por diferentes células estromales, células endoteliales, nervios del sistema nervioso simpático y células de Schwann no mielinizantes. Las células estromales particularmente importantes son células del estroma perivascular reticular abundante (CAR), por sus siglas en inglés *cells abundant reticular*, que expresan el receptor CXCL12, son importantes reguladores para mantener y diferenciar a las CMH, las células de Schwann junto con los nervios simpáticos en la arteriola inducen quiescencia de las CMH a través de la activación del factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$)(58), mientras que las células periarteriolas positivas al antígeno neuro-glial 2 (NG2) promueven su quiescencia y mantenimiento en la MO(57). Las células endoteliales de los vasos sanguíneos arteriales, debido a la poca permeabilidad vascular, mantienen las CMH a bajos niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO). Por lo tanto, este nicho promueve la inactividad de las CMH y las protege contra agresiones genotóxicas(57).

En el nicho sinusoidal, los vasos sinusoidales son más permeables que los arteriolas y en cambio promueven la activación de las CMH. Los niveles más altos de ERO en las CMH provocan la activación del ciclo celular y aumentan las capacidades de migración y diferenciación. El nicho sinusoidal es, por tanto, el lugar del tráfico de leucocitos dentro y fuera del MO y un medio proliferativo(57,58). Mientras que los megacariocitos regulan la inactividad de las CMH, a través del ligando CXCL4, el $TGF-\beta$ y la expansión bajo estrés mediante el factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1)(58). Se cree que existe un intercambio continuo entre el nicho arteriolar y sinusoidal, que el conjunto de CMH está en el equilibrio entre la proliferación, el tráfico y la inactividad(57). También se debe considerar que la tensión de O_2 no es uniforme en toda la MO, y es fundamental para la inactividad de las CMH como se ilustra en la Figura 4.

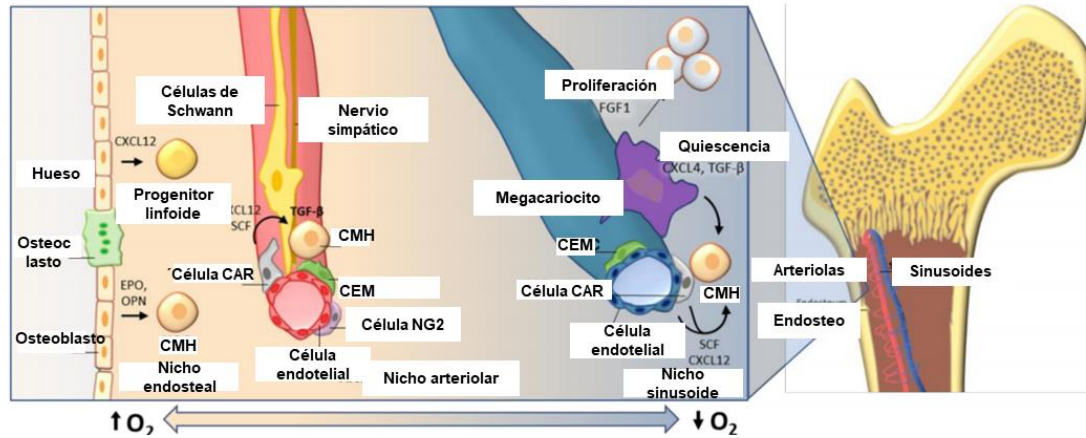


Figura 4 Descripción gráfica de los componentes de la médula ósea y las interacciones celulares que tienen lugar en los nichos endosteal, arteriolar y sinusoidal. Figura modificada de Congrais, et al.(58).

Además del componente celular, la MO tiene matriz extracelular (ME) que está compuesta por más de 200 proteínas, incluidos colágenos, proteoglicanos, laminina, fibronectina, elastina y otros factores de crecimiento, citocinas y enzimas remodeladoras; los cuales se sintetizan, modifican y secretan por los componentes celulares que las sustentan. Estos componentes están interconectados y de forma dinámica se va regulando su disponibilidad(58).

VINCRISTINA

Es un alcaloide antitumoral que se extrae de la planta *Catharanthus rose*, conocida como vinca. Se utiliza principalmente como sal de sulfato, ejerce sus efectos citotóxicos interfiriendo con los microtúbulos que forman el huso mitótico durante la metafase. Por lo que interrumpe el ciclo celular y conduce la muerte celular.

Este alcaloide se une a la subunidad β -tubulina, de los heterodímeros α/β -tubulina en la fase S del ciclo celular. Como consecuencia, la tubulina no puede polimerizarse para formar los microtúbulos que intervienen en varias funciones celulares, como la formación del huso mitótico, el desplazamiento de neurotransmisores, a través de los axones, compite para el transporte de aminoácidos dentro de las células, catalizan el movimiento de orgánulos, vesículas de transporte, inhibición de la síntesis de purinas, inhibición de las síntesis de DNA,

RNA y proteínas, inhibición de la glucólisis, y destrucción de la integridad de la membrana. (59–61)

Sin embargo, es un fármaco altamente tóxico. con un índice terapéutico muy bajo, es decir, las dosis terapéuticas son susceptibles de producir síntomas de toxicidad, La neurotoxicidad inducida por este alcaloide de manifiesta por un deterioro sensorial y parestesias, progresando hasta dolor neuropático y deterioro de la función motora, de los pares craneales y nervios vegetativos(59,62,63).Su estructura química se muestra en la figura 5, tomada de Pub Chem.

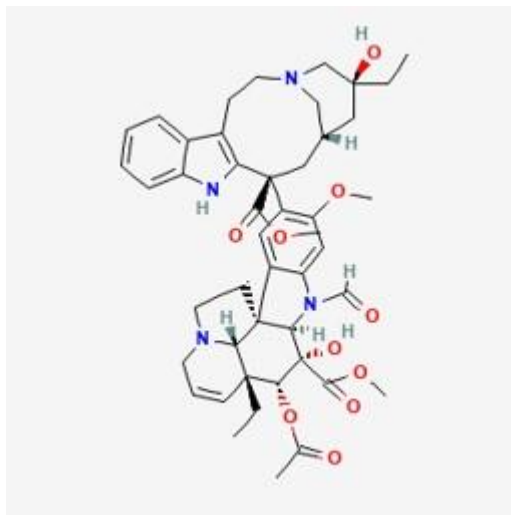


Figura 5 Estructura química de fármaco vincristina. Tomada de Pub Chem.

PROTEÓMICA

En 1994 Marc Wilkins empleó el termino proteoma para definir todas las proteínas que son expresadas por un genoma en una célula o tejido. El proteoma de los organismos pluricelulares es dinámico porque sus componentes, se expresan de manera diferencial dependiendo de la estirpe celular o tejido y pueden cambiar en respuesta al ambiente en especial a situaciones de estrés, interacción con fármacos, temperatura, requerimientos energéticos, en un estado fisiológico normal y patológico. Por lo que el interés de la proteómica se centra en el conocimiento del conjunto de proteínas para constituir la red de interacciones que caracteriza el funcionamiento de un sistema biológico, es decir, es el estudio del proteoma(64,65).

Las características que otorgan a las proteínas su papel fundamental como moléculas efectoras de la función celular (diversidad química y estructural y abundancia relativa) también dificultan su análisis experimental. No hay un diagrama de flujo único para el análisis proteómico de una muestra, ya que las variables en particular su complejidad, método de separación, concentración y estabilidad de las proteínas, además de la plataforma tecnológica disponible para su análisis, determinan el tipo de pregunta biológica que se puede abordar(65,66).

Una de las diferencias fundamentales entre la proteómica y el estudio clásico de las proteínas es su carácter global, ya que no se centra en el estudio de determinadas proteínas, sino que consiste en un estudio de aproximación al funcionamiento del conjunto de estas(67). La posibilidad de identificarlas a gran escala surge debido a la modernización de la espectrometría de masas.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite la separación, identificación y cuantificación de moléculas basada en su relación masa/carga (m/z). Esta tecnología requiere de un espectrómetro de masas y de software especializado de análisis de datos, algunas aplicaciones también usan un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés *high performance liquid chromatography*)(68,69).

Un espectrómetro de masas consta de 3 componentes fundamentales: **La fuente de ionización** que convierte a las moléculas en iones desolvatados usando por ejemplo el método de electrodispersión (ESI del inglés, *electrospray ionization*), el cual es un método suave que mantiene relativamente la integridad de la muestra. Los iones se dirigen hacia el **Analizador de masas** donde son separados de acuerdo con su relación masa-carga (m/z) en el vacío y es en el **Detector** donde se registra y amplifica la señal proveniente del analizador de masas, esta información se envía al procesador de datos en donde se registra en forma de espectro de masas (representación gráfica de los iones separados por su valor m/z y la intensidad de cada señal). De la combinación de estos tres elementos depende la

sensibilidad, exactitud y confianza en la identificación de las proteínas de una mezcla(69,70).

Con el desarrollo de tecnologías de fuentes de ionización suaves (ESI y MALDI) que generan iones a partir de analitos no volátiles, la espectrometría de masas se pudo aplicar al análisis de proteínas, lo que posibilita el obtener información estructural de estas tal como la secuencia de aminoácidos y modificaciones postraduccionales (68).

Para definir la identidad o secuencia de una proteína a partir de su espectro de masa se utiliza la información contenida en bases de datos. La identificación exitosa depende de la calidad de los datos generados en el espectrómetro de masas, los datos contenidos en la base de datos y del método empleado en la búsqueda de datos(70).

El análisis por espectrometría de masas es crítico en los experimentos proteómicos, sin embargo, los resultados obtenidos también dependen de la muestra, independientemente del enfoque de análisis utilizado, es fundamental obtenerla y mantenerla con calidad, los actuales enfoques experimentales requieren mucho tiempo e incurrir en pérdida masiva de material biológico(70).

- **SHOTGUN PROTEOMICS**

La proteómica “*shotgun*” es un método que permite identificar, caracterizar y cuantificar proteínas a gran escala. Consiste en que las mezclas complejas de proteínas, como suero o lisados celulares, primero se digieren con una proteasa (por ejemplo, tripsina) y los péptidos resultantes se separan mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), seguido de un análisis con espectrometría de masas en tándem para identificar la secuencia de residuos de aminoácidos de cada péptido. La palabra tándem se utiliza para describir que hay dos eventos sucesivos de medición de la relación m/z (a menudo se abrevia como MS/MS o MS²). En el primero, se determina el valor de m/z de los péptidos y en el segundo se analizan los fragmentos que resultan de romper un péptido específico al hacerlo colisionar con un gas inerte, generalmente N₂ o He. Las secuencias de residuos de

aminoácidos se deducen de los valores m/z de los péptidos precursores y de sus fragmentos. Finalmente, esas secuencias se comparan con bases de datos para identificar las proteínas como se muestra en la Figura 6(71).

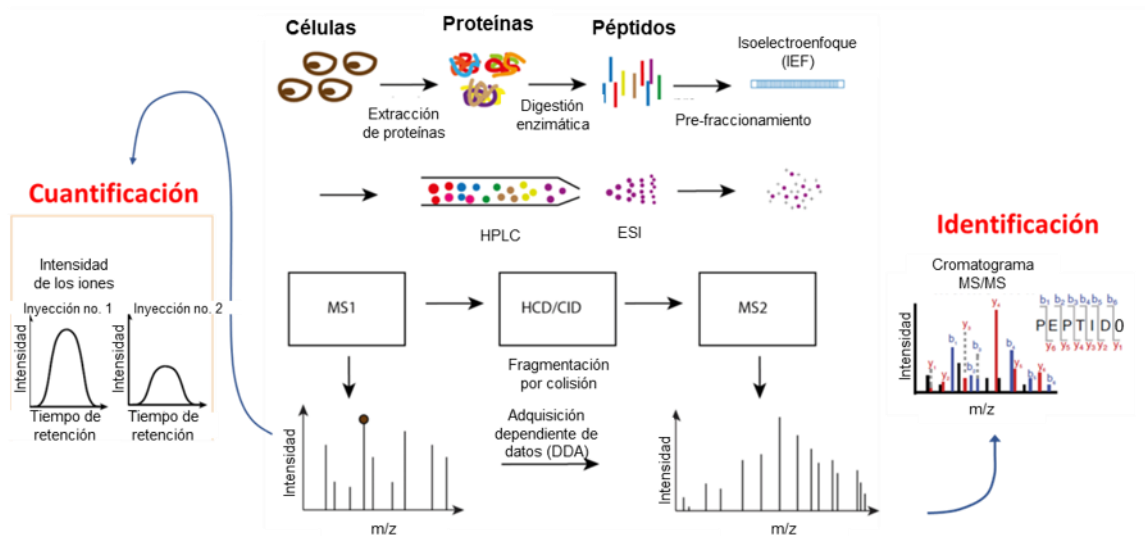


Figura 6 Análisis proteómico tipo “shotgun”. Las proteínas de una mezcla compleja se digieren con tripsina y los péptidos resultantes se separan primero en fracciones y posteriormente en un cromatógrafo de alto rendimiento (HPLC) acoplado a un espectrómetro de masas. Los analitos que eluyen del cromatógrafo se ionizan y desolvatan en la fuente de ionización (ESI) para que se registre su relación masa/carga (MS¹) y luego se fragmenten haciéndolos chocar con nitrógeno (CID) para registrar la masa de los fragmentos resultantes (MS²). La información registrada se usa para reconstruir la secuencia de residuos de aminoácidos y compararla con bases de datos para identificar las proteínas con el uso de software especializado el cual también permite hacer la cuantificación relativa. Figura tomada de Zhu, et al.(89).

6) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la población pediátrica mexicana, el cáncer se ha convertido en un problema de salud pública, destacándose como la primera causa de muerte en el grupo de edad de 5 a 14 años, y el sexto lugar en menores de 5 años. La leucemia linfoblástica aguda es el tipo de cáncer más prevalente, particularmente el de la estirpe de linfocitos B, abarcando el 85 % de los casos diagnosticados. Si se tiene acceso a los tratamientos adecuados, aproximadamente el 80 % de los niños se mantienen libres de cáncer durante los siguientes cinco años. Sin embargo, el 20 % restante presenta recaídas en las que a menudo se observan células tumorales resistentes a la quimioterapia. La intensa y compleja interacción entre las células del estroma de la médula ósea con las células leucémicas contribuye a ésta quimiorresistencia.

Existen modelos del microambiente tumoral leucémico *in vitro* basados en cocultivo 3D; sin embargo, no existen reportes de análisis proteómicos en esos modelos para la leucemia linfoblástica aguda. Además, uno de los principales retos para realizar análisis proteómicos de cocultivo 3D, es el escalamiento para producir suficiente material de estudio, por lo que es necesario establecer un método de cultivo reproducible y fácilmente escalable.

7) HIPÓTESIS

El establecimiento de un cocultivo 3D reproducible y escalable de células leucémicas y células estromales mesenquimales de MO, permitirá realizar análisis proteómicos que contribuyan a elucidar algunos de los procesos celulares involucrados en la quimiorresistencia mediada por el microambiente tumoral en comparación con el monocultivo.

8) OBJETIVOS

Establecer un modelo de microambiente tumoral que permita realizar análisis proteómicos basados en espectrometría de masas usando una línea celular de leucemia linfoblástica aguda en cocultivo 3D con una línea celular estromal mesenquimal de médula ósea.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar cocultivos 3D que simulen el microambiente de la médula ósea usando la línea celular de LLA de linaje T de humano CCRF-CEM ATCC® CCL-119™ y la línea celular OP-9 ATCC® CRL-2749™ de células estromales mesenquimales de ratón.
- Comparar la sensibilidad a vincristina de las células CCRF-CEM en monocultivo, cocultivo 2D y cocultivo 3D.
- Escalar el cocultivo 3D hasta obtener 3×10^6 células CCRF-CEM y OP-9.
- Analizar el proteoma de ambas líneas celulares en cocultivo 3D.

9) MATERIAL Y MÉTODO

A) DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio tiene una finalidad analítica, secuencia temporal transversal y con un control de asignación experimental.

B) UNIVERSO

Para la realización de los experimentos se emplearon cultivos provenientes de la línea celular CCRF-CEM de leucemia linfoblástica aguda estirpe T establecida a partir de sangre periférica de una paciente femenina caucásica de 4 años. Así como de línea celular OP-9 correspondiente a células estromales mesenquimales de médula ósea de tipo adherente obtenidas de ratón. Ambas líneas fueron obtenidas comercialmente

C) VARIABLES

- **INDEPENDIENTES:**

- Generación de monocultivo y cocultivo 2D
- Establecimiento de un modelo de microambiente tumoral (cocultivo 3D).
- Concentraciones de fármaco quimioterapéutico vincristina para prueba de sensibilidad.
- Escalamiento del cocultivo 3D.
- Método de extracción y cuantificación de proteínas totales.

- **DEPENDIENTES:**

- Viabilidad celular a diferentes concentraciones del fármaco quimioterapéutico vincristina.
- Identificación de proteínas mediante análisis proteómicos.

D) TÉCNICAS O INSTRUMENTOS

Actividad	Técnica o instrumento
Cultivo celular y generación de biomasa	Se usaron botellas Corning® Flask T-25 para la técnica de cultivo celular y generación del monocultivo. Para los cocultivos 2D y 3D se usaron microplacas de fondo plano y cóncavo respectivamente marca Corning®. Las células se manipularon en una campana de flujo laminar clase II NUAIRE NU-540-400.
Prueba de sensibilidad a vincristina IC50	Se utilizaron células en monocultivo, cocultivo 2D y 3D expuestas a diferentes concentraciones del fármaco SUTIVIN® vincristina (Zurich Pharma). Se determinó la viabilidad celular usando la técnica de recuento en cámara de Neubauer Reichert Bright-Line empleando la tinción supravital de azul de tripán Gibco®

Extracción y cuantificación de proteínas.	Preparación de soluciones de lisis y ruptura de células con método mecánico de sonicación usando el equipo Ultrasonic processor GEX 13. Cuantificación de proteínas con Comassie Plus- Bradford Assay™ Kit THERMO, lectura de absorbancia en un espectrómetro SmartSpec® Plus BIORAD.
Obtención de péptidos	Reducción de proteínas con DL-Dithiothreitol (DTT) SIGMA, alquilación con iodoacetamida (IAM) BioUltra SIGMA y digestión de proteínas con la proteasa tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade PROMEGA). Desalado de péptidos con cartuchos Sep-Pak® Vac 1cc (50mg) tC18. Secado de péptidos en un concentrador Vacofuge Plus Eppendorf®
Identificación de proteínas	Inyección de péptidos en equipo nHPLC Ultimate 3000 System con columna Acclaim PepMap™ 100 75 µm x 15 cm C18 marca Thermo acoplado a un espectrómetro de masas Impact II Q-TOF Bruker Daltonics. Análisis bioinformático con el software ProteinScape.

E) PROCEDIMIENTO

CULTIVO CELULAR Y GENERACIÓN DE BIOMASA

- **ACTIVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES**

Para iniciar el cultivo de la línea celular CCRF-CEM, se descongeló un criovial en baño de agua a 37 °C, se trasvasó a un tubo cónico con 5 mL de medio RPMI 1640 GIBCO® enriquecido con 10 % suero fetal bovino (SFB) Gibco®, se centrifugó por 5 min a 800 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 1 mL de medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB. Empleando azul de tripán Gibco®, colorante vital, se determinó si las células eran viables para el cultivo; para ello se tomó una alícuota de la suspensión de células y se diluyó 1:10 en azul de tripán, se

homogeneizó la mezcla y se colocó el volumen suficiente para cubrir la superficie de la cámara de Neubauer, se cuantificaron las células que excluyen el colorante para conocer la viabilidad del cultivo, si el valor era mayor al 50%, las células se consideraron aptas para el cultivo y se adicionaron en una botella T25 con 4 mL de medio RPMI 1640 Gibco® con 10 % SFB, se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂.

