

**Análisis proteómico de células leucémicas cosechadas
en co-cultivo 3D de un modelo de microambiente
tumoral bajo tratamiento con citarabina**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

Biol. Exp. Karen Melissa Martínez González

DIRECTOR

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

CODIRECTOR

Dr. Héctor Quezada Pablo

Ciudad de México, junio de, 2026.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Jurado asignado

Presidente: Dr. Máximo Berto Martínez Benítez

Secretario: Dr. Héctor Quezada Pablo

Vocal: Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Plantel de adscripción

PLANTEL DEL VALLE UACM

Director

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Codirector

Dr. Héctor Quezada Pablo

LECTORES DE TESIS

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz

Posgrado de Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Posgrado de Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Máximo Berto Martínez Benítez

Posgrado de Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la tutoría del Dr. José de Jesús Olivares Trejo en colaboración con el Dr. Héctor Quezada Pablo y el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Contando con el apoyo de: fondos federales HIMFG: HIM/022/045, SECIHTI: CF-2023-I-1333, y la beca de maestría SECIHTI del posgrado en ciencias genómicas (4018667)

Dedicatoria

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Héctor Quezada Pablo, por ser un guía en este proceso difícil, sin su ayuda, paciencia, fraternidad, disposición y confianza, esto no hubiera sido posible. Gracias por creer en mis capacidades y hacerme sentir parte de su equipo en todos estos años, por celebrar mis logros, inclusive más que yo, por los regaños, las palabras de aliento y la comprensión durante todas las situaciones suscitadas que comprometían mi salud.

También me gustaría agradecer a la Mtra. Laura Ortiz Guzmán, por su inconmensurable paciencia, la disposición de enseñarme, corregirme y ayudarme en los momentos de más crisis, por ser un pilar importante en mi formación como futura investigadora y sobre todo por ser una gran amiga y cómplice.

A mis lectores que también comprenden mi comité tutorial, el Dr. Máximo Berto Martínez Benítez, la Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz y la Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez por tomarse el tiempo de darme siempre una retroalimentación, por guiarme y ayudarme con las dudas que surgieron en cada momento.

A la Dra. Erandi Pérez Figueroa por el apoyo a mi formación y el proyecto en su estadía en el HIMFG, por las enseñanzas, las palabras de ánimo y la disponibilidad de ayudarme pese al tiempo.

A mis compañeros del LIIP en especial a Pablo Arturo Álvarez Carrasco por siempre compartir su conocimiento conmigo, por las charlas que hicieron menos pesado el trabajo en el laboratorio, por acompañarme en diversos procesos difíciles, porque me llevo una joya de amistad, por las risas y los consejos, pero sobre todo por el excelente ser humano que eres, porque cuando la ciencia pesaba, cada una de tus palabras me motivaba a no rendirme.

A mis amigos: Paola Cortes, Iván Ortiz, Aimee Santiago, Nataly Pérez, Ricardo Ahumada, Marlen Bravo, Danna Aguirre y Luz Ibáñez por acompañarme en esta travesía, por su amor que me sostuvo, por la ayuda incondicional que siempre me ofrecieron y las risas que me devolvieron a la vida."n" veces.

Por último, pero no menos importante, a mis compañeros del laboratorio 4, por escucharme en los seminarios, por sus sugerencias y su disposición a ayudarme, también al Dr. José de Jesús Olivares Trejo por el apoyo brindado

A mi mamá, Mercedes González Galván, y a mi papá, Jorge Martínez García, por apoyarme siempre en todas las decisiones que he tomado, especialmente en las profesionales.

A mis hermanas, Hashely y Abel, por animarme durante las madrugadas y hacerme reír cuando sentía que no podía seguir adelante.

A Dios, porque cuando mis fuerzas faltaban, fueron las tuyas las que me sostuvieron.