Para iniciar el cultivo de la línea celular OP-9 se descongeló un criovial en baño con agua a 37 °C. Al comenzar a estar en estado líquido el contenido del criovial se trasvasó a una botella T-25 que contenía 5 mL de medio de cultivo α -MEM Gibco® 10 % SFB, se mezclaron suavemente y se introdujeron en la incubadora a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂.

La manipulación de las células se realizó en condiciones asépticas y en una campana de flujo laminar clase II.

- **PASAJE Y REPRODUCCIÓN.**

Para la línea celular CCRF-CEM se revisaron las células cada tercer día, se lavaron con 4 mL de PBS estéril y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 min para retirar los restos celulares, posteriormente se verificó su viabilidad y se dejaron en incubación en 5 mL de medio RPMI 1640 Gibco® enriquecido con 10 % SFB Gibco® y 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco® hasta que su viabilidad fue mayor al 90 %; al tenerlas confluentes y sin contaminación se procedió a realizar los experimentos.

Para la línea celular OP-9, después de 24 h de su descongelación se le retiró el medio y se les añadieron 5 mL de medio α -MEM Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco® y se dejaron incubando a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂. Posteriormente la caja confluyente se lavó con PBS estéril, se retiró todo el volumen y se añadió 1 mL de tripsina/EDTA Gibco®, se introdujo en la incubadora durante 5 min. Se observó en el microscopio que se hayan despegado las células y se añadieron 4 mL de Medio α -MEM Gibco® 10 % SFB y se mezcló suavemente para inactivar la tripsina y el contenido de la caja se trasvasó a un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se

descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de Medio α -MEM Gibco®, se cuantificaron las células con azul de tripán Gibco®, se tomó una alícuota que contuviera aproximadamente 1.5×10^5 células la cual se colocó en una botella T25 con 4 mL de medio α -MEM Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco® la cual se colocó en el microscopio para observar que la confluencia no fuese mayor al 50 %, para que el cambio de medio se realizara en dos días y evitar el sobrecrecimiento, se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂.

- **GENERACIÓN DE LOS COCULTIVOS 2D Y 3D**

Para el cocultivo 2D se emplearon placas de 96 pozos de fondo plano. Se agregaron a cada pozo 1×10^4 células OP-9 en un volumen de 100 μ L de medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco® y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ por 24 h. Posteriormente, se observó al microscopio que las células se hubieran adherido y a cada pozo se le agregaron 1×10^4 células CCRF-CEM y el medio necesario para que el volumen final fuese de 250 μ L. Para monitorear la contaminación, se mantuvieron sin células la primera y última fila.

Para el cocultivo 3D se preparó una solución de agarosa al 1 % que se hirvió en el microondas para lograr la completa disolución y se manipuló en estado líquido para recubrir el fondo cóncavo de los pozos de una placa de 96 pozos. Se adicionaron 100 μ L de agarosa disuelta a cada pozo y se retiraron al instante para formar una ligera capa en el fondo, evitando formar burbujas, se dejó secar expuesto a luz UV en la campana de flujo laminar por 10 min. En la primera y última fila se adicionaron 200 μ L de medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB con 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco® y se mantuvieron sin células para monitorear la contaminación. Posteriormente se colocó el volumen necesario en los pozos pertinentes para colocar 5×10^4 células OP-9, y se adicionó medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco® para obtener un volumen final de 100 μ L. Se incubaron durante 24 h y se observó con el microscopio la formación de esferoides; los pozos donde no se formaron correctamente se marcaron y descartaron. Se adicionó a cada pozo una alícuota con 5×10^4 células CCRF-CEM y se llevó a un

volumen final de 250 μ L con medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco® y las células se incubaron 24 h a 37 °C en una atmosfera de 5 % de CO₂ y posteriormente el cocultivo se observó en el microscopio para confirmar que las células CCRF-CEM hayan migrado hacia el esferoide de células OP-9 hasta recubrirlo por completo. Se decidió emplear la línea celular OP-9 debido a que es fácil de cultivar, y de acuerdo con las investigaciones de Fei F., las células leucémicas desarrollan tolerancia a vincristina cuando tienen soporte estromal de células OP-9, en comparación con células madre mesenquimales humanas.(72)

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A VINCRISTINA IC50

Se empleó el medicamento inyectable marca SUTIVIN® vincristina 1 mg/10 mL de Zurich Pharma durante los primeros dos meses después de su adquisición. La vincristina se diluyó en medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco® para alcanzar las concentraciones de fármaco deseadas en los cultivos celulares. El fármaco comercial se mantuvo en refrigeración.

- **MONOCULTIVO**

Para determinar la sensibilidad al fármaco vincristina se realizó un monocultivo con 2×10^4 células CCRF-CEM en una placa de 96 pozos, el volumen final en cada pozo fue de 250 μ L de medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco®. Se hicieron 8 pozos en los cuales se colocaron las siguientes concentraciones del fármaco: 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 y 40 nM. Después de 24 h de exposición se realizó el ensayo de viabilidad de cada pozo empleando el colorante vital azul de tripán Gibco®. El ensayo se realizó por triplicado (Figura 7).

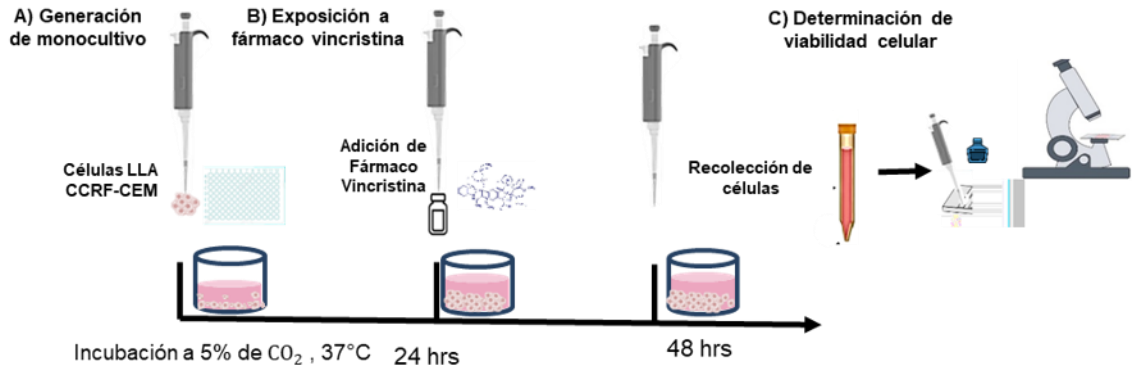


Figura 7. Prueba de sensibilidad en monocultivo. A) Generación de monocultivo. B) Exposición a fármaco vincristina. C) Determinación de viabilidad.

- **COCULTIVO 2D**

Para realizar el cocultivo 2D, primero se formó una monocapa con 1×10^4 células OP-9 en pozos de una placa de 96 pozos incubándolas por 24 h en 100 μ L de medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco®. Posteriormente se adicionaron 1×10^4 células CCRF-CEM y se dejaron en contacto los dos tipos celulares en la incubadora por 24 h en 150 μ L de medio, después de este tiempo se adicionó el fármaco vincristina a las siguientes concentraciones: 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 40 y 70 nM, el volumen final en cada pozo fue de 250 μ L de medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco®, se dejó en incubación durante 24 h. Se realizó el ensayo de viabilidad empleando el colorante vital azul de tripán Gibco® y se determinó la IC50. El ensayo se realizó por triplicado (Figura 8).

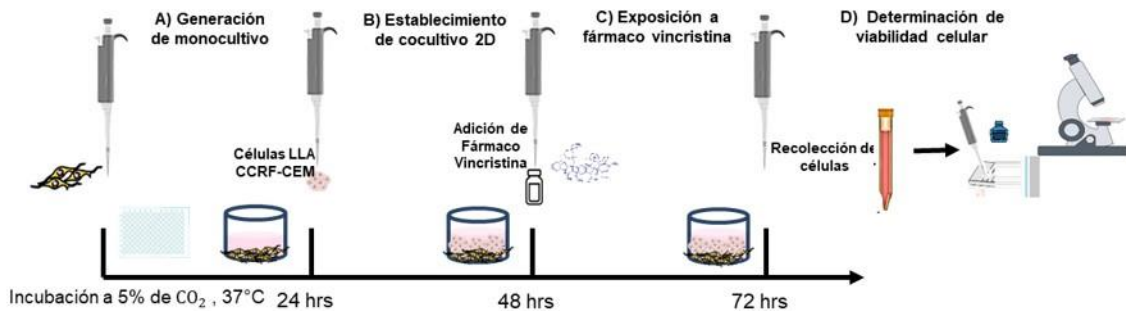


Figura 8 Prueba de sensibilidad a vincristina en cocultivo 2D. A) Generación de monocapa de células OP-9. B) Adición de células CCRFB y establecimiento del cocultivo 2D. C) Exposición a fármaco vincristina. D) Determinación de viabilidad celular.

- **COCULTIVO 3D**

Para realizar el cocultivo 3D, primero se formó el esferoide de células OP-9 incubando 5×10^4 células en pozos cóncavos con el fondo recubierto de agarosa por 24 h, posteriormente se adicionaron células CCRF-CEM y se dejaron interactuando los dos tipos celulares por 24 h, después de las cuales se adicionó el fármaco vincristina a las siguientes concentraciones: 0, 5, 7.5, 15, 30, 40, 55, 70 y 100 nM, el volumen final de cada pozo fue de 250 μ L de medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco® y se dejó en incubación durante 24 h. Posteriormente se realizó el ensayo de viabilidad celular empleando el colorante vital azul de tripán Gibco® y se determinó la IC50. El ensayo se realizó por triplicado (Figura 9)

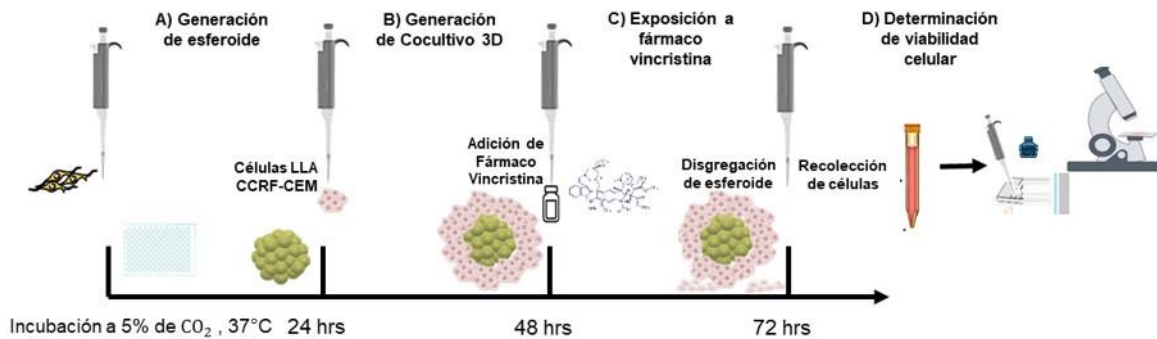


Figura 9. Prueba de sensibilidad en cocultivo 3D. A) Generación de esferoide. B) Generación de cocultivo 3D. C) Exposición a fármaco vincristina. D) Determinación de viabilidad celular.

OBTENCIÓN DE BIOMASA PARA LOS ANÁLISIS PROTEÓMICOS

- **MONOCULTIVO**

Las células CCRF-CEM se reprodujeron en botellas T25 con 5 mL de medio RPMI 1640 Gibco® 10 % SFB, 1 % de antibiótico/antimicótico Gibco® y se centrifugaron a 1200 rpm, el pellet celular se lavó 2 veces con PBS frío, las células se mantuvieron en hielo y se cuantificaron como se mencionó anteriormente. Se verificó que la viabilidad celular fuera mayor al 90 % y se tomó una alícuota equivalente a 3×10^4 de células para la lisis celular y extracción de proteínas.

- **COCULTIVO 3D**

Se disgregó la interacción formada entre las células OP-9 y CCRF-CEM pipeteando vigorosamente el medio contenido en cada pozo, posteriormente se recolectó la suspensión de células CCRF-CEM en un tubo de 1.5 mL. Al pozo se adicionaron 200 μ L de PBS estéril y con este se recolectó el esferoide de células OP-9. Los tubos se mantuvieron en hielo, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4 °C y se lavaron con PBS frío 2 veces. Se verificó que la viabilidad celular fuera mayor al 90 % y se procedió a utilizar el método de lisis celular y extracción de proteínas.

Se cultivaron células en 3 placas de 96 pozos. En cada placa se usaron 20 pozos de los que se cosechaban en total 1×10^6 células (5×10^4 células CCRF-CEM por pozo). El uso de tres placas permitió procesar rápidamente las células y mantenerlas siempre en frío con la finalidad de reducir los cambios en el proteoma debidos al procesamiento de las muestras. Se procesaron por separado las tres placas hasta juntar 3×10^6 de células. Solo se realizó una réplica biológica de 3×10^6 células.

No fue posible llevar a cabo la prueba en cocultivo 2D, debido a que ya no se disponía de muestra como del tiempo necesario para su procesamiento.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Se probaron 3 soluciones amortiguadoras de lisis. En la Tabla 2 se describen los componentes y las concentraciones de cada solución. Se empleó agua MilliQ para su elaboración.

Tabla 2. Composición de las diferentes soluciones amortiguadoras de lisis. Los protocolos para la lisis celular fueron adaptados de Muller, et al. (45).

Solución amortiguadora	Componentes	Concentración
	Urea	8 M
	NaCl	75 mM
Solución amortiguadora 1 (B1)	Ortovanadato de sodio	1 mM
	Tris pH 8.6	50 mM
	NaF	1 mM
	HCl	100 mM
Solución amortiguadora 2 (B2)	Urea	6 M
	Tiourea	2 M
	HCl	100 Mm
Solución amortiguadora 3 (B3)	Urea	8 M
	NaCl	75 mM
	Ortovanadato	1 mM
	NaF	1 mM
	Tris pH 8.6	50 mM

Para comparar la idoneidad de las soluciones amortiguadoras se usaron células CCRF-CEM, en monocultivo. Se emplearon 3×10^6 células para cada una. Las células se lavaron 2 veces con PBS frío (centrifugación a 1000 rpm por 5 min a 4 °C) y se les adicionaron 300 μ L de cada solución amortiguadora, las muestras se homogenizaron con agitación (vortex) y se mantuvieron en hielo. Para lisarlas se empleó sonicación en un baño de hielo durante 3 ciclos (cada ciclo consistió en 20 seg ON y 20 seg OFF al 40 % de potencia en un sonicador Ultrasonic processor GEX 13). Los lisados resultantes se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C(44–46) para separar el pellet de restos celulares.

- **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE BRADFORD.**

Se realizó una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) empleando el método de Bradford (Pierce™ Coomassie Plus Bradford Assay Kit). Para cuantificar las muestras se preparó un blanco con cada solución amortiguadora empleada, tanto los blancos como las muestras se diluyeron 1:10 en agua destilada y para determinar la concentración de proteínas se interpoló la absorbancia en el gráfico que se realizó de la curva estándar.

- **ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA**

Material y equipo:

2 vasos de precipitados 25 mL	1 recipiente de plástico/gel para la tinción.
1 pipeta Pasteur con bulbo	
Tubos para microfuga de 0.5 mL	1 equipo completo para electroforesis de proteínas BIORAD (incluye: reservorio con; electrodos, placas de vidrio, peines, sujetadores de las placas de vidrio y módulo para preparar el gel)
1 recipiente para hielo	
1 micropipeta de 2-10 µL	
1 micropipeta de 20-200 µL	
1 caja de puntas de 200 y 20 µL para micropipeta	1 fuente de poder

Reactivos:

Acrilamida. Mezcla de 30 % acrilamida y 0.8 % N'N'metileno-bisacrilamida.

2 M Tris /HCl pH 8.8

0.5 M Tris/HCl pH 6.8

20 % SDS

TEMED

10 % Persulfato de amonio

Agua destilada

Isopropanol o butanol

Mezcla de estándares de peso molecular de proteínas.

Amortiguador de muestra. Stock generalmente preparado a 2X y contiene 350 mM Tris base, 0.8 % SDS, 160 mM ditioneitol (DTT), 7.5 % Glicerol.

Amortiguador de corrida (0.05 M Tris Base, 0.38 M Glicina, 0.1 % SDS)

Solución teñidora tiempo largo [0.125 % (p/v) azul de Coomassie Blue R250 en 50 % (v/v) metanol, y 10 % (v/v) ácido acético]. Tinción que se logra después de 2 h.

Solución desteñidora para tinción tiempo largo (45 % Metanol, 10 % ácido acético)

Para preparar el gel se lavaron las placas de vidrio, se secaron y se ensamblaron con los separadores. Las placas quedaron bien niveladas y fijas con las pinzas. Se le hizo una pequeña marca a 2/3 de su capacidad (punto máximo).

Se mezclaron los componentes del gel separador: 2 mL de acrilamida (30 % acrilamida + 0.8 % bisacrilamida), 1 mL de 2 M Tris / HCl pH 8.8, 50 µL de 10 % SDS, 1.94 mL de agua destilada, 5 µL de TEMED. En un vaso de precipitado, antes de vaciar a las placas se agregó 40 µL de persulfato de amonio al 10 %.

Se vació inmediatamente la mezcla entre las dos placas de vidrio. Seguido de esto se agregó unas gotas de agua (para disminuir la tensión superficial y que la superficie quede completamente horizontal). Una vez que se polimerizó la acrilamida, se retiró el exceso de agua decantando y con ayuda de un papel filtro sin tocar el gel.

Para elaborar el gel concentrador se mezcló: 0.66 mL de acrilamida (30 % acrilamida + 0.8 % bisacrilamida), 0.6 mL de 0.5 M Tris / HCl pH 6.8, 50 µL de 10 % SDS, 3.67 mL de agua destilada, antes de vaciar en las placas de vidrio se adicionó

10 μL de TEMED y 80 μL de persulfato de amonio al 10 %, se agitó y se vertió sobre el gel separador.

Se insertó el peine enseguida de forma bicelada, procurando que no quedase burbujas de aire entre el peine y el gel. Cuando polimerizo, se retiró el peine con cuidado y las placas de vidrio con el gel se fijaron en la cámara de electroforesis.

Se descongelaron las muestras en una hielera lentamente, se tomó el equivalente a 50 μg de proteína y se mezcló con la solución amortiguadora de muestra hasta llegar al volumen final de 30 μL . En el primer pozo se colocó a los marcadores de peso molecular, se cargaron las muestras en los subsecuentes pozos. Se adicionó la solución amortiguadora de corrida en el gel hasta la mitad de la cámara de electroforesis, se tapó cuidadosamente y se conectó a la fuente de poder a 120 V por una hora. Se detuvo la corrida, se retiraron cuidadosamente los vidrios que contienen el gel el cual se colocó en una disolución de metanol-ácido acético (4:1) por 5 min, posteriormente se lavó con agua bidestilada hasta ya no percibir el olor a ácido acético. Para teñirlo se colocó en un recipiente con 30 mL de azul de Coomassie, se dejó tiñendo en agitación por 12 h. Posteriormente se retiró de la solución de tinción y se colocó en un recipiente limpio con agua bidestilada, se destiño adicionando solución desteñidora por 12 h, se colocó en un recipiente limpio con agua bidestilada hasta quitar el exceso de colorante. Posteriormente se visualizaron las bandas (73).

SELECCIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA

Con base al patrón de bandas en gel, se seleccionaron dos soluciones de lisis (soluciones amortiguadoras) para analizar las proteínas con el uso de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a un espectrómetro de masas. Las soluciones amortiguadoras seleccionados fueron B2 y B3.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS

- **DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS A PÉPTIDOS**

Se realizó el mismo procedimiento para ambas soluciones amortiguadoras, de acuerdo con la cuantificación previamente hecha por el método de Bradford se tomó una alícuota equivalente a 50 µg de proteína y se trasvasó a un microtubo de 1.5 mL, se preparó una disolución 0.5 M de DTT de la cual se adicionó a cada muestra la cantidad necesaria para llevarla a una concentración final de 20 mM, se homogenizaron los tubos y se incubaron durante 1 h a 37 °C para reducir los puentes disulfuro que posteriormente se alquilaron con IAM cuya concentración final en cada muestra fue de 40 mM, se incubó la reacción durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se diluyó la concentración de urea y tiourea 5 veces con disolución 50 mM de NH_4HCO_3 , para lograr que la concentración de urea/tiourea fuera de 1.5 M y así evitar la inhibición de la proteasa tripsina.

Se midió el pH de cada muestra y ambos estaban en 8 el cual es un valor óptimo para hacer la digestión con tripsina que se adicionó en relación 1:50 (1 µL de tripsina por 50 µg de proteína), se mezcló para que quedase homogéneo con ayuda de un vortex y posteriormente se dejó en incubación a 37 °C durante 18 horas. Se detuvo la reacción con agua ácida al 1 % de ácido fórmico y se llevó a un volumen de 1 mL, el pH fue de 2.

- **DESALADO DE PÉPTIDOS**

Previo a la separación de los péptidos trípticos por cromatografía de alta eficacia de nanoflujos (nHPLC) es conveniente remover las sales para facilitar la interacción de los analitos con la fase sólida. Además, estas reducen la eficiencia de la ionización por electrospray. Por ello se removieron por extracción en fase sólida, como a continuación se describe.

Se prepararon las siguientes disoluciones:

Solución A: agua obtenida del sistema de purificación MilliQ; 0.1 % ácido fórmico.

Solución B: 60 % acetonitrilo; 40 % agua; 0.1 % ácido fórmico

Se emplearon columnas SEP PAK C18 para realizar el desalado de los péptidos de cada muestra. Se activó cada columna agregando 1 mL de solución B, se equilibró con 2 mL de solución A, se hizo pasar cada muestra dos veces y posteriormente se lavaron los péptidos con 3 mL de solución A y finalmente se eluyeron con 1 mL de solución B. No hubo presencia de burbuja ni se dejó secar la columna en ninguno de los pasos.

Las muestras se secaron en una Vacofuge Plus Eppendorf®, aproximadamente en 3 h a temperatura ambiente y se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS

- **INYECCIÓN DE PÉPTIDOS AL nHPLC**

Para analizar las muestras, en cada análisis se inyectaron péptidos trípticos equivalentes a 1 µg de proteína celular, por ello los péptidos se resuspenden en 50 µL de una solución 95 % agua, 5 % acetonitrilo y 0.1 % ácido fórmico. La agitación en vortex fue de 6 min (en intervalos de 2 min de agitación por 1 min en hielo). Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min a 4 °C y se tomaron 48 µL que se trasvasaron a su respectivo vial de inyección. Para ser inyectados en el equipo de nano HPLC Ultimate 3000 (Thermo) con una columna Acclaim PepMap RSLC 75 µm x 15 cm C18, con un gradiente en el que la fase A fue agua al 0.1 % de ácido fórmico y la fase B de acetonitrilo con 0.1 % de ácido fórmico. El gradiente se programó de la siguiente manera, Tabla 3:

Tabla 3. Gradiente de elución.

Tiempo (min)	% fase B
0	2.0
7	2.0
15	5.0
50	10.0
200	30.0
222	90.0
230	90.0
235	2.0
250	2.0

El equipo nHPLC acoplado al espectrómetro de masas IMPACT II (Q-TOF), con fuente de ionización por electrospray en modo positivo, con un voltaje de capilar de 1500 V con un flujo de gas de 3 L/min a una temperatura de 150 °C. El analizador operó en un rango de masa/carga de 50 a 2200. Cada muestra se inyectó solo una vez.

- **ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

El análisis bioinformático desempeña un papel crucial en nuestro estudio, ya que nos permite desentrañar información valiosa a partir de los datos obtenidos de cada inyección de nuestras muestras. Para llevar a cabo este análisis, primero comenzamos por visualizar los espectros de masas en el programa *Compas Data Analysis*. En su interfaz se observa el espectro de masas y procedemos a deconvolucionar los datos, lo que nos permite extraer la lista de componentes(74).

Posteriormente estos se analizan con el software *Protein Scape* empleando la herramienta *Protein Extractor* que desempeña un papel crucial en la identificación de proteínas, analizando los espectros de masas de los péptidos, se les asigna una secuencia y se busca en las bases de datos de proteínas la presencia de las secuencias de péptidos, cuanto mayor sea la puntuación de las secuencias peptídicas identificadas en la proteína candidata, mayor será la confianza en la

identificación(75). Este proceso es fundamental para comprender la composición proteica en nuestro experimento.

Tras obtener la lista de proteínas, se realizó el análisis de localización subcelular empleando Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) y se realizó un diagrama de venn con el programa Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) para conocer las proteínas exclusivas y las que comparten las muestras de CCRF-CEM en monocultivo y cocultivo.

Las proteínas exclusivas de cada condición se analizaron en la base de datos *DAVID Bioinformatics DataBase* (<https://david.ncifcrf.gov/>) esta herramienta que va más allá de la simple identificación de proteínas. nos proporciona una visión profunda de las categorías funcionales sobrerrepresentadas en nuestras proteínas exclusivas. Además, nos brinda información detallada sobre los términos de ontología de genes (GO, Gene Ontology), que se dividen en tres categorías esenciales: función molecular, componente celular y proceso biológico. Estos términos de ontología de genes son como un mapa que nos guía a través de la funcionalidad de las proteínas que hemos identificado. Nos permiten comprender no solo qué hacen estas proteínas, sino también cómo se relacionan con los procesos celulares y biológicos. En resumen, el análisis bioinformático en DAVID agrega un nivel de profundidad y contexto a nuestra investigación que va más allá de la mera identificación de proteínas. Nos ayuda a comprender el significado biológico de nuestros hallazgos.

F) ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

En el caso de la viabilidad para conocer si existen diferencias significativas se realizó la prueba de la prueba de igualdad de varianzas de Levene. Los resultados fueron significativos. Al tener nuestros datos una distribución normal se procedió a realizar la prueba paramétrica ANOVA de un factor con prueba post hoc Tukey.

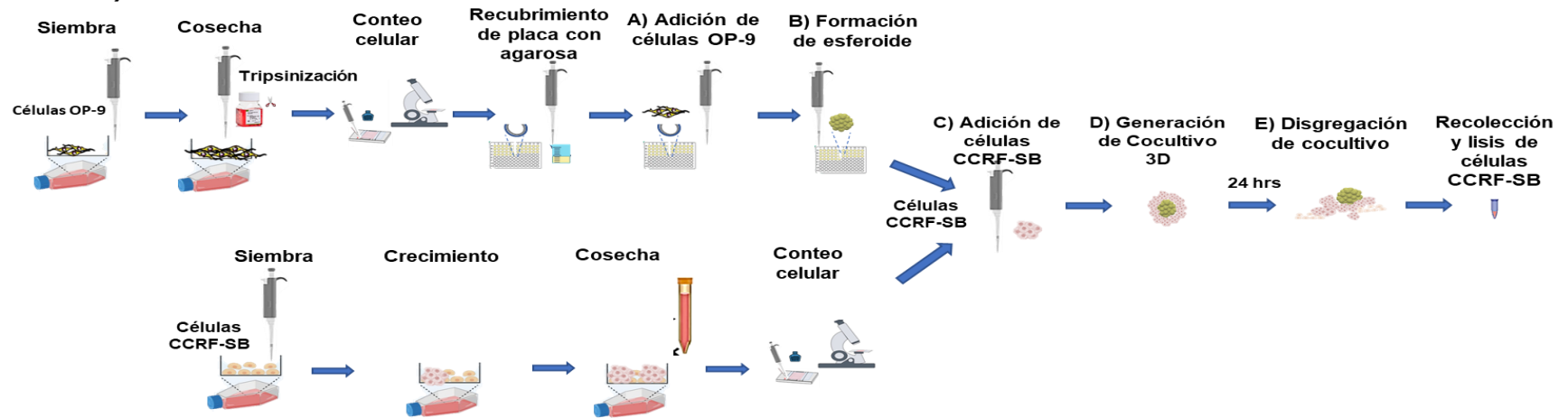
10) RESULTADOS

GENERACIÓN DE COCULTIVO 3D.

En los modelos experimentales de microambiente se debe reproducir la compleja comunicación entre distintos tipos de células. El estudio de células leucémicas en monocultivo carece de este factor importante para la fisiología celular y la tolerancia a fármacos en las células leucémicas. El modelo de microambiente más sencillo es el cocultivo 2D, sin embargo, el cocultivo 3D ha demostrado ser superior al 2D en cuanto a simular las interacciones con células troncales cancerosas y en la inducción de tolerancia a fármacos quimioterapéuticos(41,44–46).

En la Figura 10 se describe la estrategia que se usó para establecer los cocultivos 3D.

Panel A)



Panel B)



Figura 10 Descripción de secuencias para generar cocultivos 3D. Panel A) diagrama general para la obtención del cocultivo 3D. Primero se cultivan las líneas celulares por separado. Específicamente las células OP-9 se encuentran en monocultivo hasta tener una confluencia del 90% se cosechan, se cuentan y se pasan a placas de fondo cóncavo para formar esferoides, mientras que las células CCRF-CEM solo se cultivan en la caja T25, alcanzan una confluencia del 90%, se cosechan y cuentan para adicionarse al esferoide, posteriormente se genera el cocultivo por 24 h y finalmente disgrega el cocultivo. Se cosechan solo las células CCRF-CEM. **Panel B)** Fotografías en microscopio invertido de algunas de las etapas indicadas en el panel A. **a)** Adición de células OP9 (objetivo 40x), las células no se adhieren al fondo recubierto de agarosa y se unen entre ellas para formar el esferoide. **b)** Formación de esferoide de células OP-9 (24 h; objetivo 40x). **c)** Adición de células CCRF-CEM (objetivo 10x), las células leucémicas recién adicionadas a los pozos están homogéneamente distribuidas en el medio, pero con el tiempo migran hacia el esferoide mediante un proceso de quimiotaxis. **d)** Formación del cocultivo 3D (24 h; objetivo 10x), el esferoide está completamente rodeado de células leucémicas; prácticamente no se observan células CCRF-CEM libres en suspensión. **e)** Disgregación del cocultivo 3D (24 h; objetivo 40x), mediante pipeteo intenso se resuspende la mayoría de las células CCRF-CEM y pueden cosecharse del medio; quedan unas cuantas células CCRF-CEM adheridas al esferoide de células OP-9.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (IC50) DE VINCRISTINA A LAS 24 HORAS

• MONOCULTIVO

En la Tabla 4 se muestran los resultados de tres réplicas biológicas independientes de la viabilidad celular de la línea CCRF-CEM en monocultivo a diferentes concentraciones de vincristina. Tanto en la tabla 7 como en la figura 11 se observa que la concentración a la cual se alcanza la IC 50 es aproximadamente a 5nM. Además, es importante destacar que el comportamiento es dosis dependiente ya que disminuye la viabilidad conforme se incrementa la concentración de vincristina de manera significativa.

Tabla 4 Viabilidad de células CCRF-CEM en monocultivo a diferentes concentraciones de vincristina. Datos de cada réplica biológica, promedio y desviación.

Concentración (nM)	Viabilidad 1 (%)	Viabilidad 2 (%)	Viabilidad 3 (%)	Promedio	
				de viabilidad (%)	Desviación estándar (%)
0	92.1	94.9	93.2	93.48	1.37
2.5	73.0	76.5	74.9	74.75*	1.75
5.0	55.2	51.6	50.9	53.39*	1.82
7.5	49.3	45.0	48.1	47.15*	2.15
10	29.8	34.4	33.2	32.10*	2.34
15	21.5	18.2	19.9	19.83*	1.63
20	18.3	16.0	16.1	17.16*	1.18
40	12.9	9.0	11.7	10.94*	1.92

* $p < 0.05$ vs. 0 nM (ANOVA-Tukey)

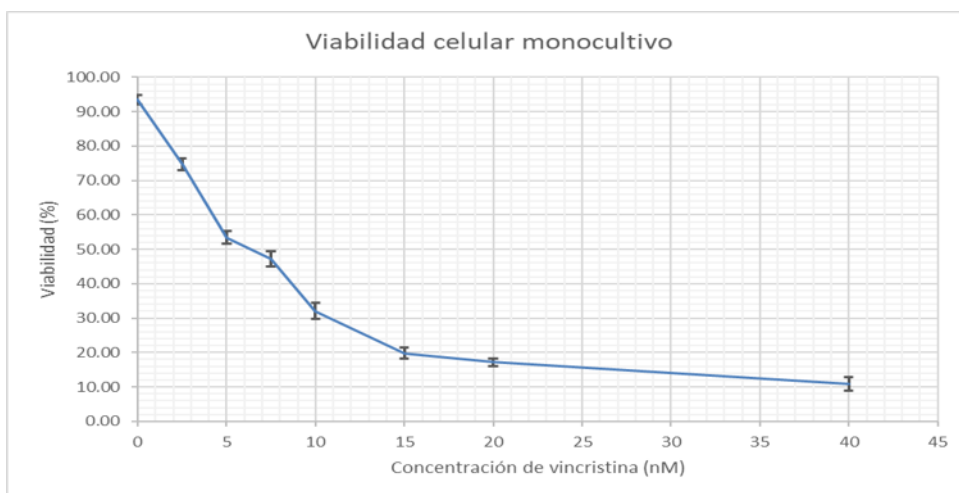


Figura 11. Viabilidad celular en monocultivo. Promedios y desviación estándar de la viabilidad celular de células CCRF-CEM en monocultivo a diferentes concentraciones de vincristina

Los datos del porcentaje de viabilidad se transformaron a logaritmo base 10, como se presenta en la Tabla 5. Estos datos se representaron gráficamente en la Figura 12 y se realizó su análisis de regresión lineal. La ecuación de la recta resultante y su coeficiente de correlación ($r = 0.85$) indican claramente la existencia de una correlación entre el aumento de la concentración del fármaco y la disminución de la viabilidad de las células leucémicas CCRF-CEM.

Tabla 5 Concentración de vincristina contra el logaritmo del promedio de viabilidad.

Concentración (nM)	Log10(%viabilidad)
0	1.97
2.5	1.87
5.0	1.73
7.5	1.67
10	1.51
15	1.30
20	1.23
40	1.04

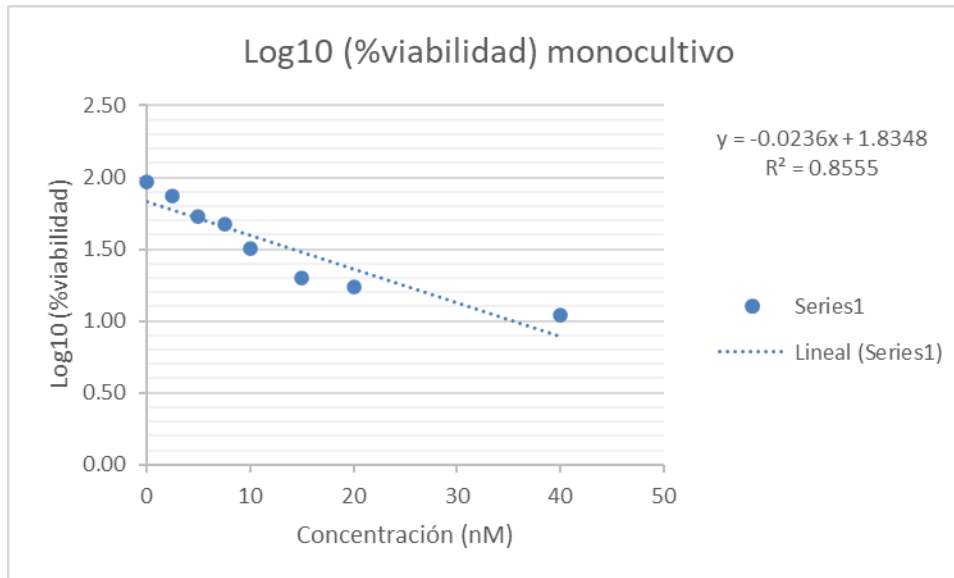


Figura 12. Gráfica del porcentaje de viabilidad de monocultivo transformada a logaritmo base 10 y regresión lineal.

Cálculo de la concentración inhibitoria IC50 de las células CCRFB-CEM en monocultivo

Para calcular la IC50 se sustituyó el valor de 50 % de viabilidad en la ecuación de la recta obtenida por regresión lineal:

Ecuación de la recta obtenida: $y = -0.0236x + 1.8348$; Por lo tanto, la pendiente (m) = -0.0236 1/nM , mientras que la ordenada al origen (b) es 1.8348.

$$IC_{50} = \frac{\text{Log}_{10}(50\%) - 1.8348}{-0.0236 \text{ 1/nM}} = 5.75 \text{ nM} = \mathbf{6 \text{ nM}}$$

Por lo que la concentración del fármaco vincristina necesario para disminuir a la población de la línea celular CCRF-CEM en monocultivo el 50 % es de 6 nM tras una exposición de 24 h.

- **COCULTIVO 2D**

En la tabla 6 se muestran los resultados de tres réplicas biológicas independientes de la viabilidad celular de la línea CCRF-CEM en cocultivo 2D a diferentes concentraciones de vincristina, así como el promedio y la desviación estándar. En la Figura 13 se observa que la concentración a la cual se alcanza la IC50 es

aproximadamente a 15 nM, y que se tiene un comportamiento dosis dependiente debido a la reducción de la viabilidad celular a concentraciones crecientes de vincristina de manera significativa.

Tabla 6. Viabilidad de células CCRF-CEM en cocultivo 2D a diferentes concentraciones de vincristina. Datos de cada réplica biológica, promedio y desviación.

Concentración (nM)	Viabilidad 1 (%)	Viabilidad 2 (%)	Viabilidad 3 (%)	Promedio viabilidad (%)	Desviación estándar (%)
0	83.9	86.3	91.2	87.13	2.70
2.5	71.3	77.7	81.8	76.94*	3.76
5.0	69.3	71.5	73.3	71.37*	1.38
7.5	69.3	64.2	67.5	66.99*	1.86
10	53.2	69.7	61.9	61.60*	5.60
15	46.8	38.9	45.3	43.67*	3.17
20	37.6	28.9	27.6	31.36	4.16
40	23.0	16.1	18.7	19.23*	2.51
70	14.9	15.1	18.6	16.19*	1.63

* $p < 0.05$ vs. 0 nM (ANOVA-Tukey)

Con los datos obtenidos al transformar la viabilidad a logaritmo base 10 (Tabla 7) se realizó la gráfica (Figura 14), la regresión lineal, se obtuvo la ecuación de la recta y su coeficiente de correlación $r=0.87$ indicando la correlación que existe entre la concentración del fármaco y la viabilidad celular, disminuyendo esta última al incrementar la concentración de fármaco.