ÍNDICE

RESUMEN	13
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	15
1.1 ¿Qué es la leucemia?	15
1.2 Clasificación de la leucemia	15
1.3 Leucemia linfoblástica aguda	16
1.3.1 Leucemia linfoblástica aguda tipo B	17
1.3.2 Leucemia linfoblástica aguda tipo T	17
1.4 Epidemiología de la leucemia	18
ANTECEDENTES PARTICULARES	20
2.1 Etiología en leucemia linfoblástica aguda tipo T	20
2.2 Rasgos clínicos de leucemia linfoblástica aguda	21
2.3 Diagnóstico y tratamiento de leucemia linfoblástica aguda	22
2.4 Citarabina como fármaco contra la leucemia linfoblástica aguda	24
2.5 Cultivo celular como método de estudio de la leucemia linfoblástica aguda	26
2.6 Cultivos 3D	27
2.7 Microambiente tumoral	28
2.8 Sistema inmune	29
2.9 Células T	30
2.9.1 Evasión del sistema inmune	31
HIPÓTESIS	34
JUSTIFICACIÓN	34
Objetivo general	34
Objetivos particulares	34
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	35
MATERIALES Y MÉTODOS	35
7.1. Cultivo Celular	35
7.1.2 Generación del Co-cultivo 3D	35
7.2. Exposición a citarabina y evaluación de viabilidad celular	36
7.3. Producción de biomasa para análisis proteómico	36
7.4. Extracción y cuantificación de proteínas por turbidimetría	37
7.5 Reducción y alquilación de proteínas	37

7.6 Digestión enzimática de proteínas	37
7.7 Desalado de péptidos	38
7.8 Fraccionamiento y análisis de péptidos	38
7.8.1 Identificación y cuantificación de proteínas.....	39
7.8. Análisis bioinformático y estadísticos.....	39
RESULTADOS.....	40
8.1 Viabilidad de células en monocultivo	40
8.2 Generación de células bajo 4 condiciones: para análisis proteómicos,	44
8.3 Análisis global de los perfiles proteómicos	44
8.4 Análisis de datos por efecto de las células estromales	46
8.5 Análisis de datos por efecto del fármaco	47
8.6 Efecto del fármaco en células de co-cultivo	50
8.6 Perfil proteómico de monocultivos con citarabina	55
8.7 Perfil proteómico de la presencia del fármaco.	59
8.8 Integración de modelos biológicos propuestos	60
8.9 Acoplamiento molecular.....	64
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	74
PERSPECTIVAS.....	74
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: preparación de buffer de elución	38
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Distribución global de la incidencia de los principales tipos de leucemia.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2 Mecanismo de transporte, activación intracelular y acción citotóxica de la citarabina</i>	<i>26</i>
<i>Figura 3 Viabilidad de células leucémicas (CCRF-CEM) en monocultivo</i>	<i>40</i>
<i>Figura 4 Viabilidad celular.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 5 Viabilidad del esferoide 3D.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 6 Morfología del esferoide 3D en monocultivos y co-cultivos</i>	<i>43</i>
<i>Figura 7 Pureza de las células CCRF-CEM</i>	<i>43</i>
<i>Figura 8 Diagrama de Venn de las proteínas totales en diferentes condiciones experimentales</i>	<i>44</i>
<i>Figura 9 Visión general del agrupamiento del conjunto total de proteínas identificadas en las cuatro condiciones</i>	<i>45</i>
<i>Figura 10 Diagrama de componentes principales (PCA) de las cuatro condiciones en monocultivos y co-cultivos tratados y no tratados con citarabina</i>	<i>46</i>
<i>Figura 11 Gráfica volcano plot por efecto del fármaco.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 12 Mapa de calor por efecto del fármaco</i>	<i>48</i>
<i>Figura 13 Agrupación general de las proteínas por ausencia o presencia del fármaco</i>	<i>49</i>
<i>Figura 14 Diagrama volcano plot de las condiciones de (co-cultivos y monocultivos con citarabina) vs (co-cultivos y monocultivos sin citarabina).</i>	<i>50</i>
<i>Figura 15 Visualización general de las proteínas en co-cultivos con citarabina y sin citarabina</i>	<i>51</i>
<i>Figura 16 Diagrama de componentes principales en co-cultivos con citarabina y sin citarabina</i>	<i>52</i>
<i>Figura 17 Volcano plot de las proteínas de co-cultivos con presencia y ausencia del fármaco.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 18 Procesos biológicos de las proteínas sobreexpresadas.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 19 Procesos biológicos de las proteínas subexpresadas</i>	<i>53</i>
<i>Figura 20 Procesos biológicos de todas las proteínas diferencialmente reguladas</i>	<i>54</i>
<i>Figura 21 Vía de enriquecimiento de KEGG de los co-cultivos</i>	<i>54</i>
<i>Figura 22 Análisis de interacción proteína-proteína por STRING en co-cultivos</i>	<i>55</i>
<i>Figura 23 Diagrama de calor de las proteínas de monocultivo.....</i>	<i>56</i>