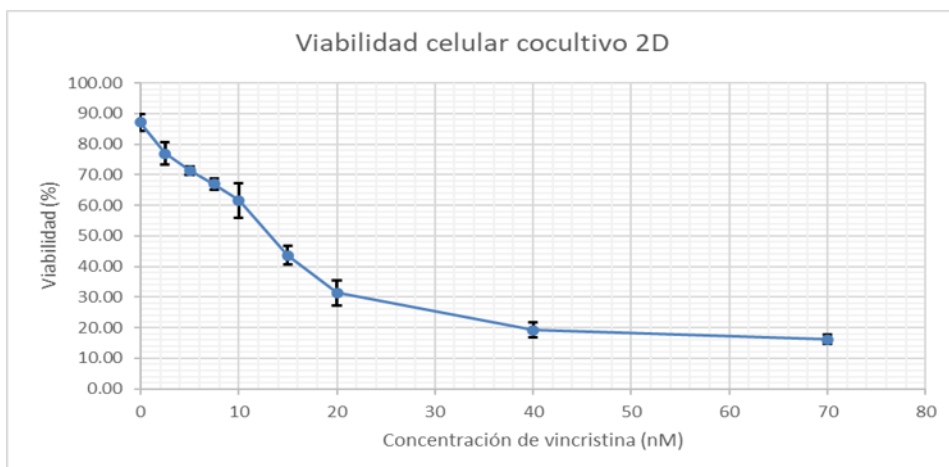


Figura 13. Viabilidad celular en cocultivo 2D. Promedios y desviación estándar de la viabilidad celular de células CCRF-CEM en cocultivo 2D a diferentes concentraciones de vincristina

Tabla 7. Concentración de vincristina contra el logaritmo de la viabilidad de las células CCRF-CEM en cocultivo 2D.

Concentración (nM)	Log10 (%viabilidad)
0	1.94
2.5	1.89
5	1.85
7.5	1.83
10	1.79
15	1.64
20	1.50
40	1.28
70	1.21

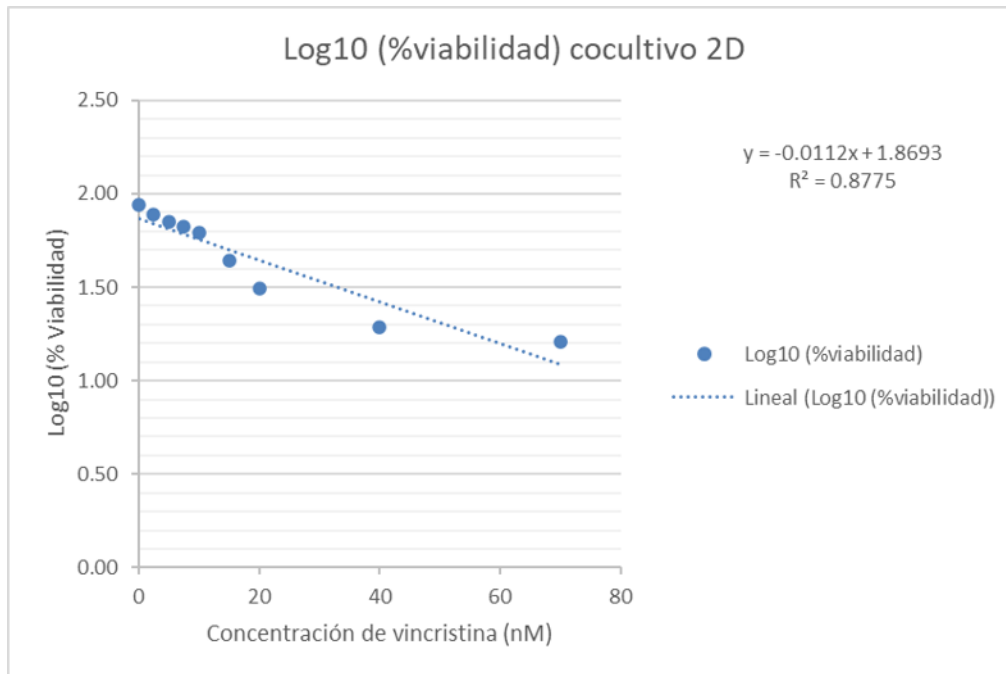


Figura 14. Gráfica de porcentaje de viabilidad transformada a logaritmo base 10 y regresión lineal del cocultivo 2D

Cálculo de la concentración inhibitoria 50 IC50 de las células CCRFB-CEM en cocultivo 2D

Para calcular la IC50 se sustituyó el valor de 50 % de viabilidad en la ecuación de la recta obtenida por regresión lineal:

Ecuación de la recta obtenida: $y = -0.0112x + 1.8693$; Por lo tanto, la pendiente (m) = -0.0112 1/nM , mientras que la ordenada al origen (b) es 1.8693.

$$IC_{50} = \frac{\text{Log}_{10}(50\%) - 1.8693}{-0.0112 \text{ 1/nM}} = 15.20 \text{ nM} = \mathbf{15 \text{ nM}}$$

Por lo que la concentración del fármaco vincristina necesario para disminuir a la población de la línea celular CCRF-CEM un 50 % es de 15 nM tras 24 h de exposición cuando se encuentran en cocultivo 2D con la línea células OP-9.

- **COCULTIVO 3D**

En la Tabla 8 se muestran los resultados de tres réplicas biológicas independientes para la determinación de la viabilidad celular de la línea CCRF-CEM en cocultivo 3D a diferentes concentraciones de vincristina, así como el promedio y la desviación estándar. En la Figura 15 se observa el efecto dosis respuesta, debido a la correspondiente reducción de la viabilidad celular a concentraciones crecientes de vincristina significativamente, especialmente se observa que a la concentración a la cual se alcanza la IC 50 es aproximadamente a 55 nM.

Tabla 8. Viabilidad de células CCRF-CEM en cocultivo 3D a diferentes concentraciones de vincristina. Datos de cada réplica biológica, promedio y desviación

Concentración (nM)	Viabilidad 1 (%)	Viabilidad 2 (%)	Viabilidad 3 (%)	Promedio viabilidad (%)	Desviación estándar (%)
0	86.3	83.9	87.6	85.92	1.35
5	80.5	80.3	77.6	79.46*	1.26
7.5	70.3	70.8	67.0	69.37*	1.60
15	66.4	70.8	65.0	67.39*	2.28
30	63.1	67.3	58.9	63.10*	2.81
40	64.1	63.8	55.3	61.07*	3.82
55	56.9	58.7	46.5	54.05*	5.04
70	42.7	40.9	38.1	40.56*	1.65
100	30	29.2	28.5	29.20*	0.52

* $p < 0.05$ vs. 0 nM (ANOVA-Tukey)

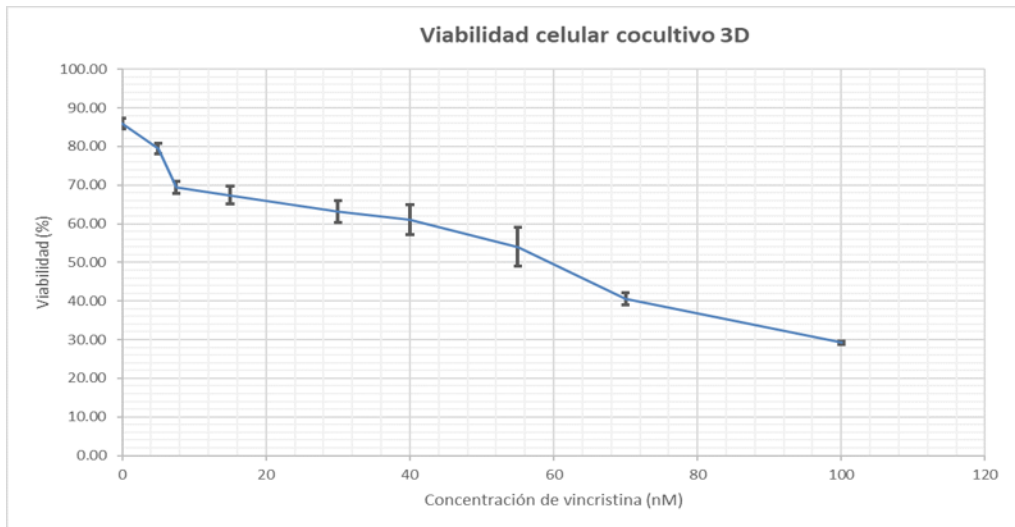


Figura 15. Viabilidad celular en cocultivo 3D. Promedios y desviación estándar de la viabilidad celular de células CCRF-CEM en cocultivo 3D a diferentes concentraciones de vincristina.

Con los datos obtenidos al transformar la viabilidad a logaritmo base 10 como se presenta en la Tabla 9, que se representaron gráficamente en Figura 16 y se realizó un análisis de regresión lineal. La ecuación de la recta y su coeficiente de correlación ($r= 0.95$) indican la existencia de una correlación entre el aumento de la concentración del fármaco y la disminución de la viabilidad de las células leucémicas CCRF-CEM.

Tabla 9. Concentración de vincristina contra el logaritmo de la viabilidad de las células CCRF-CEM en cocultivo 3D

Concentración (nM)	Log10 (%viabilidad)
0	1.93
5	1.90
7.5	1.84
15	1.83
30	1.80
40	1.79
55	1.73
70	1.61
100	1.47

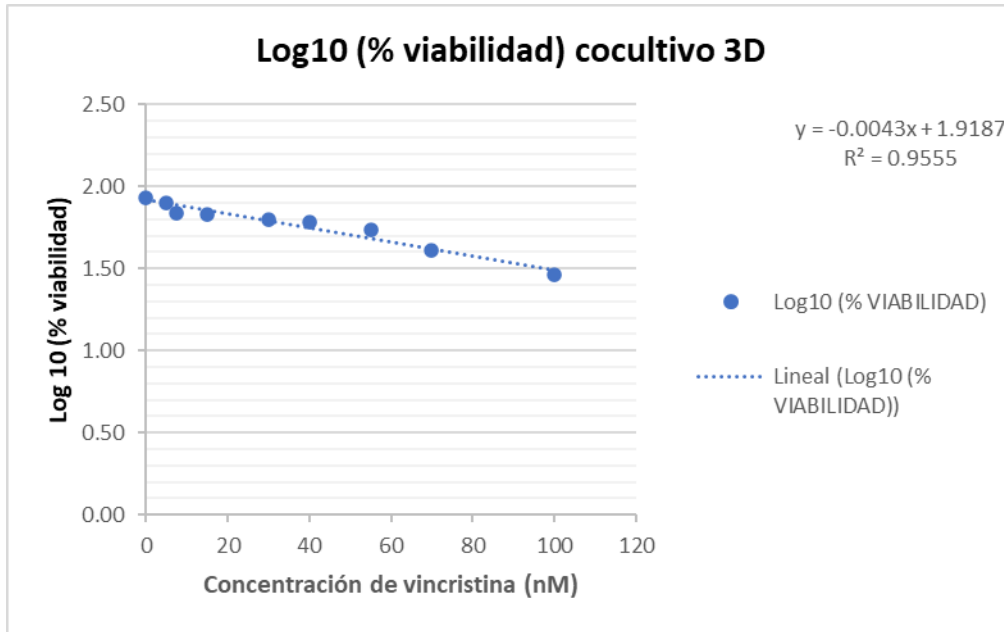


Figura 16 Gráfica porcentaje de viabilidad transformada a logaritmo base 10 y regresión lineal del cocultivo 3D.

Cálculo de la concentración inhibitoria 50 IC50 de las células CCRFB-CEM en cocultivo 3D

Para calcular la IC50 se sustituyó el valor de 50 % de viabilidad en la ecuación de la recta obtenida por regresión lineal:

Ecuación de la recta obtenida= $y = -0.0043x + 1.9187$; Por lo tanto, la pendiente (m) = -0.0043 1/nM , mientras que la ordenada al origen (b) es 1.9187.

$$IC_{50} = \frac{\text{Log}_{10}(50\%) - 1.9187}{-0.0043 \text{ 1/nM}} = 51.09 \text{ nM} = \mathbf{51 \text{ nM}}$$

Por lo tanto, la concentración del fármaco vincristina necesaria para disminuir la población de la línea células CCRF-CEM un 50 % es de 51 nM tras 24 h de exposición cuando éstas se encuentran en cocultivo 3D con células OP-9.

•

- **COMPARATIVO DE LAS IC50**

Tabla 10. Comparación de las IC50 obtenidas en los diferentes modelos de cultivo celular.

	Tipo de cultivo celular		
	Monocultivo	Cocultivo 2D	Cocultivo 3D
IC50	6 nM	15 nM	51 nM
Factor de protección		2.5 veces	8.5 veces

Ponemos observar en la tabla 10 un resumen del efecto protector que ofrecen las células estromales en el cocultivo 2D Y 3D, en comparación con el monocultivo.

ESCALAMIENTO DEL COCULTIVO 3D

Una vez verificado el mayor efecto protector del cocultivo 3D en comparación con el cocultivo 2D, se procedió a escalar el cocultivo 3D, para obtener suficientes células para los análisis proteómicos.

Por experiencia previa del laboratorio, sabíamos que al menos necesitaríamos 3×10^6 células. Por ello se hicieron cocultivos 3D sin vincristina en 66 pozos en una placa de 96 pozos y se cosecharon las células CCRF-CEM como se describe en materiales y método en la Figura 9. Se logró obtener 3×10^6 células, pero el tiempo de procesado era entre 1.5 y 2 h, siendo probable que el proteoma de las células hubiera presentado cambios significativos debido a que ya no estaban en atmosfera de 5 % CO₂ a 37 °C e interactuando con las células OP-9.

Para evitar ese probable cambio en el proteoma, decidimos reducir el tiempo haciendo cocultivo 3D en tres placas de modo que en cada una solo se ocuparan 24 pozos. Mientras procesábamos una placa, las otras 2 estaban en la incubadora inalteradas. De este modo el tiempo de procesamiento hasta cosechar las células

CCRF-CEM fue de 20 min por placa. Con esta estrategia se obtenían de 3×10^6 a 3.1×10^6 células CCRF-CEM en total de acuerdo con el método de conteo de azul de tripán en una cámara de Neubauer.

ANÁLISIS PROTEÓMICOS.

RESULTADOS DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.

Para determinar la solución amortiguadora adecuada para realizar la lisis celular y obtener las proteínas de la muestra, primero se determinó la concentración de proteínas totales por el ensayo colorimétrico de Bradford y posteriormente se realizó una electroforesis de las muestras en gel de poliacrilamida. En la Tabla 11 se encuentra el resumen de las concentraciones de proteínas que se obtuvieron por cada solución amortiguadora.

Para estas pruebas solo se usaron células CCRF-CEM cultivadas en monocultivo.

Tabla 11 Concentración de proteínas totales. Empleando el método colorimétrico de Bradford al lisar 3×10^6 células CCRF-CEM en monocultivo.

	Solución amortiguadora de lisis	Concentración de proteínas ($\mu\text{g/mL}$)
A	Solución amortiguadora 1	272.7
	Solución amortiguadora 2	333.33
	Solución amortiguadora 3	750

continuación, se muestra la figura 17. En el que se puede apreciar la comparación del patrón de bandas en el gel de poliacrilamida de los extractos de proteínas.

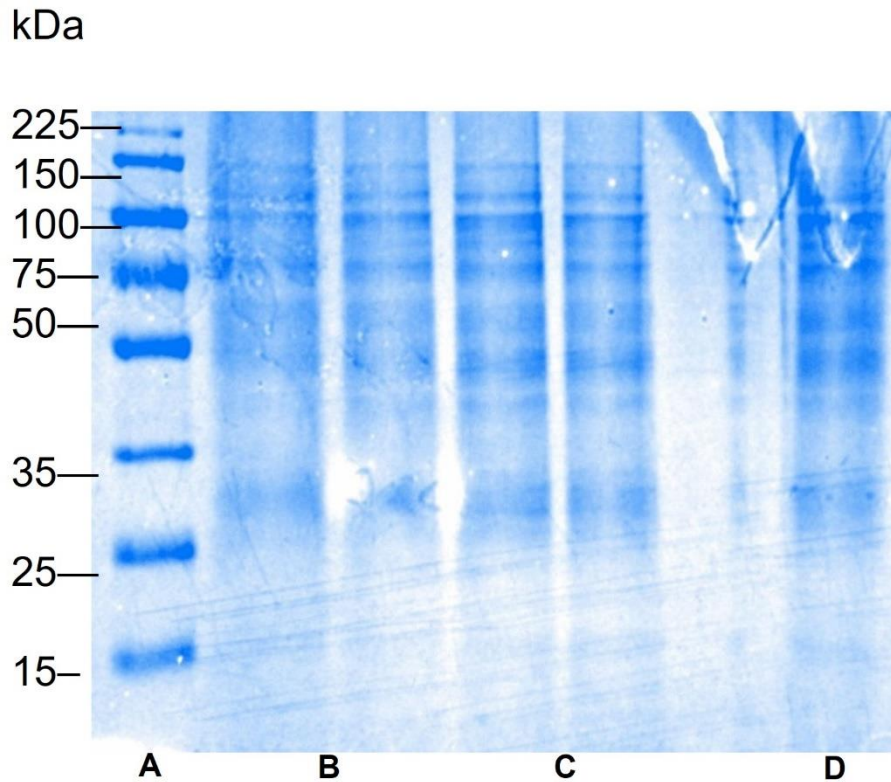


Figura 17 Comparación del patrón de bandas en gel de poliacrilamida de los extractos de proteínas. A) Marcador de peso molecular. **B)** Extracto de proteínas obtenido con la solución amortiguadora 1, (carriles 2° y 3°). **C)** Extracto de proteínas obtenido con la solución amortiguadora 2 (carriles 4° y 5°). **D)** Extracto de proteínas obtenido con la solución amortiguadora 3 (6° carril).

Con base a los resultados de la Tabla 11 y a la apariencia de las bandas de la Figura 17, se seleccionaron las soluciones amortiguadoras 2 y 3 porque con ellas se obtuvo mayor concentración de proteína y bandas más definidas.

Los extractos celulares obtenidos con esas dos soluciones amortiguadoras se procesaron para analizar el proteoma: reducción con DTT, alquilación con IAM, digestión con tripsina y desalado de los péptidos. Posteriormente se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos de alto desempeño de nanoflujos (nHPLC) acoplado al espectro de masas de tipo cuadrupolo-TOF (Impact II, marca Bruker Daltonics). En la separación cromatográfica los péptidos se unen a la resina de fase reversa C18, con base a su hidrofobicidad. La fase móvil consiste en una mezcla de agua y acetonitrilo en la que la concentración de acetonitrilo aumenta en gradiente lineal de

2 h arrastrando gradualmente los péptidos. Conforme salen se ionizan por el electrospray y se les determina la relación masa/carga en el cuadrupolo (MS) y luego se fragmentan por colisión con gas N₂ y se miden las masas de los fragmentos resultantes en el analizador de tiempo de vuelo (TOF) (MS/MS) con las masas de los iones precursores y las de los fragmentos, los softwares de análisis identificaron las proteínas presentes.

Después de separar los péptidos en el equipo de nanoflujos nHPLC (cromatograma en ANEXO II) y del análisis de masas, se procesaron los resultados en los softwares *Compass DataAnalysis* y *ProteinScape* (Bruker Daltonics) para determinar la cantidad de proteínas identificadas por cada solución amortiguadora como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Proteínas identificadas por nHPLC-MS/MS.

Solución amortiguadora de lisis	Proteínas totales identificadas
Solución amortiguadora 2 (B2)	1124
Solución amortiguadora 3 (B3)	1157

Solo se realizó una inyección para cada solución amortiguadora.

De acuerdo con el número total de proteínas, la diferencia entre la solución amortiguadora 2 y 3 es de tan solo 27 proteínas, para facilitar la selección de la solución amortiguadora para lisis óptima se realizó un diagrama de Venn, donde las proteínas encontradas entre ambas muestras se comparan y se observa que ambas soluciones amortiguadoras comparten 887 proteínas, sin embargo, de acuerdo con el diagrama de Venn (Figura 18), el B3 tiene 270 proteínas exclusivas; 33 proteínas más con respecto a B2 que tiene 237.

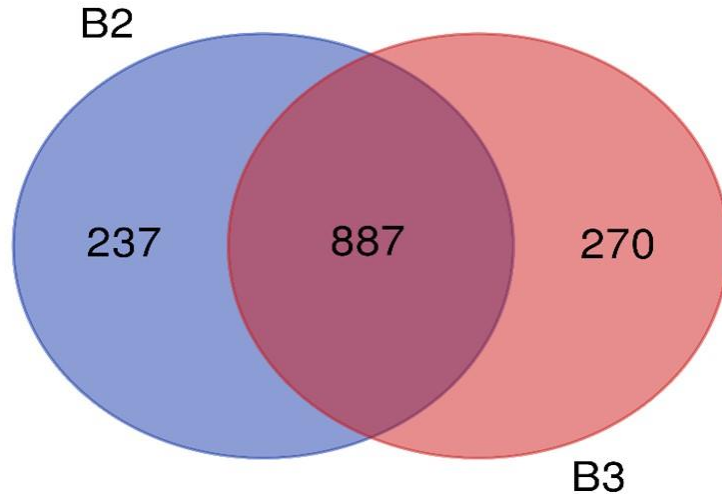


Figura 18. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas con cada solución amortiguadora. Comparación de las proteínas identificadas por los análisis proteómicos de los extractos celulares obtenidos con las soluciones amortiguadoras. B2 (solución amortiguadora 2) muestra las proteínas exclusivas, B3 (solución amortiguadora 3) con sus respectivas proteínas exclusivas y con la intersección que nos indica las proteínas que se comparten

Para conocer un poco más acerca de las proteínas que encontramos se empleó el sitio web UniProt (<https://www.uniprot.org/>) que nos brindó información sobre la localización subcelular de estas proteínas. A continuación, en la Tabla 13 y en las Figuras 19 y 20 se muestra la localización celular de las proteínas identificadas, cabe mencionar que en ambas soluciones amortiguadoras hay proteínas a las cuales UniProt no les asignó una localización.

Tabla 13. Localización celular de las proteínas identificadas al lisar las células con B2 y B3. Una proteína dada puede tener más de una localización subcelular.

Localización celular	Solución amortiguadora para lisis			
	Solución		Solución	
	amortiguadora 2 (B2)		amortiguadora 3 (B3)	
	Cantidad de proteínas	%	Cantidad de proteínas	%
Membranales	49	5.0	54	5.4
Citoplasmáticas	420	42.9	425	42.5
Nucleares	308	31.5	320	32.0
Retículo endoplásmico	37	3.8	42	4.2
Mitocondriales	117	12.0	109	10.9
Otras	48	4.9	51	5.1
Total	979	100.0	1001	100.0

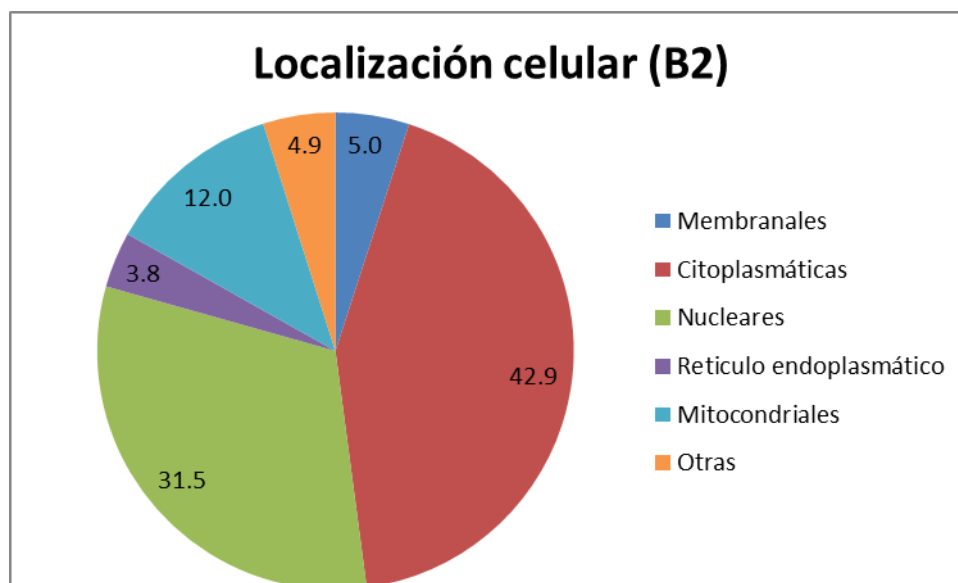


Figura 19. Localización celular de las proteínas extraídas con B2 expresada en un diagrama circular. Los numero indican porcentajes

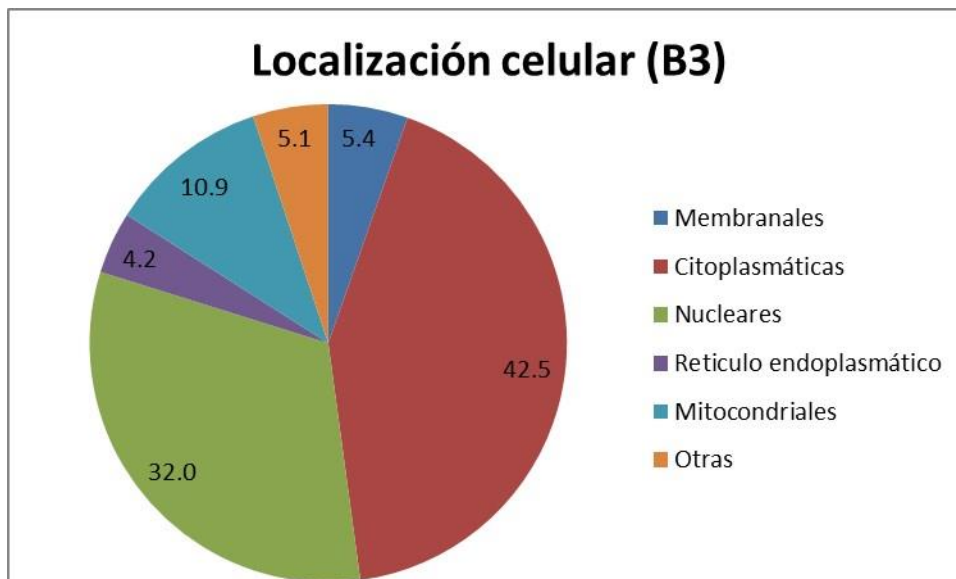


Figura 20. Localización celular de las proteínas extraídas con el B3 expresada en un diagrama circular. Los números indican porcentajes.

A pesar de que existen pequeñas diferencias entre ambas soluciones amortiguadoras, es probable que no sean significativas, dado que solo se realizó una inyección. Concluimos que ambas soluciones son adecuadas para el subsecuente análisis proteómico de células provenientes del cocultivo 3D. Se optó por utilizar la solución B3 debido a que proporcionó una mayor cantidad de proteínas, de acuerdo con la Tabla 12, y presentó más proteínas exclusivas, como se muestra en la Figura 18.

Las células recolectadas del cocultivo 3D (CCRF-CEM y OP-9) se lisaron empleando la solución B3; se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford, posteriormente las proteínas se procesaron hasta péptidos para ser analizadas por el equipo nHPLC acoplado al espectro de masas de tipo cuadrupolo-TOF (cromatograma en ANEXO II), los resultados fueron analizados con los softwares *Compass DataAnalysis* y *ProteinScape* (Bruker Daltonics) ambos mencionados anteriormente. En la Tabla 14 se resumen ambos resultados.

Tabla 14. Cantidad de proteínas identificadas en 3×10^6 células de cada tipo celular provenientes de cocultivo 3D. Sólo se realizó una réplica biológica (un cocultivo).

Línea celular	Concentración de proteínas totales ($\mu\text{g/mL}$)*	Proteínas totales identificadas (n=1)
CCRF-CEM	422.67	1108
OP-9	401.39	848

**Determinado por el método de Bradford empleando una curva estándar de albúmina de suero bovino.*

COMPARACIÓN DEL PROTEOMA DE CÉLULAS CCRF-CEM EN MONOCULTIVO VS COCULTIVO 3D.

Para conocer los cambios provocados en las células CCRF-CEM por la comunicación intercelular con las OP-9, se comparó el proteoma obtenido de las células CCRF-CEM en monocultivo con las CCRF-CEM obtenidas del cocultivo 3D. En la Figura 21 se observa que comparten 919 proteínas, mientras que las células en monocultivo tienen 238 proteínas exclusivas y las células en cocultivo tienen 189 proteínas exclusivas.

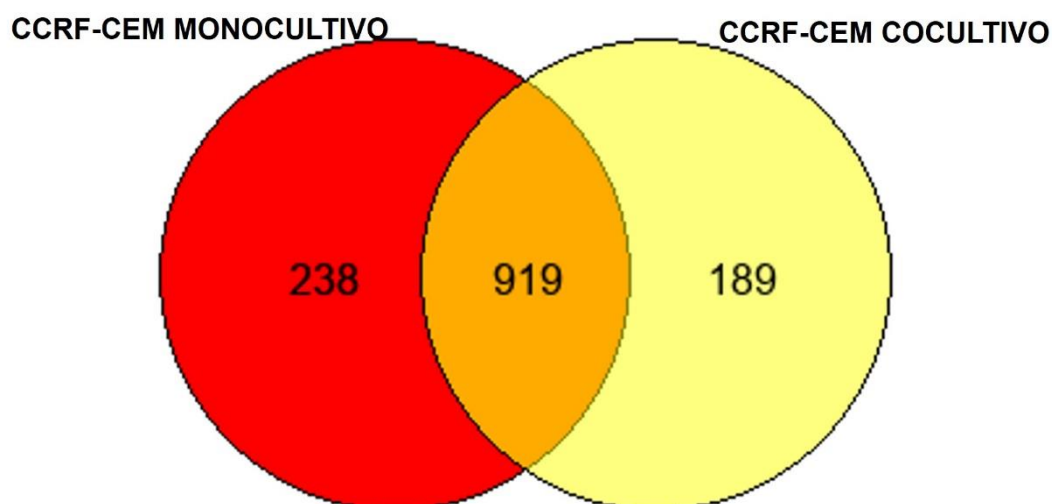


Figura 21. Comparación del proteoma entre las células CCRF-CEM obtenidas de monocultivo y cocultivo 3D.

No se analizó el proteoma de las células OP-9 en monocultivo, por lo que, para esta línea celular, no se compararon los proteomas en las dos condiciones.

- **ANÁLISIS DE CATEGORÍAS FUNCIONALES**

Para continuar con el análisis, se empleó la base de datos DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) usando la herramienta *Functional Annotation* se obtuvieron las correspondientes tablas que resultan de la opción *Functional Annotation Chart*, que organizó los resultados en las categorías funcionales que corresponden a mecanismos y procesos celulares; esto se realizó para la lista de proteínas exclusivas de monocultivo (238), para las exclusivas de cocultivo (189) y también para las compartidas (919) (Figura 21). Los resultados se copiaron a libros de Excel para depurar la información dejando las categorías funcionales cuyo valor de P fuera menor a 0.05. Con este criterio, para el monocultivo y cocultivo se seleccionaron 129 y 64 categorías funcionales respectivamente. Mientras que para las compartidas fueron 736. Las listas se ordenaron de menor a mayor valor de P-value y posteriormente se seleccionaron las primeras 27 categorías. Cada una de estas categorías está representada por proteínas, y una proteína puede estar presente en más de una categoría.

La herramienta de análisis DAVID nos brinda términos de ontología de genes (Gene Ontology, GO), los cuales pueden ser de tres tipos: función molecular, componente celular y proceso biológico. Para interpretar nuestros resultados, utilizamos los términos de “procesos biológicos”. A cada término GO se le asigna un valor de P (P value) el cual representa la certeza con la que ese término está representado en la lista de proteínas, a menor valor P, mayor certeza de que un término dado esté representado en nuestra lista. Además, se obtiene un valor de enriquecimiento (fold enrichment) el cual representa el grado en el que un término está sobrerrepresentado en la lista de proteínas que se analizó. El valor de P depende del número de proteínas por lo que los valores obtenidos por ejemplo de la lista de “compartidas” (919 proteínas) fueron menores que los valores obtenidos de las listas de “exclusivas monocultivo” (238 proteínas) o “exclusivas cocultivo” (189 proteínas).

En cambio, los valores de “fold enrichment” no dependen del tamaño de las listas que se analizan ya que en esencia es un cociente entre las proteínas asignadas a una categoría GO específica, entre las proteínas totales de la lista. Por ello decidimos usar el fold enrichment para comparar nuestras listas (Figura 22).

Por otro lado, el análisis de ontología de genes resulta en algunos términos GO repetitivos, por ejemplo: “Tetrahydrofolate metabolic process” y “response to methotrexate”; o “translation initiation” y “positive regulation of translation”. Por ello, es posible agrupar varios términos GO en procesos celulares más generales que nos brinden una idea más clara de lo que está sucediendo.

En la Figura 22 podemos observar un gráfico en el que se agruparon manualmente los términos GO en procesos celulares más generales para las proteínas que resultaron exclusivas de monocultivo, de cocultivo 3D y las proteínas compartidas. Los grupos resultantes se muestran en función del promedio del valor de enriquecimiento (fold enrichment), los detalles de estos subgrupos se muestran en el anexo III. Los procesos celulares incluyen: el metabolismo de tetrahydrofolato (THF), traducción, procesos virales, procesos mitocondriales, procesos inmunológicos, splicing y degradación del ARN, división celular, transporte mediado por vesículas entre Golgi-retículo endoplásmico y membrana plasmática, señalización, replicación del ADN, transcripción, diferenciación, hipoxia, metabolismo de aminoácidos, supervivencia, degradación de proteínas y otros.

Como se observa en la Figura 22, el proceso celular exclusivo del monocultivo más sobresaliente es el “Metabolismo de tetrahydrofolato (THF)”, mientras que para el cocultivo 3D son los procesos de “Supervivencia” y “Degradación de proteínas dependiente de ubiquitinación”. Las proteínas relacionadas con el transporte vesicular y la transducción de señales intracelulares (señalización) están más representadas en cocultivo que en monocultivo (Figura 22). En cambio, los procesos de traducción, procesos virales e inmunológicos están más representados en monocultivo que en cocultivo (Figura 22).

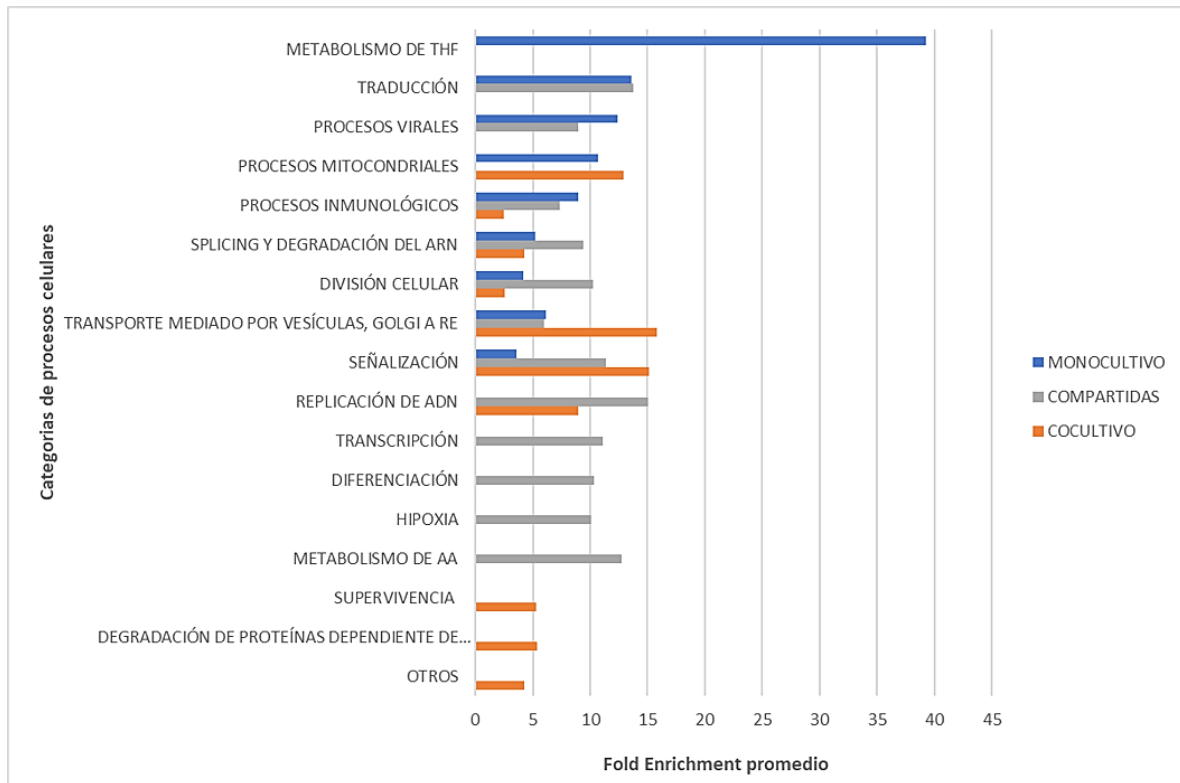


Figura 22. Gráfica de procesos celulares en función del factor de enriquecimiento (Fold Enrichment promedio). Se puede observar que existen procesos celulares exclusivos para la condición de monocultivo, cocultivo y las compartidas.

Se observaron diferencias en los términos GO que se asignaron a las listas de proteínas exclusivas de “monocultivo” y de “cocultivo 3D”. Una manera alternativa de mostrar esas diferencias es con un diagrama circular en el que se muestren los porcentajes de términos GO que se asignaron manualmente a las categorías funcionales de la Figura 22. En las Figuras 23 y 24 se muestran dichos diagramas, se incluyeron los 27 términos GO con menor valor P. Se puede observar que hay similitudes en el número de términos GO asignados a las categorías “Procesos mitocondriales”, “Procesos inmunológicos”, “Splicing y degradación del ARN”, “División celular” y “Transporte mediado por vesículas entre Golgi-retículo endoplásmico y membrana plasmática” (Figuras 23 y 24). En este análisis las proteínas detectadas exclusivamente en cocultivo se asignaron a un mayor número de términos GO asociados a “Señalización (transducción de señales)”, “Supervivencia”, “Replicación del ADN” y “Degradación de proteínas dependiente

de ubiquitinación” (Figura 24). Por otro lado, las proteínas detectadas exclusivamente en monocultivo se asignaron a un mayor número de términos GO asociados al “Metabolismo de tetrahidrofolato” y a “Traducción”.