Figura 24 Diagrama de componentes principales de monocultivos tratados y no tratados con citarabina	57
Figura 25 Análisis de PCA y diagrama volcano plot de las proteínas de monocultivos	57
Figura 26 Procesos biológicos en monocultivos con y sin citarabina	58
Figura 27 Vías metabólicas de enriquecimiento KEGG en monocultivos con y sin citarabina	58
Figura 28 Análisis de interacción proteína-proteína por STRING en monocultivos	59
Figura 29 Diagrama de Venn de las proteínas con regulación diferencial en condiciones en monocultivo con y sin fármaco vs cocultivos con y sin fármaco	60
Figura 30 Modelo propuesto de co-cultivo con citarabina	61
Figura 31 Modelo propuesto del efecto de citarabina en células de monocultivo	62
Figura 32 Modelo propuesto del efecto de citarabina en ambos tipos de cultivo de células leucémicas	63
Figura 33 Modelo propuesto del efecto de las células estromales en las células leucémicas co-cultivadas	64
Figura 34 Acoplamiento molecular de la citarabina a la proteína S100A4.....	64
Figura 35 Predicción del sitio de unión de la citarabina a la anexina 2 mediante acoplamiento molecular.	65

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
APC: Células presentadoras de antígeno
ATP: Adenosin trifosfato
Ara-CTP: Citarabina trifosfato
CART-T: Linfocitos T con receptor quimérico de antígeno
CDA: Citidina desaminasa
CMF: Citometris de flujo multiparamétrica
CO₂: Dióxido de carbono
CTP: Citidina trifosfato
DCK: Desoxicitidina quinasa
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EMR: Enfermedad mínima residual
FAB: Clasificación Francesa Americana Británica
FDA: Food and Drug Administration
FISH: Hibridación fluorescencia in situ
HSC: Células madre hematopoyéticas
ICC: International Consensus Classification
LLA: leucemia linfoblástica aguda
LLA-B: Leucemia linfoblástica aguda de células B
LLA.T: Leucemia linfoblástica aguda de células T
LLC: Leucemia mieloide crónica
LPA: Leucemia promielocítica aguda
LSC: Células madre leucémicas
MEM: Medio mínimo esencial
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
MSC: Células estromales mesenquimales
MTT: Ensayo de bromuro de tetrazolio
NGS: Secuenciación de nueva generación
NK: Natural Killer
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBS: Solución salina tamponada con fosfatos
RNA: Ácido ribonucleico
RPMI: Rowsell Park Memorial Institute
SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central

TCR: Receptor de células T

WGS: Secuenciación de genoma completo

dCTP: Desoxicitidina trifosfato

RESUMEN

La leucemia es una neoplasia hematológica de gran importancia, debido a su alta tasa de mortalidad e incidencia, siendo México uno de los países con mayor mortalidad. Uno de los principales retos en la leucemia es la resistencia a los fármacos empleados para su tratamiento. Algunos estudios han demostrado que el microambiente de la médula ósea confiere protección frente a los fármacos.

En el presente estudio se observaron las diferencias en los perfiles proteómicos de una línea celular de leucemia linfoblástica aguda llamada CCRF-CEM expuesta a citarabina, un fármaco utilizado en distintas etapas del tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. Estas observaciones se realizaron mediante espectrometría de masas y con ayuda de co-cultivos 3D con células estromales de la médula ósea de la línea celular OP9.

Los resultados obtenidos confirman un cambio proteómico en células leucémicas co-cultivadas con y sin citarabina; no solo eso, sino que también se observa una diferencia entre los monocultivos de células leucémicas y los co-cultivos. De igual manera, observamos una mayor viabilidad cuando las células leucémicas están en co-cultivo con las células estromales. Por otra parte, dentro de las mayores diferencias proteómicas, encontramos que los co-cultivos con citarabina sobreexpresan procesos biológicos relacionados al metabolismo energético, mientras que los monocultivos sobreexpresan procesos biológicos relacionados al procesamiento de RNA.

La aportación del presente trabajo es sobre la relevancia de las adaptaciones proteómicas de las células en co-cultivo y sus diferentes respuestas al fármaco, proporcionando una base para las investigaciones sobre los mecanismos de resistencia a citarabina en leucemia linfoblástica aguda.

ABSTRACT

Leukemia is a hematological malignancy of great clinical importance due to its high incidence and mortality rates, with Mexico being among the countries with the highest mortality rates. One of the main challenges in leukemia treatment is the resistance to the drugs used for its eradication. Several studies have demonstrated that the bone marrow microenvironment modulates cellular responses to chemotherapeutic agents.

In the present study, differences in the proteomic profiles of the acute lymphoblastic leukemia cell line CCRF-CEM exposed to cytarabine, a drug used at different stages of acute lymphoblastic leukemia treatment, were evaluated. These analyses were performed using mass spectrometry and a three-dimensional (3D) co-culture model with OP9 bone marrow stromal cells.

The results confirmed proteomic alterations in leukemic cells co-cultured in the presence and absence of cytarabine. Furthermore, differences were also observed in leukemic cell monocultures. Likewise, higher cell viability was detected when leukemic cells were co-cultured with stromal cells compared to monocultures. Among the most significant proteomic differences, cytarabine-treated co-cultures showed an overrepresentation of biological processes related to energy metabolism, whereas monocultures exhibited an overrepresentation of biological processes associated with RNA processing.

The main contribution of this work lies in highlighting the proteomic relevance of leukemic cells grown in co-culture and their distinct proteomic responses under different experimental conditions. These findings provide a foundation for future studies aimed at understanding the mechanisms of resistance to cytarabine and the influence of the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia.

INTRODUCCIÓN

1.1 ¿Qué es la leucemia?

La leucemia es un tipo de cáncer que se da en la médula ósea y en la sangre, aparece cuando las células hematopoyéticas proliferan de manera descontrolada en un estadio inmaduro, dando como resultado una producción deficiente de células hematopoyéticas maduras, las células inmaduras evaden la respuesta al sistema inmune, complicando la eliminación de las células que no funcionan de manera correcta, favoreciendo el desbalance entre células y por lo tanto la aparición de la enfermedad. En condiciones óptimas, la diferenciación celular está dada por diferentes factores de transcripción; en los últimos años se ha observado que las mutaciones, los factores epigenéticos y la alteración de los factores de transcripción contribuyen a la proliferación descontrolada de las células hematopoyéticas (Raetz & Gojo, 2018). Las células madre hematopoyéticas pueden dar origen a nuevas células a partir de la célula madre; es decir, son autorrenovables. También comparten algunas funciones específicas, como ser multipotentes; de esta manera, pueden dar origen a otros linajes, como células linfoides, células mieloides y la línea eritroide.

Las células madre son un tipo de células que derivan del saco vitelino y de la región aorta-gónada-mesonefros, el hígado, la médula ósea y el bazo. El tejido hematopoyético de origen de la médula ósea está conformado por células estromales provenientes de células mesenquimales como lo son: adipocitos, células endoteliales, fibroblastos y osteoblastos (Domínguez, *et al.*, 2015). La leucemia, a diferencia de los tumores sólidos, es capaz de infiltrarse a través de órganos como el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos y el sistema nervioso central. Esto hace que la eliminación de la leucemia sea difícil debido a que las células leucémicas suelen establecerse en lugares llamados sitios santuarios en donde los fármacos tienen dificultades para eliminar las células con alteraciones (Arana, *et al.*, 2022).