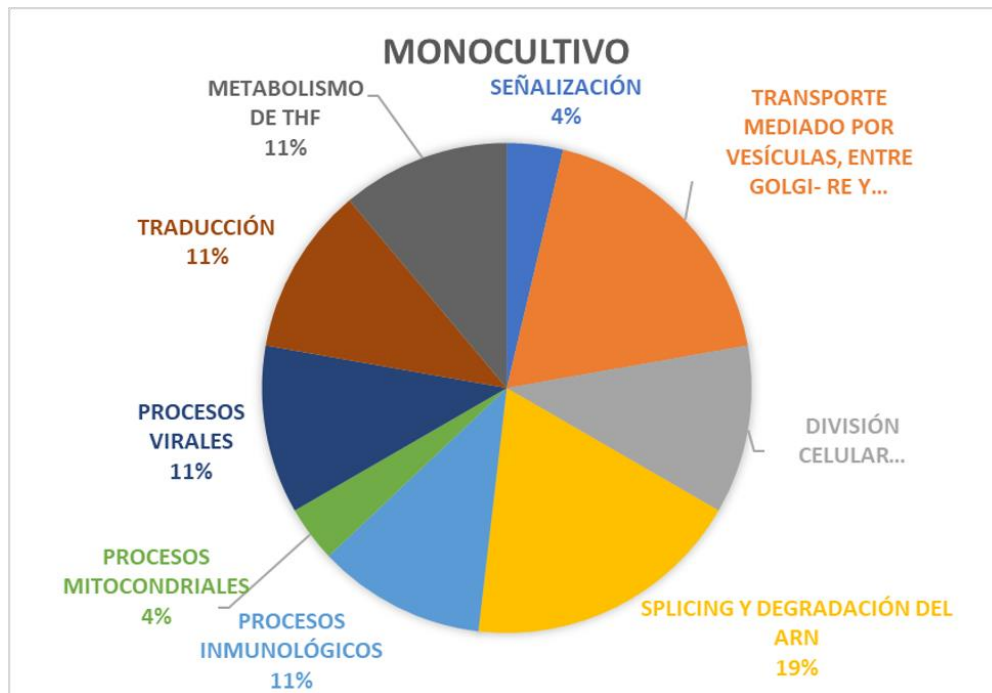


Figura 23. Porcentaje de procesos celulares presentes en monocultivo de células CCRF-CEM.THF, Tetrahidrofolato; RE, retículo endoplásmico.

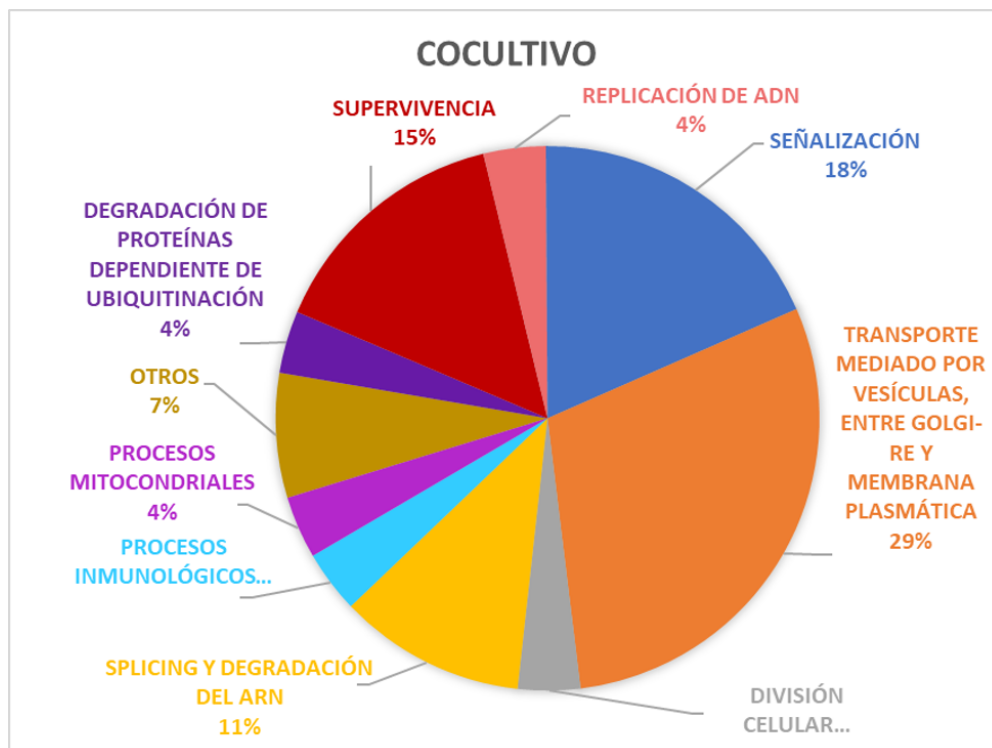


Figura 24. Porcentajes de procesos celulares presentes en cocultivo 3D de células CCRF-CEM. RE, retículo endoplásmico.

11) ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los modelos de estudio de leucemia *in vitro* ayudan al estudio de la fisiología celular de las células tumorales, incluyendo la acción de los fármacos quimioterapéuticos y la producción de proteínas, entre otros procesos. El monocultivo es un modelo celular sencillo de realizar, puede generarse en grandes cantidades y se ha empleado para realizar pruebas de medicamentos (12).

En la presente investigación, se llevó a cabo una prueba de sensibilidad en una línea celular de LLA-T denominada CCRF-CEM en monocultivo para el fármaco vincristina durante 24 h, y se obtuvo la IC₅₀= 6 nM (Tabla 10). Resultados similares se han reportado previamente por Guzmán-Ortiz (13), quien, tras 48 h de exposición, obtuvo una IC₅₀ de 10nM (13). Además, Díaz-Sánchez(15) realizó misma prueba del presente estudio a 24 h, y también informó una IC₅₀ de 6 nM. Es importante señalar que las diferencias con el informe de Guzmán-Ortiz podrían atribuirse a diferencias en los métodos de conteo celular y a los tiempos de exposición al fármaco. En su experimento, Guzmán-Órtiz usó la técnica de MTT que mide la función mitocondrial y supervivencia celular. En contraste, en el estudio de Díaz y así como en el presente trabajo, se empleó la tinción de azul de tripán, un colorante derivado de la toluidina que de acuerdo con Piccinini Felipe es bastante preciso para evaluar la viabilidad, pero tiene sus limitaciones ya que su efecto toxico sobre las células limita el recuento a un breve periodo de tiempo y la posibilidad de falsos negativos en células que han iniciado la apoptosis y aún mantienen intacta su membrana, el recuento manual requiere mucho tiempo y depende del operador(76). Por lo que no se descarta que nuestros datos estén sesgados ligeramente hacia la sobreestimación de la viabilidad celular.

Sin embargo, se decidió usar el conteo con azul de tripán debido que es asequible y fácil de empleo con respecto al método MTT, mediciones basadas en este han demostrado que debe optimizarse ya que los resultados dependerán del tipo y la cantidad de células, del tiempo de incubación, los tratamientos con fármacos y las interacciones químicas que puedan producirse(77).

A pesar de su sencillez, el monocultivo, no puede reproducir las interacciones intercelulares que se generan en el microambiente tumoral de la médula ósea, que son importantes debido a que se ha demostrado que las células leucémicas sobreviven mucho más sí se cocultivan con células del estroma.

El modelo de cocultivo 2D permite las interacciones célula-célula, la exposición homogénea de las células al medio, es económico y sencillo de manipular, es muy utilizado para realizar pruebas a distintos fármacos.

Al realizar la prueba de sensibilidad para el cocultivo 2D de células CCRF-CEM y OP-9, expuestas a vincristina durante 24 h, se obtuvo una IC₅₀ de 15 nM, por lo que en comparación con el monocultivo (IC₅₀=6 nM), en este modelo se protegen las células leucémicas con un factor de 2.5 veces.

La protección del cocultivo 2D es consistentemente apoyada por investigaciones similares. Un estudio de Garrido Sara cocultivó células de leucemia mieloide aguda extraídas de pacientes, con células HS5; línea celular de células estromales de médula ósea humanas. Las sometió a diferentes concentraciones de fármacos, encontró una protección de hasta 5 veces para citarabina y de 2 a 8 veces para daunorrubicina. Este estudio destacó el contactor directo entre los tipos celulares y su efecto inhibitorio en la apoptosis, además de su influencia en la proliferación y viabilidad celular lo que atribuyó a varias moléculas de adhesión como VLA-4, VLA-5, CD56, LFA 1 y CD34 (14).

Konopleva, en su investigación con células de leucemia promielocítica aguda HL-60 cocultivadas con células estromales de médula ósea de ratón MS-5, demostró que al someterlas a una concentración de citarabina que induce apoptosis masiva, ésta se redujo en un 50 %, indicando un factor de protección de 2 veces. Por lo que resaltó la capacidad de las células estromales para favorecer la supervivencia de las células leucémicas (16).

Mientras que Nervi cocultivó, en un modelo 2D, células de leucemia promielocítica aguda con células estromales de médula ósea M2-10B4 y al exponerlas a citarabina y daunorrubicina, encontró una protección de 3 y 2.3 veces respectivamente.

Además de la reducción de la apoptosis, destacó la influencia del contacto celular como de los factores solubles en la protección brindada (78).

En conjunto, estos estudios apoyan la protección que existe en el cocultivo de células estromales con células leucémicas, lo que favorece su supervivencia ante tratamientos quimioterapéuticos, Esta protección puede atribuirse a los factores solubles y a el contacto directo entre células, lo que probablemente explique nuestros resultados.

No obstante, diferentes investigaciones han demostrado que el cocultivo 2D es inferior al 3D para reproducir la fisiología *in vivo*, además de que su estructura bidimensional altera la forma de las células, lo que lleva al aplanamiento de las células produciendo un cambio en el citoesqueleto interno y la forma nuclear, modificando la expresión de genes y proteínas (79). Actualmente, el cocultivo 3D es de los mejores modelos *in vitro* disponibles para imitar el microambiente natural, ya que presenta interacciones célula-célula y célula-matriz, exposición heterogénea al medio y células menos sensibles al tratamiento con fármacos (79,80).

Al realizar nuestro experimento de sensibilidad a vincristina en cocultivo 3D, tras 24 h de exposición, se obtuvo una IC50 de 51 nM, el factor de protección fue de 8.5 veces en comparación con el monocultivo (IC50=6 nM). Comprobando que las células se vuelven menos sensibles al tratamiento, siendo una cuestión preocupante para el conseguir éxito en el tratamiento de esta enfermedad, resultados similares han sido obtenidos por Aljitiawi, quien en sus experimentos cocultivó diferentes líneas de células leucémicas con células estromales nuBM-MSK en modelos 2D y 3D (andamio sintético), comparando la respuesta al fármaco doxorubicina y observó que las células leucémicas cocultivadas en forma 3D tenían mayor resistencia a los agentes quimioterapéuticos en comparación de las células en cocultivo 2D. Demostró que la protección ofrecida por los factores solubles se ve abatida a mayores concentraciones de fármaco por lo que refuerza la teoría de que la expresión de las uniones intercelulares de N-caderina puede desarrollar un papel en la quimiorresistencia de las células leucémicas, que ha sido reconocida como un

componente importante del nicho de las células madre hematopoyéticas y su regulación(10).

Bray y colaboradores, compararon la resistencia a los quimioterapéuticos daunorrubicina y citarabina en los modelos de cocultivo 2D, 3D y uno de tricultivo (células estromales, células endoteliales vasculares, y células de leucemia mieloide aguda)(11). En ese trabajo se reportó la mayor protección conferida por el cocultivo 3D sobre el 2D, pero ambos modelos se ven superados por el modelo de tricultivo que propuso Bray, no obstante, nada sustituye el modelo de xenotransplante.

El monocultivo, cocultivo 2D y cocultivo 3D realizados en esta investigación tienen la limitación de usar líneas celulares. Por ello, algunos autores usan células primarias, pero es difícil reproducirlas en grandes cantidades y mantenerlas por periodos grandes de tiempo. A causa de que tienen un número limitado de generaciones por lo que cuando una clona ha producido suficientes células estas estarán cercanas a la senescencia(40)

Hasta el momento no se ha reportado estudios proteómicos de cocultivo 3D de un modelo experimental de LLA-T. En este trabajo se logró escalar el cocultivo 3D y se optimizó la metodología para realizarle un análisis proteómico. Logramos identificar 1157 proteínas, si bien es una cantidad considerable que nos puede dar información sobre los procesos celulares involucrados en la comunicación intercelular en el microambiente, la cantidad de identificaciones puede aumentar con el uso de la técnica de fraccionamiento de péptidos, que además de separar mezclas complejas, facilita el mapeo de modificaciones postraduccionales (81). Actualmente en el laboratorio se está trabajando con este fraccionamiento y se espera alcanzar cerca de 3000 proteínas identificadas de acuerdo con las indicaciones del proveedor del espectrómetro de masas (Bruker Daltonics). Cabe mencionar que actualmente existen los espectrómetros de tipo Orbitrap los cuales tienen la máxima sensibilidad y alcanzan a identificar entre 5000 y 6000 proteínas.

Esta investigación halló para CCRF-CEM en monocultivo 1157 proteínas, mientras que en cocultivo 3D 1108 proteínas. Para conocer los procesos biológicos en los

que participaban, se empleó la herramienta bioinformática DAVID (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>), en donde se identificaron categorías funcionales dando 129 términos GO para monocultivo y 64 para cocultivo 3D. Solo se seleccionaron 27 debido a que representan las categorías más relevantes y significativas en términos de procesos biológicos que posteriormente se subclasificaron en categorías generales de acuerdo a los procesos celulares en los que participaban, se obtuvo la Figura 21, en la que se puede apreciar que algunos procesos son exclusivos o están más representados en la condición de monocultivo, y otros en la de cocultivo 3D. La categoría más sobresaliente exclusiva de monocultivo es el (tetrahidrofolato), mientras que la categoría exclusiva más sobresaliente de cocultivo 3D es la del proceso de supervivencia.

El metabolismo del tetrahidrofolato está relacionado con la donación de grupos de un átomo de carbono (metilo, hidroximetilo, carbonilo o carboxilo) para diversas vías biosintéticas (síntesis de aminoácidos, bases nitrogenadas, etc)(82). Nuestros resultados sugieren que algunas de esas vías están más activas en las células CCRF-CEM en monocultivo que en cocultivo. Sin embargo, no se observan grandes diferencias en la categoría de “División celular” por lo que esas probables biosíntesis dependientes del tetrahidrofolato pudieran estar relacionadas con síntesis de metabolitos diferentes a las bases nitrogenadas ya que para la división celular se demandan grandes cantidades de DNA y RNA. Además de que algunas investigaciones sugieren que la enzima CH2-THF Deshidrogenasa 2, esta expresada de manera más diferencial en el cáncer en comparación con células normales, y la supresión de esta disminuye la carga de leucemia y prolonga la supervivencia en modelos de leucemia en ratones y en un modelo de xenoinjerto humano(83).

Interesantemente, el grupo “Supervivencia” está más representado en cocultivo 3D que en monocultivo. Este resultado coincide con lo reportado por Carlini (20) quien comparó el proteoma de células mononucleares derivadas de la médula ósea de pacientes con mieloma múltiple y éstos mismos tipos de células derivadas de individuos sanos. Encontró que las proteínas reguladas a la baja en las muestras

de pacientes tenían funciones que estaban relacionadas con la respuesta inmunitaria innata y con la muerte celular (20). Probablemente esa inhibición de los procesos relacionados con muerte celular se deba a la interacción con el microambiente tumoral en la médula ósea (50,51).

En cuanto a la inhibición de la apoptosis y el aumento en la supervivencia celular nuestros resultados concuerdan con el estudio proteómico de Liu en donde el cocultivo (2D) de células de leucemia mieloide aguda (líneas celulares KG_{1a} o SKM-1 y células de pacientes) con células estromales de médula ósea (HS-5 y HS27a), evidenció que las células leucémicas en cocultivo indujeron la supervivencia celular, adhesión celular, degranulación de neutrófilos, la homeostasis redox, movimiento celular y señalización (22).

El grupo “Supervivencia” de la Figura 21 contiene los términos GO: *negative regulation of apoptotic process* y *DNA repair*. Entre los mecanismos que probablemente activan estos procesos están la interacción entre VCAM-1 presente en las células estromales y la integrina VL-4 en células leucémicas que conduce a regulación positiva de la molécula anti apoptótica MCL1 (17). Con respecto a la reparación del ADN, las investigaciones indican que produce resistencia a los fármacos que causan daños en el mismo, por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y los mecanismos por recombinación homologa (RRM), por lo que para hacer eficaz esos tratamientos se debe inhibir los sistemas de reparación del ADN, para sensibilizar a las células (84) . Interesantemente, la convivencia cercana de los tipos celulares CCRF-CEM y OP-9 induce en las células leucémicas los procesos de reparación de daño al DNA.

El proceso de señalización intracelular está más enriquecido en cocultivo 3D que en monocultivo, en este grupo sobresale la categoría *small GTPase mediated signal transduction*. De acuerdo con Sánchez Aguilera (85), las GTPasas Rho representan una familia que tiene funciones clave en la señalización intracelular y regulan la morfología, la motilidad y la proliferación celular. Además, la activación de RhoH GTPasa afecta la leucemogenesis de células B (85).

Otro proceso celular más representado en cocultivo que en monocultivo, es la degradación de proteínas dependiente de ubiquitinación. Este resultado coincide con lo reportado por Saha (21) quien realizó un estudio proteómico con células leucémicas obtenidas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda y las comparó con linfocitos obtenidos de personas sanas. Determinó que las proteínas sobreexpresadas en las células de LLA-B estaban relacionadas con la respuesta al estrés, las chaperonas y las asociadas con la degradación proteasómica. La vía de la ubiquitina-proteasoma es responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas reguladoras que controlan la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN, juega un rol importante en el control de la homeostasis celular normal. Las células tumorales tienen niveles elevados de la actividad de la proteasoma, el cual podría estar degradando algunas ciclinas para que las células cancerígenas no dejen de dividirse (86,87).

Se ha señalado las coincidencias de nuestra investigación con otros estudios proteómicos de diferentes tipos de cáncer hematopoyético, pero también encontramos diferencias, por ejemplo, nosotros no encontramos la inducción de la homeostasis redox como Saha y Liu (21,22), o la inducción del metabolismo energético para producir ATP como Saha y Carlini (20,21). Estas diferencias probablemente estén relacionadas con el hecho de que se analizaron diferentes patologías (mieloma múltiple, leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica aguda), diferentes aproximaciones experimentales (células de pacientes, voluntarios sanos, diferentes líneas celulares), además de que usan otros tipos de espectrómetros de masas (20–22).

La principal limitación para obtener conclusiones biológicas de nuestro estudio es que solo se realizó una réplica biológica. Sin embargo, nuestro principal objetivo fue el establecimiento de un modelo experimental para realizar análisis proteómicos y, en este sentido, el sistema de cocultivo 3D se estableció con éxito. Con el uso de nuestro modelo, se pueden realizar futuros análisis proteómicos para entender mejor la fisiología de las células leucémicas en el contexto del microambiente

tumoral y pueda ayudar a establecer un mejor esquema de tratamiento para los pacientes.