1.2 Clasificación de la leucemia

La clasificación de la leucemia es amplia y ha cambiado con el tiempo para mejorar el diagnóstico y, con ello, reducir la tasa de mortalidad por este tipo de cáncer. Una clasificación utilizada es la Francesa-Americana-Británica (FAB), la cual se basa en la morfología y estadio de las células hematopoyéticas inmaduras, clasifica a la

leucemia mieloide aguda en subtipos: M0 es una leucemia mieloide aguda (LMA) indiferenciada, M1 LMA con maduración mínima, M2 leucemia promielocítica aguda (LPA), M4 leucemia mielomonocítica aguda, M4 leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia, M5 leucemia monocítica aguda, M6 leucemia eritroide aguda y M7 leucemia megacarioblástica aguda, esta clasificación permite reconocer linfoma de Burkitt en fase de leucemia, esta clasificación es utilizada mayormente en la clínica como primer paso de la identificación de leucemias hoy en día existen otras clasificaciones aceptadas para la leucemia, la dada por la OMS y la ICC, estas clasificaciones abarcan más que la morfología y con cada nueva edición se van perfeccionando las clasificaciones para una mejor detección y con ello mejor tratamiento (Raetz y Gojo, 2018); (Bispo, *et al.*, 2020).

Como se mencionó con anterioridad, la clasificación de la leucemia parte de lo general a lo particular, en donde el primer filtro es determinar la progresión de la enfermedad; aquí se divide en dos: las leucemias crónicas y las leucemias agudas. Para leucemias crónicas la progresión es lenta en comparación con la leucemia aguda, a su vez dependiendo del origen celular y precursores celulares, se clasifican en linfoblásticas y mieloides, teniendo entonces cuatro tipos de leucemia: la leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfoblástica aguda (LLA) que puede dividirse de acuerdo a sus precursores en B (LLA-B) o T (LLA-T) (Chiaretti, *et al.*, 2014);(Bispo, *et al.*, 2020).

1.3 Leucemia linfoblástica aguda

La LLA es más común en niños, se caracteriza por la proliferación anormal de las células linfoides en médula ósea, sangre y sitios extramedulares, en el cual el 75% de casos se relacionan con linfocitos de tipo B. La mayor incidencia de LLA se observa en dos etapas de la vida, en la primera etapa se presenta durante la infancia, mientras que la segunda se da alrededor de los 50 años (Terwilliger y Abdul, 2017).

La clasificación de la leucemia no sólo depende del tipo de células que afecta y su progreso, en los últimos años, la inmunohistoquímica e inmunofenotipo por citometría de flujo, al igual que el cariotipo, ofrecen una clasificación particular de los distintos tipos de leucemia. Podemos clasificar la leucemia linfoblástica aguda en B y en T y cada uno de éstos en diferentes subtipos.

1.3.1 Leucemia linfoblástica aguda tipo B

La LLA-B es la más estudiada en comparación con la tipo T, es el fenotipo más común en los pacientes, con un 75% de los casos en niños y 85% en adultos. Las variaciones genéticas en este subtipo son diversas, pero una de las más importantes es la translocación del gen *BCR::ABL1* o también llamado gen philadelphia, esta mutación se relaciona con un pronóstico poco favorable en la LLA-B. La subclasificación de LLA-B es la siguiente: ProB (B-I): expresan CD19+, CD34+, CD10- o débil, CD22/cCD22+, cCD79a+, CD24 de manera variable y/o CD45 bajo; B-II o también llamado común: expresa CD19+, CD10+, CD34+/- cCD22+, cCD229a+, CD38+, CD45 en bajas cantidades; pre B (BIII): CD19+, CD10+/-, CD34 bajo o sin presencia, cCD22+, cCD79a+, CD24+, CD38+, CD45+ (Zúñiga et, al., 2023)

1.3.2 Leucemia linfoblástica aguda tipo T

La clasificación de LLA-T suele ser complicada debido a que algunos casos no expresan de manera correcta los clusters de diferenciación (CDs) debido a expresión baja o nula. La LLA-T representa el 15-25% de LLA pediátrica y en adultos, respectivamente, en el tipo T la mayoría de las translocaciones tiene lugar en las regiones 14q11 de *TRA*. Existen cuatro subtipos de LLA-T: maduro, en donde se expresa CD3+, cortical: expresa CD1a+, Pre-T expresan cCD3+ y CD2+, CD5+ y CD8+, por último, pro-T en donde se expresan CD3+ y CD7+ (Ramirez *et al.*, 2024) ;(Lacobucc y Mulligan, 2017).