12) CONCLUSIÓN

Finalmente, este estudio se planteó establecer un modelo de microambiente tumoral para realizar análisis proteómicos por espectrometría de masas, primero se logró generar cocultivos 3D con líneas celulares (CCRF-CEM y OP-9), posteriormente con estos cocultivos se determinó y comparó la sensibilidad de las células leucémicas (CCRF-CEM) en monocultivo, cocultivo 2D y 3D. Los resultados confirman la protección conferida por las células estromales mesenquimales (OP-9) ante el fármaco quimioterapéutico vincristina. (12,16,18,75)

Se logro escalar el cocultivo hasta tener biomasa suficiente de cada línea celular para los análisis proteómicos. Permitiendo comparar el proteoma de la línea celular CCRF-CEM en monocultivo y cocultivo 3D.

Como ya se mencionó anteriormente, la principal limitación de este estudio es que solo se obtuvo una réplica biológica, sin embargo, puede ser de utilidad para para realizar futuros análisis donde se podría implementar nuevas técnicas como el fraccionamiento de péptidos para aumentar la identificación de proteínas.

13) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muñoz-Aguirre P, Lajous M. Leucemia Infantil [Internet]. En Rivera J, Barrientos T, Oropeza C. Síntesis sobre Políticas de Salud. Propuesta basada en evidencias. 2021. 123–128 p. Disponible en: https://www.insp.mx/resources/images/stories/2022/docs/220118_Sintesis_sobre_politicas_de_salud.pdf
2. Madhusoodhan PP, Carroll WL, Bhatla T. Progress and Prospects in Pediatric Leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2016 Jul;46(7):229-241. doi: 10.1016/j.cppeds.2016.04.003.
3. Ko RH, Ji L, Barnette P, Bostrom B, Hutchinson R, Raetz E, Seibel NL, Twist CJ, Eckroth E, Sposto R, Gaynon PS, Loh ML. Outcome of patients treated for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a Therapeutic Advances in Childhood Leukemia Consortium study. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):648-54. doi: 10.1200/JCO.2009.22.2950.
4. Nguyen K, Devidas M, Cheng SC, La M, Raetz EA, Carroll WL, Winick NJ, Hunger SP, Gaynon PS, Loh ML; Children's Oncology Group. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia*. 2008 Dic;22(12):2142-50. doi: 10.1038/leu.2008.251.
5. Sen S, Zhou H, Ripmaster T, Hittelman WN, Schimmel P, White RA. Expression of a gene encoding a tRNA synthetase-like protein is enhanced in tumorigenic human myeloid leukemia cells and is cell cycle stage- and differentiation-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6164-9. doi: 10.1073/pnas.94.12.6164.
6. Lassaletta Atienza A. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral*. 2016;20(6):380–9.

7. Grigoropoulos NF, Petter R, Van 't Veer MB, Scott MA, Follows GA. Leukaemia update. Part 1: diagnosis and management. *BMJ*. 2013 Mar 28;346:f1660. doi: 10.1136/bmj.f1660.
8. Introduction to Cell Culture | Thermo Fisher Scientific - MX [Internet]. [2020 Jun 8]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
9. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014 May;12(4):207-18. doi: 10.1089/adt.2014.573.
10. Aljitawi OS, Li D, Xiao Y, Zhang D, Ramachandran K, Stehno-Bittel L, Van Veldhuizen P, Lin TL, Kambhampati S, Garimella R. A novel three-dimensional stromal-based model for in vitro chemotherapy sensitivity testing of leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 2014 Feb;55(2):378-91. doi: 10.3109/10428194.2013.793323.
11. Bray LJ, Binner M, Körner Y, von Bonin M, Bornhäuser M, Werner C. A three-dimensional ex vivo tri-culture model mimics cell-cell interactions between acute myeloid leukemia and the vascular niche. *Haematologica*. 2017 Jul;102(7):1215-1226. doi: 10.3324/haematol.2016.157883.
12. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. 2018 Jun;14(4):910-919. doi: 10.5114/aoms.2016.63743.
13. Guzmán-Ortiz, Aparicio-Ozores G, Valle-Rios R, Medina-Contreras O, Patiño-López G, Quezada H. Proteomic changes in a childhood acute lymphoblastic leukemia cell line during the adaptation to vincristine. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2017 May-Jun;74(3):181-192. doi: 10.1016/j.bmhmx.2017.03.005.

14. Garrido SM, Appelbaum FR, Willman CL, Banker DE. Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). *Exp Hematol*. 2001 Apr;29(4):448-57. doi: 10.1016/s0301-472x(01)00612-9.
15. Díaz-Sánchez H. Estudios de los cambios en el proteoma relacionados con resistencia a fármacos en la línea celular CCRF-SB de leucemia linfoblástica aguda ante la exposición súbita a vincristina [Internet]. [México]: UNAM; 2018. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2018/junio/0775645/Index.html>
16. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia*. 2002 Sep;16(9):1713-24. doi: 10.1038/sj.leu.2402608.
17. Scielzo C, Ghia P. Modeling the Leukemia Microenvironment In Vitro. *Front Oncol*. 2020 Dec 17;10:607608. doi: 10.3389/fonc.2020.607608.
18. Alsagaby SA, Alhumaydhi FA. Proteomics insights into the pathology and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Saudi Med J*. 2019 Abr;40(4):317-327. doi: 10.15537/smj.2019.4.23598.
19. Johnston HE, Carter MJ, Cox KL, Dunscombe M, Manousopoulou A, Townsend PA, Garbis SD, Cragg MS. Integrated Cellular and Plasma Proteomics of Contrasting B-cell Cancers Reveals Common, Unique and Systemic Signatures. *Mol Cell Proteomics*. 2017 Mar;16(3):386-406. doi: 10.1074/mcp.M116.063511.
20. Fernando RC, de Carvalho F, Leme AFP, Colleoni GWB. Tumor Microenvironment Proteomics: Lessons From Multiple Myeloma. *Front Oncol*. 2021 Mar 23;11:563384. doi: 10.3389/fonc.2021.563384.
21. Saha S, Banerjee S, Banerjee D, Chandra S, Chakrabarti A. 2DGE and DIGE based proteomic study of malignant B-cells in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *EuPA Open Proteom* . 2014 Jun;3:13–26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euprot.2014.01.002>

22. Liu R, Wang Y, Li B, Wang H, Guan F, Tan Z, Li X. Screening differentially expressed proteins from co-cultured hematopoietic cells and bone marrow-derived stromal cells by quantitative proteomics (SILAC) method. *Clin Proteomics*. 2019 Jul 18;16:32. doi: 10.1186/s12014-019-9249-x.
23. Ortiz-Hidalgo C. Notas sobre la historia de la leucemia. *Patología Revista latinoamericana* Volumen 51, núm. 1, enero-marzo. 2013 . Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patrevlat/rlp-2013/rlp1311.pdf>
24. Leukemia. American Society of Hematology.org [Internet]. Disponible en: <https://www.hematology.org/education/patients/blood-cancers/leukemia>
25. Leucemia - Síntomas y causas - Mayo Clinic [Internet]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/leukemia/symptoms-causes/syc-20374373>
26. Zuckerman T, Rowe JM. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000Prime Rep*. 2014 Jul 8;6:59. doi: 10.12703/P6-59.
27. Ortega MSA, Osnaya OML, Rosas BJV. Leucemia linfoblástica aguda. *Med Int Mex*. 2007;23(1):26-33.
28. ¿Qué es la leucemia mieloide aguda?. American Cancer Society [Internet]. Disponible en: <http://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-mieloide-aguda/acerca/que-es-leucemia-mieloide-aguda.html>
29. Centro Nacional para la salud de la infancia y adolescencia [Internet]. Jun 2023. p. 1–9 *Cancer Infantil*. Disponible en: <https://www.adano.es/cancer-infantil/>
30. Zhou Y, You MJ, Young KH, Lin P, Lu G, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia. *Hum Pathol*. 2012 Sep;43(9):1347-62. doi: 10.1016/j.humpath.2012.02.004.

31. Protocolo de la atención para la leucemia linfoblástica. Guía clínica y esquema de tratamiento. Seguro Popular [Internet]. 2000;53:160. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/dgpfs/micsitio/ptcia/recursos/LEUCEMIA.pdf>
32. Huang FL, Liao EC, Li CL, Yen CY, Yu SJ. Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments. *Oncol Lett*. 2020 Jul;20(1):448-454. doi: 10.3892/ol.2020.11583.
33. Hospital Infantil de México Federico Gómez. Protocolo de manejo para pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica no tratados previamente. Secretaría de Salud. Disponible en: <http://www.himfg.edu.mx/descargas/documentos/planeacion/guiasclinicasHIM/LeuAguLinfoblastica.pdf>
34. Beléndez Cristina, Cela Elena, Galarón Paloma. Punción-aspiración de médula ósea. *An Pediatr*. 2007;5(1):52-4. Disponible en: <https://www.elsevier.es/index.php?p=revista&pRevista=pdf-simple&pii=S1696281807741082&r=51>
35. Riley RS, Hogan TF, Pavot DR, Forysthe R, Massey D, Smith E, Wright L Jr, Ben-Ezra JM. A pathologist's perspective on bone marrow aspiration and biopsy: I. Performing a bone marrow examination. *J Clin Lab Anal*. 2004;18(2):70-90. doi: 10.1002/jcla.20008.
36. Santillán JD. Técnica de aspirado de médula ósea en niños [Tesis de Especialidad]. Universidad Nacional Autónoma de México. Universidad Nacional Autónoma de México; 2014. Disponible en: http://189.203.43.34:8180/bitstream/20.500.12103/98/1/tesis2014_03.pdf
37. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014 Nov 1;6(1):e2014073. doi: 10.4084/MJHID.2014.073.

38. Juárez-Velázquez R, Pérez-Vera P. Citometría de flujo en la evaluación de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda. *Acta Pediatr Mex.* 2012;33 (4):198-206.
39. Aguilar-Hernández M, Fernández-Castillo G, Núñez-Villegas NN, Pérez-Casillas RX, Núñez-Enríquez JC. Principales causas de mortalidad durante la fase de inducción a la remisión en los pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda [Leading causes of death during the induction therapy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2017 May-Jun;55(3):286-291. Spanish. PMID: 28440981.
40. Beltrán-Vargas N, González C. Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos. Cuajimalpa, Ciudad de México.UAM; 2016.
41. Kim YE, Jeon HJ, Kim D, Lee SY, Kim KY, Hong J, Maeng PJ, Kim KR, Kang D. Quantitative Proteomic Analysis of 2D and 3D Cultured Colorectal Cancer Cells: Profiling of Tankyrase Inhibitor XAV939-Induced Proteome. *Sci Rep.* 2018 Sep 5;8(1):13255. doi: 10.1038/s41598-018-31564-6.
42. Betriu N, Semino CE. Development of a 3D Co-Culture System as a Cancer Model Using a Self-Assembling Peptide Scaffold. *Gels.* 2018 Ago 2;4(3):65. doi: 10.3390/gels4030065.
43. Cucchi DGJ, Groen RWJ, Janssen JJWM, Cloos J. Ex vivo cultures and drug testing of primary acute myeloid leukemia samples: Current techniques and implications for experimental design and outcome. *Drug Resist Updat.* 2020 Dic;53:100730. doi: 10.1016/j.drug.2020.100730.
44. Jiang X, Ye M, Jiang X, Liu G, Feng S, Cui L, Zou H. Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *J Proteome Res.* 2007 Jun;6(6):2287-94. doi: 10.1021/pr070056t.
45. Muller L, Fornecker L, Chion M, Van Dorsselaer A, Cianférani S, Rabilloud T, Carapito C. Extended investigation of tube-gel sample preparation: a versatile

and simple choice for high throughput quantitative proteomics. *Sci Rep.* 2018 May 29;8(1):8260. doi: 10.1038/s41598-018-26600-4.

46. Subedi P, Schneider M, Philipp J, Azimzadeh O, Metzger F, Moertl S, Atkinson MJ, Tapio S. Comparison of methods to isolate proteins from extracellular vesicles for mass spectrometry-based proteomic analyses. *Anal Biochem.* 2019 Nov 1;584:113390. doi: 10.1016/j.ab.2019.113390.
47. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *Int J Mol Sci.* 2018 Ene 18;19(1):181. doi: 10.3390/ijms19010181.
48. Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release.* 2012 Dic 10;164(2):192-204. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.045.
49. Anton D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci.* 2015 Mar 11;16(3):5517-27. doi: 10.3390/ijms16035517.
50. Tabe Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br J Haematol.* 2014 Mar;164(6):767-78. doi: 10.1111/bjh.12725.
51. Sánchez-Aguilera A, Méndez-Ferrer S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Feb;74(4):579-590. doi: 10.1007/s00018-016-2306-y.
52. Allegra A, Di Gioacchino M, Cancemi G, Casciaro M, Petrarca C, Musolino C, Gangemi S. Specialized Intercellular Communications via Tunnelling Nanotubes in Acute and Chronic Leukemia. *Cancers (Basel).* 2022 Ene 28;14(3):659. doi: 10.3390/cancers14030659.

53. Bakker E, Qattan M, Mutti L, Demonacos C, Krstic-Demonacos M. The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Mar;1863(3):414-426. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.08.003.
54. Nwajei F, Konopleva M. The bone marrow microenvironment as niche retreats for hematopoietic and leukemic stem cells. *Adv Hematol*. 2013;2013:953982. doi: 10.1155/2013/953982.
55. Dominguez PM, Romero-Ramirez H, Rodríguez AJC. Células Madre Hematopoyéticas: origen, diferenciación y función. *Rev Med UV*. 2015;15(1):29-37.
56. Crippa S, Bernardo ME. Mesenchymal Stromal Cells: Role in the BM Niche and in the Support of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Hemasphere*. 2018 Nov 16;2(6):e151. doi: 10.1097/HS9.000000000000151.
57. Dander E, Palmi C, D'Amico G, Cazzaniga G. The Bone Marrow Niche in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: The Role of Microenvironment from Pre-Leukemia to Overt Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 23;22(9):4426. doi: 10.3390/ijms22094426.
58. Congrains A, Bianco J, Rosa RG, Mancuso RI, Saad STO. 3D Scaffolds to Model the Hematopoietic Stem Cell Niche: Applications and Perspectives. *Materials (Basel)*. 2021 Jan 26;14(3):569. doi: 10.3390/ma14030569.
59. Vincristina [Internet]. 2007. Disponible en: <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/v010.htm>
60. Goodson H V, Jonasson EM. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2018;10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983186/>

61. Verrills NM, Liem NL, Liaw TYE, Hood BD, Lock RB, Kavallaris M. Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemia - An in vivo study. *Proteomics*. 2006;6(5):1681–94.
62. Salud E. Fármacos antineoplásicos (II). 2006;20(y II).
63. PubChem. Vol. 6, Biblioteca Nacional de Medicina (EE.UU.), Centro Nacional de Información Biotecnológica. 2016. p. 128 Resumen de compuestos de PubChem para CID 5978, vincristina. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vincristine>
64. Cazzulo J. De la genómica a la proteómica. En: Corrales F, Calvete J editores. *Manual de proteómica: Vol I*. España: Sociedad Española de Proteómica.
65. Pando-Robles V, Ferreira-Batista C. Proteómica hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. En: López A, Rebolledo F. editores. *Una ventana al quehacer científico del Instituto de Biotecnología-UNAM.[internet].México; 2007.* Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/273130813_Proteomica_hacia_el_entendimiento_del_lenguaje_de_proteinas
66. Pando-Robles V. El proteoma, análisis fundamental para el entendimiento de un sistema biológico [Internet]. Vol. 43, *Hypatia*. 2012. p. 25–7. Disponible en: <https://revistahypatia.org/reportajes/item/88-el-famoso-omega-3.html>
67. Torrades S. Proteómica El diseño molecular de la vida. [Internet] *OFFARM*. 2004;23:126–30. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-proteomica-13060308>
68. Fern C, Vela-amieva M, Ibarra-gonz I. Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta pediátrica de México*. 2009;30(5):258–63.
69. Pando-Robles V, Lanz-Mendoza H. La importancia de la proteómica en la salud pública. *Salud Publica Mex*. 2009;51:386–94. Disponible en:

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900004

70. Morales-Sánchez D, Gallo Ramírez LE. Plataformas de Proteómica Proteómica. “Métodos físico-Químicos en biotecnología”. Universidad Nacional Autónoma de Mexico [Internet]. 2006;52. Disponible en: <https://docplayer.es/68659178-Plataformas-de-proteomica.html>
71. Creative Proteomics. Shotgun Protein Identification Service - Creative Proteomics [Internet]. [2022 Mar 13]. Disponible en: https://www.creative-proteomics.com/services/shotgun-protein-identification.htm?gclid=CjwKCAiAsNKQBhAPEiwAB-I5zT4hoFAI1xia6Kiw5dLBwzwothlGtzjULyMLYkeaNaAcbZFx93YIMRoCGuwQAvD_BwE
72. Fei F, Joo EJ, Tarighat SS, Schiffer I, Paz H, Fabbri M, et al. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and stromal cells communicate through Galectin-3. *Oncotarget*. 2015;6(13):11378–94.
73. Sánchez-Nieto S, del Carmen-Castellanos L. Facultad de Química Departamento de Bioquímica Manual de prácticas de Bioquímica experimental. [Internet]. Greaves Fernández N, editor. México; 2019. 0–73 p. Available from: <https://bioquimica.quimica.unam.mx/wp-content/uploads/2021/06/0141-Bioquímica-experimental-Manual.pdf>
74. Bruker Daltonics. Compass DataAnalysis Version 5.0.User Manual. USA. 2017.
75. Daltonics B. Protein Scape Version 3.0. 2011;1(November).
76. Piccinini F, Tesei A, Arienti C, Bevilacqua A. Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biol Proced Online*. 2017 Jul 20;19:8. doi: 10.1186/s12575-017-0056-3.

77. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 26;22(23):12827. doi: 10.3390/ijms222312827.
78. Nervi B, Ramirez P, Rettig MP, Uy GL, Holt MS, Ritchey JK, Prior JL, Piwnica-Worms D, Bridger G, Ley TJ, DiPersio JF. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6206-14. doi: 10.1182/blood-2008-06-162123.
79. McKee C, Chaudhry GR. Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Nov 1;159:62-77. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.051.
80. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 11;22(22):12200. doi: 10.3390/ijms222212200.
81. Edelman MJ. Strong cation exchange chromatography in analysis of posttranslational modifications: innovations and perspectives. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:936508. doi: 10.1155/2011/936508.
82. Suárez de Ronderos María del Pilar. Ácido Fólico: nutriente redescubierto. *Acta méd. Costarricense [Internet]*. marzo de 2003 [citado el 28 de julio de 2022]; 45(1): 05-09. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022003000100002&lng=en.
83. Mahmood K, Emadi A. 1-C Metabolism-Serine, Glycine, Folates-In Acute Myeloid Leukemia. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Feb 26;14(3):190. doi: 10.3390/ph14030190.
84. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull*. 2017 Sep;7(3):339-348. doi: 10.15171/apb.2017.041.

85. Sanchez-Aguilera A, Rattmann I, Drew DZ, Müller LU, Summey V, Lucas DM, Byrd JC, Croce CM, Gu Y, Cancelas JA, Johnston P, Moritz T, Williams DA. Involvement of RhoH GTPase in the development of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2010 Jan;24(1):97-104. doi: 10.1038/leu.2009.217.
86. Moratilla-Rivera I, Muñoz Martín M. El sistema de ubiquitinas y la eliminación de proteínas [Internet]. *ChemEvol*. Disponible en: <https://chemevol.web.uah.es/wp/el-sistema-de-ubiquitinas-y-la-eliminacion-de-proteinas/>
87. Agneris D, Sacerio L, Dumeivy D, Sánchez G. Inhibidores del proteosoma: estrategia terapéutica en el síndrome linfoproliferativo crónico. *Acta Médica del Centro*. 2016;10(3):78–87.
88. Tomás-Sábado J, Morón A. Conocimientos de los estudiantes de enfermería ante un trasplante de progenitores hematopoyéticos.[Tesis de grado]. España; 2018. Disponible en: [https://eugdSPACE.eug.es/bitstream/handle/20.500.13002/513/Conocimientos de los estudiantes de enfermería ante un trasplante de progenitores hematopoyéticos.pdf?sequence=1](https://eugdSPACE.eug.es/bitstream/handle/20.500.13002/513/Conocimientos%20de%20los%20estudiantes%20de%20enfermería%20ante%20un%20trasplante%20de%20progenitores%20hematopoyéticos.pdf?sequence=1)
89. Zhu Y. *Mass Spectrometry Based Proteomics: Data Analysis and Applications* [Tesis de doctorado]. Stockholm, Sweden. Karolinska Institutet; 2018. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/325194244_Mass_spectrometry_based_proteomics_data_analysis_and_applications

14) ANEXOS

ANEXO I

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A VINCRIPTINA.

A continuación, se detallará como se elaboró la prueba de sensibilidad a vincristina.

Primero se preparó el medicamento, se añadieron 10 mL de agua estéril al liofilizado y se agitó como se indica en el instructivo. Se calculó la molaridad de la solución, a continuación, se describen los cálculos.

Datos:

Peso Molecular (PM) = 923.06 g/mol

Masa (m) = 1 mg = 0.001 g

Volumen (V) = 10 mL = 0.01 L

$$M = \frac{\#moles}{V(L)} = \frac{\frac{0.001 g}{923.03 g/mol}}{0.01 L} = 0.0000010833 mol/L$$

$$0.0000010833 \frac{mol}{L \left(\frac{1000 mM}{1 M} \right) \left(\frac{1000 \mu M}{1 mM} \right) \left(\frac{1000 nM}{1 \mu M} \right)} = 108330 nM$$

Se tomó 1 mL del medicamento y se adicionó en un vial. Se le etiquetó como Stock 1, del cual se tomaron alícuotas para realizar las siguientes diluciones.

Para la preparación del stock 2 (concentración de 1083 nM en un volumen de 1000 μ L) se diluyó el stock 1 empleando la fórmula de las concentraciones como se observa a continuación.

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} = \left(\frac{(1083 nM)(1000 \mu L)}{108330 nM} \right) = 9.99 \mu L$$

De acuerdo con los cálculos para obtener el stock 2 se tomó 10 μL del stock 1 y se añadieron 990 μL de medio RPMI 1640 10 % SFB.

Para la preparación del stock 3 (concentración de 100 nM en un volumen de 1000 μL), se diluyó el stock 2 empleando la fórmula de las concentraciones como se observa a continuación.

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} = \left(\frac{(100 \text{ nM})(1000 \mu\text{L})}{1083 \text{ nM}} \right) = 101.5 \mu\text{L}$$

Por lo tanto, se preparó el stock 3 con 102 μL del stock 2 y se añadió 898 μL de medio RPMI 1640 10% SFB.

Para la preparación del stock 4 (concentración de 500 nM en un volumen de 1000 μL), se diluyó el stock 2 se volvió a emplear la fórmula de las concentraciones, tal como se observa.

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} = \left(\frac{(500 \text{ nM})(1000 \mu\text{L})}{1083 \text{ nM}} \right) = 462 \mu\text{L}$$

Por lo que el stock 4 se preparó con 462 μL de stock 2 y 538 μL de medio RPMI 1640 10 % SFB.

- **MONOCULTIVO**

Se establecieron las concentraciones de fármaco vincristina para realizar la prueba de sensibilidad. Para lograrlo se hizo el cálculo del volumen que requería añadirse en cada pozo, este se obtuvo empleando la fórmula de las concentraciones, a continuación, se ejemplifica.

Para el punto 2 (concentración de 2.5 nM en un volumen final de 150 μL). se utilizó el stock 3 (100 nM) y se realizó la siguiente operación:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} = \left(\frac{(2.5 \text{ nM})(150 \mu\text{L})}{100 \text{ nM}} \right) = 3.75 \mu\text{L}$$

Cabe mencionar que el pozo tenía un volumen de 100 μL , por lo que para llegar al volumen final de 150 μL se adicionaron 4 μL de stock 3 (100 nM) y 46 μL de medio RPMI 1640 10 % SFB. Estas operaciones se realizaron hasta llegar al punto 6 (concentración de 15 nM).

Para el punto 7 cuya concentración es de 20 nM en un volumen de 150 μL se empleó el stock 4 (500 nM). La operación se realizó de la siguiente manera:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1} = \left(\frac{(20 \text{ nM})(150 \mu\text{L})}{500 \text{ nM}} \right) = 6 \mu\text{L}$$

Para obtener el volumen final de 150 μL se adicionaron 6 μL de stock 4 y 44 μL de medio RPMI 1640 10 % SFB, este cálculo también se realizó para obtener el punto 8 (40 nM).

En la siguiente Tabla se visualiza por cada punto los volúmenes que se agregaron de cada stock y de medio RPMI1640 10 % SFB, para obtener la concentración final (nM) de fármaco vincristina.

Punto	Stock 3 (μL)	Stock 4 (μL)	Medio RPMI (μL)	Concentración final (nM)
1	0		50	0
2	4		46	2.5
3	7.5		42.5	5
4	11.5		38.5	7.5
5	15		35	10
6	23		27	15
7		6	44	20
8		12	38	40

- **COCULTIVO 2D**

Para realizar el experimento se empleó el stock 3 y 4. El volumen final para cada punto fue de 250 μL .

Se realizaron los mismos cálculos del experimento de monocultivo. Por lo que a continuación solo se muestra la Tabla donde se indica por punto el volumen del stock que se empleó (μL) y el medio (μL), así como la concentración final (nM) de cada punto.

Punto	Stock 3 (μL)	Stock 4 (μL)	Medio RPMI (μL)	Concentración final (nM)
1			50	0
2	6.3		43.7	2.5
3	12.5		37.5	5
4	18.8		21.2	7.5
5		5	45	10
6		7.5	42.5	15
7		10	40	20
8		20	30	40
9		35	15	70

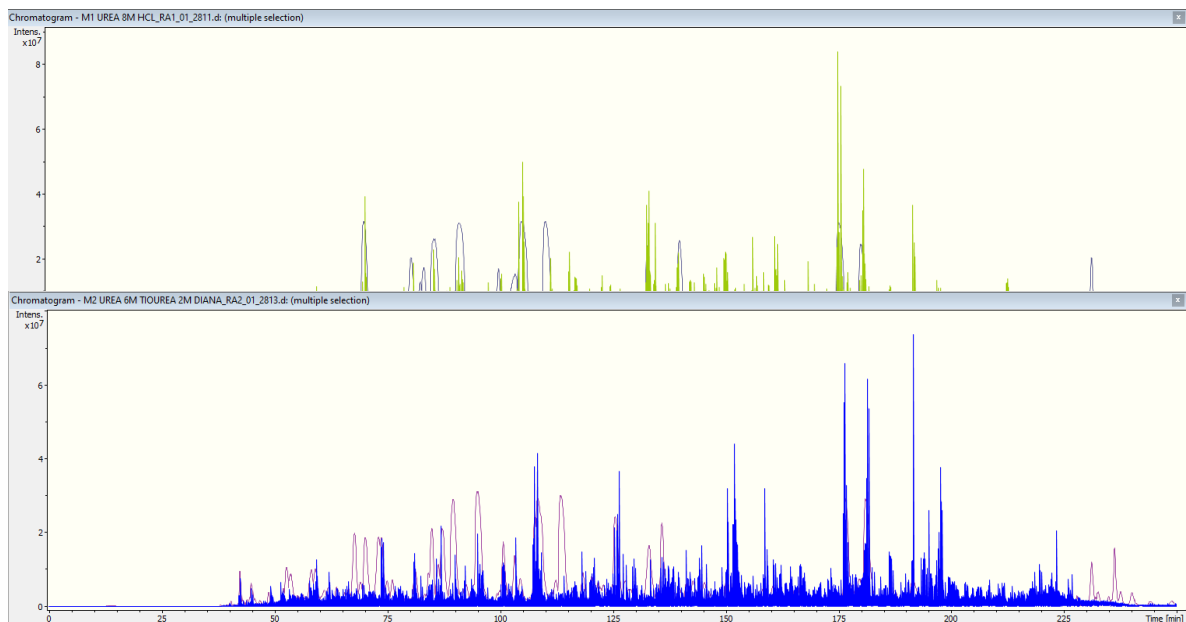
- **COCULTIVO 3D**

Para realizar el experimento se empleó el stock 3 y 4. El volumen final para cada punto fue de 250 μL . De manera similar se realizaron las operaciones del experimento de monocultivo. A continuación, se muestra la Tabla que indica por punto el volumen del stock que se empleó (μL) y el medio (μL), así como la concentración final (nM) de cada punto.

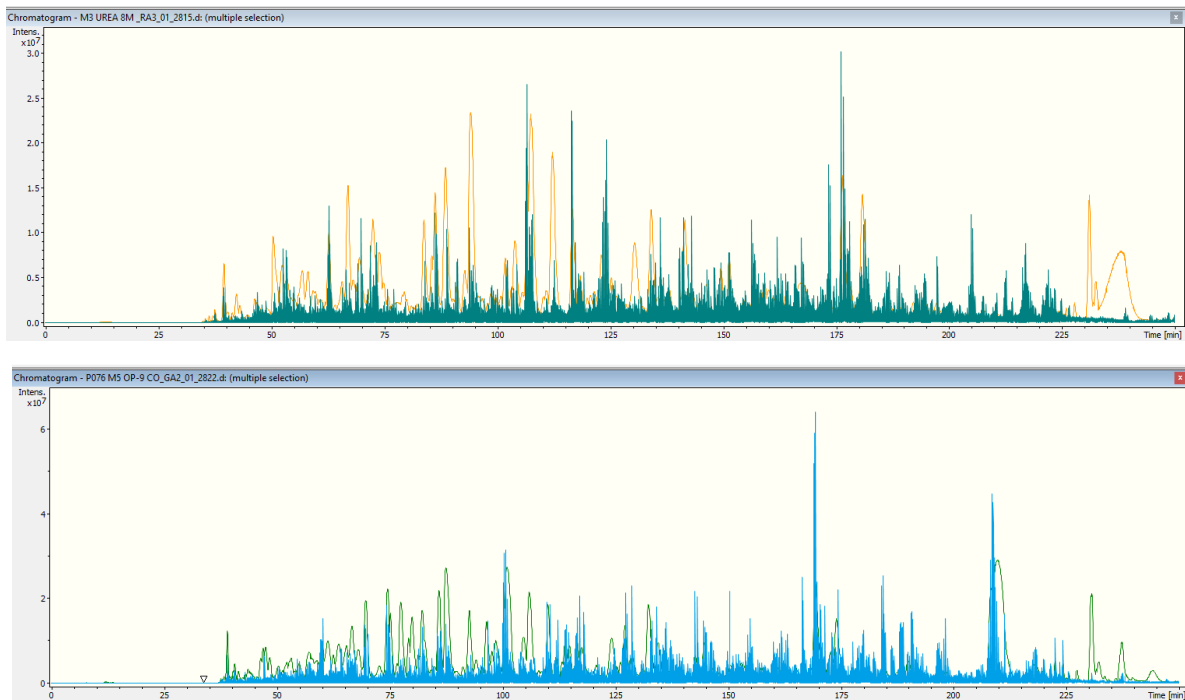
Punto	Stock 3 (μL)	Stock 4 (μL)	Medio RPMI (μL)	Concentración final (nM)
1			50	0
2	12.5		37.5	5
3	18.8		31.2	7.5
4		7.5	42.5	15
5		15	35	30
6		20	30	40
7		27.5	22.5	55
8		35	15	70
9		50	0	100

ANEXO II

CROMATOGRAMAS DE B2 Y B3



CROMATOGRAMAS DE CCRF-CEM Y OP-9 COCULTIVO 3D



ANEXO III

A) CATEGORÍAS GO Y PROCESOS CELULARES EXCLUSIVAS DE MONOCULTIVO DE CCRF-CEM

Categoría GO	Procesos celulares	P value	Fold Enrichment
GO:0046653~tetrahydrofolate metabolic process	Metabolismo de THF	0.0001	36.91
GO:0031427~response to methotrexate	Metabolismo de THF	0.0014	49.83
GO:0006729~tetrahydrobiopterin biosynthetic process	Metabolismo de THF	0.0038	31.14
GO:0046755~viral budding	Procesos virales	0.0049	27.68
GO:0019058~viral life cycle	Procesos virales	0.0001	7.14
GO:0016032~viral process	Procesos virales	0.0049	2.45
GO:0006446~regulation of translational initiation	Traducción	0.0000	25.95
GO:0006413~translational initiation	Traducción	0.0000	8.87
GO:0017148~negative regulation of translation	Traducción	0.0032	6.00
GO:0002227~innate immune response in mucosa	Procesos inmunológicos	0.0003	14.83
GO:0019731~antibacterial humoral response	Procesos inmunológicos	0.0052	7.16
GO:0019886~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class II	Procesos inmunológicos	0.0071	4.98
GO:0050852~T cell receptor signaling pathway	Procesos inmunológicos	0.0073	3.57
GO:0006626~protein targeting to mitochondrion	Procesos mitocondriales	0.0060	10.72
GO:0006401~RNA catabolic process	Splicing y degradación del RNA	0.0084	9.49
GO:0043488~regulation of mRNA stability	Splicing y degradación del RNA	0.0030	4.93
GO:0006364~rRNA processing	Splicing y degradación del RNA	0.0005	4.33
GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	Splicing y degradación del RNA	0.0003	3.82
GO:0008380~RNA splicing	Splicing y degradación del RNA	0.0084	3.48
GO:0006891~intra-Golgi vesicle-mediated transport	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.0084	9.49

Continuación del cuadro A) Categorías GO y procesos celulares exclusivas de Monocultivo de CCRF-CEM

GO:0006892~post-Golgi vesicle-mediated transport	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.0052	7.16
GO:0048208~COPII vesicle coating	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.0073	6.49
GO:0006888~ER to Golgi vesicle-mediated transport	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.0027	3.79
GO:0006457~protein folding	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.0071	3.59
GO:0000278~mitotic cell cycle	División celular	0.0004	5.19
GO:0007052~mitotic spindle organization	División celular	0.0042	4.61
GO:0051301~cell division	División celular	0.0023	2.83

B) CATEGORÍAS GO Y PROCESOS CELULARES EXCLUSIVAS DE COCULTIVO DE CCRF-CEM

Categoría (GO)	Procesos celulares	P value	Fold Enrichment
GO:1900108~negative regulation of nodal signaling pathway	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.036	53.75
GO:0006983~ER overload response	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.004	29.32
GO:0018279~protein N-linked glycosylation via asparagine	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.003	14.33
GO:0017157~regulation of exocytosis	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.044	8.96
GO:0048208~COPII vesicle coating	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.021	6.72
GO:0006890~retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.044	5.06
GO:0061024~membrane organization	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.033	4.13
GO:0006457~protein folding	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	0.008	4.07
GO:1905636~positive regulation of RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	Señalización	0.036	53.75
GO:0050796~regulation of insulin secretion	Señalización	0.027	6.14
GO:0009749~response to glucose	Señalización	0.031	5.81
GO:0006661~phosphatidylinositol biosynthetic process	Señalización	0.036	5.51

Continuación del cuadro B) Categorías GO y procesos celulares exclusivas de Cocultivo de CCRF-CEM

GO:0007264~small GTPase mediated signal transduction	Señalización	0.026	4.44
GO:0006839~mitochondrial transport	Procesos mitocondriales	0.022	12.90
GO:0046677~response to antibiotic	Supervivencia	0.033	10.40
GO:0006283~transcription-coupled nucleotide-excision repair	Supervivencia	0.030	5.89
GO:0006281~DNA repair	Supervivencia	0.044	2.72
GO:0043066~negative regulation of apoptotic process	Supervivencia	0.027	2.22
GO:0019985~translesion synthesis	Replicación del ADN	0.044	8.96
GO:0007584~response to nutrient	Otros	0.035	5.58
GO:0042493~response to drug	Otros	0.017	3.01
GO:0032436~positive regulation of proteasomal dependent protein catabolic process	Degradación de proteínas dependiente de ubiquitinación	0.038	5.37
GO:0008380~RNA splicing	Splicing y degradación de ARN	0.002	4.50
GO:0006397~mRNA processing	Splicing y degradación de ARN	0.003	4.15
GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	Splicing y degradación de ARN	0.001	4.12
GO:0051301~cell division	División celular	0.026	2.54
GO:0043312~neutrophil degranulation	Procesos inmunológicos	0.014	2.45

C) CATEGORÍAS GO Y PROCESOS CELULARES EXCLUSIVAS DE COCULTIVO DE CCRF-CEM

Categoría (GO)	Procesos celulares	PValue	Fold Enrichment
GO:0032200~telomere organization	Replicación del ADN	2.74E-31	19.97
GO:0006335~DNA replication-dependent assembly	Replicación del ADN	3.00E-31	18.15
GO:0000183~chromatin silencing at rDNA	Replicación del ADN	1.09E-31	16.81
GO:0036388~pre-replicative complex assembly	Replicación del ADN	1.71E-33	12.44
GO:0006334~nucleosome assembly	Replicación del ADN	2.28E-27	7.71
GO:0006614~SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	Traducción	1.33E-76	16.59
GO:0002181~cytoplasmic translation	Traducción	4.11E-74	16.50
GO:0006413~translational initiation	Traducción	1.01E-82	13.93
GO:0006412~translation	Traducción	4.64E-52	7.88
GO:0000184~nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	Splicing y degradación de ARN	6.42E-78	14.17
GO:0043488~regulation of mRNA stability	Splicing y degradación de ARN	9.85E-35	8.96
GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	Splicing y degradación de ARN	8.84E-54	7.31
GO:0006364~rRNA processing	Splicing y degradación de ARN	1.18E-36	7.02
GO:0060765~regulation of androgen receptor signaling pathway	Señalización	8.94E-29	13.98
GO:0060071~Wnt signaling pathway, planar cell polarity pathway	Señalización	1.87E-25	8.76
GO:0019083~viral transcription	Procesos Virales	5.85E-69	13.83
GO:0016032~viral process	Procesos Virales	2.41E-31	4.07
GO:0006521~regulation of cellular amino acid metabolic process	Metabolismo de aa	6.37E-28	12.76
GO:0010972~negative regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle	División celular	1.15E-26	11.41

Continuación del cuadro C) Categorías GO y procesos celulares exclusivas de Cocultivo de CCRF-CEM

GO:1901990~regulation of mitotic cell cycle phase transition	División celular	8.08E-25	9.10
GO:0045814~negative regulation of gene expression, epigenetic	Transcripción	1.48E-24	11.08
GO:0002479~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent	Procesos Inmunológicos	9.66E-29	10.37
GO:0043312~neutrophil degranulation	Procesos Inmunológicos	2.30E-37	4.39
GO:1902036~regulation of hematopoietic stem cell differentiation	Diferenciación	1.80E-26	10.37
GO:0045652~regulation of megakaryocyte differentiation	Diferenciación	1.80E-26	10.37
GO:0061418~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to hypoxia	Hipoxia	5.94E-26	10.08
GO:0006457~protein folding	Transporte mediado por vesículas, Golgi a RE.	5.42E-26	5.94