La LLA-T temprana (ETP) se caracteriza por la reducción de marcadores como CD1a, CD6 y CD5, pero presenta marcadores mieloides o de células madre, por lo que algunos autores consideran que es un fenotipo distinto de LLA, tiene un pronóstico desfavorable, incluye mutaciones en *RUNX1*, *IKZF1*, *ETV6*, *GATA3* y *EP300*, señalización de Ras, etc. (Lacobucc y Mulligan, 2017).

Genéticamente, las mutaciones más frecuentes en LLA-T incluyen a la familia TAL (*TAL1*, *TAL2* y *LYL1*) y reordenamientos de familia *LMO*, las alteraciones en niños representan un 30%. Al mismo tiempo pueden presentarse mutaciones como *CASP8AP2* o *PHF6* y deleciones en *PTEN*, pero no son las únicas, las mutaciones en *ETV6*, *CNOT3*, *EZH2*, *JAK3* y *STAT5B*, *IL7R*, *JAK3*, *JAK1*, *WT1*, *FBXW7*, *RPL10* y *NOTCH*, deleciones en *CDKN2AB*, *TLX1*, *NKX1* y *KMT2A*,

translocaciones de *ABL1*, también se encuentran presentes en la enfermedad. Las mutaciones de delección asociadas con *CDKN24* y *FBXW7* ocurren en el 50-60% de los casos de infantes y están asociados con un pronóstico grave de la enfermedad (Ramírez *et al*, 2024).

1.4 Epidemiología de la leucemia

Recaudar información sobre las incidencias y muertes de leucemia en niños es complicado, debido a que resulta imposible obtener datos actualizados a nivel global, esto se debe a los malos diagnósticos, desigualdad en sector salud, entre otros. En 2025, Wang y colaboradores recopilaron datos del Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN) sobre el cáncer infantil en diferentes partes del mundo hasta 2022, que son los datos más recientes. Las principales causas de incidencia de cáncer infantil son: leucemia, tumores cerebrales y del sistema nervioso central (BCNS), linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, riñón, tiroides, testículos, ovario y colorrectal, siendo la principal causa de muerte infantil la leucemia, seguida de los tumores cerebrales y del sistema nervioso central. En 2022 se diagnosticaron 77,660 nuevos casos y 31,106 muertes por cáncer infantil. También se observó que, los niños tienen una incidencia distinta en leucemia, los casos son mayores en niños con 118,555 casos y 92,525 casos en niñas (Wang, 2025).

La proporción principal de incidencia estimada de cáncer a nivel global, basada en los datos recopilados por Wang es la siguiente: leucemia linfoblástica aguda (LLA) representa el 66.73%, leucemia linfocítica crónica (LLC) representa el 0.25%, la leucemia mieloide aguda (LMA) es 17.46% y leucemia mieloide crónica (LMC) el 2.97%. En tumores BCNS es la principal con 15%, seguido de tumores astrocíticos que representan 16.81%, el linfoma de Burkitt representa el 17.64% y el carcinoma de células renales el 8.35%. La esclerosis nodular fue el tipo más común de linfoma de Hodgkin con más del 55% de los casos (Wang, 2025).

Como se observa la leucemia es la principal incidencia de cáncer de niños, siendo la LLA la principal, en 2022 se diagnosticaron 56,695 casos nuevos, es decir 73.05% en todo el mundo. La tasa estandarizada por edad (ASR) en LLA fue de 1.69 por cada 100,000 habitantes para niñas y 2.34 por cada 100,000 para los niños (Wang, 2025)

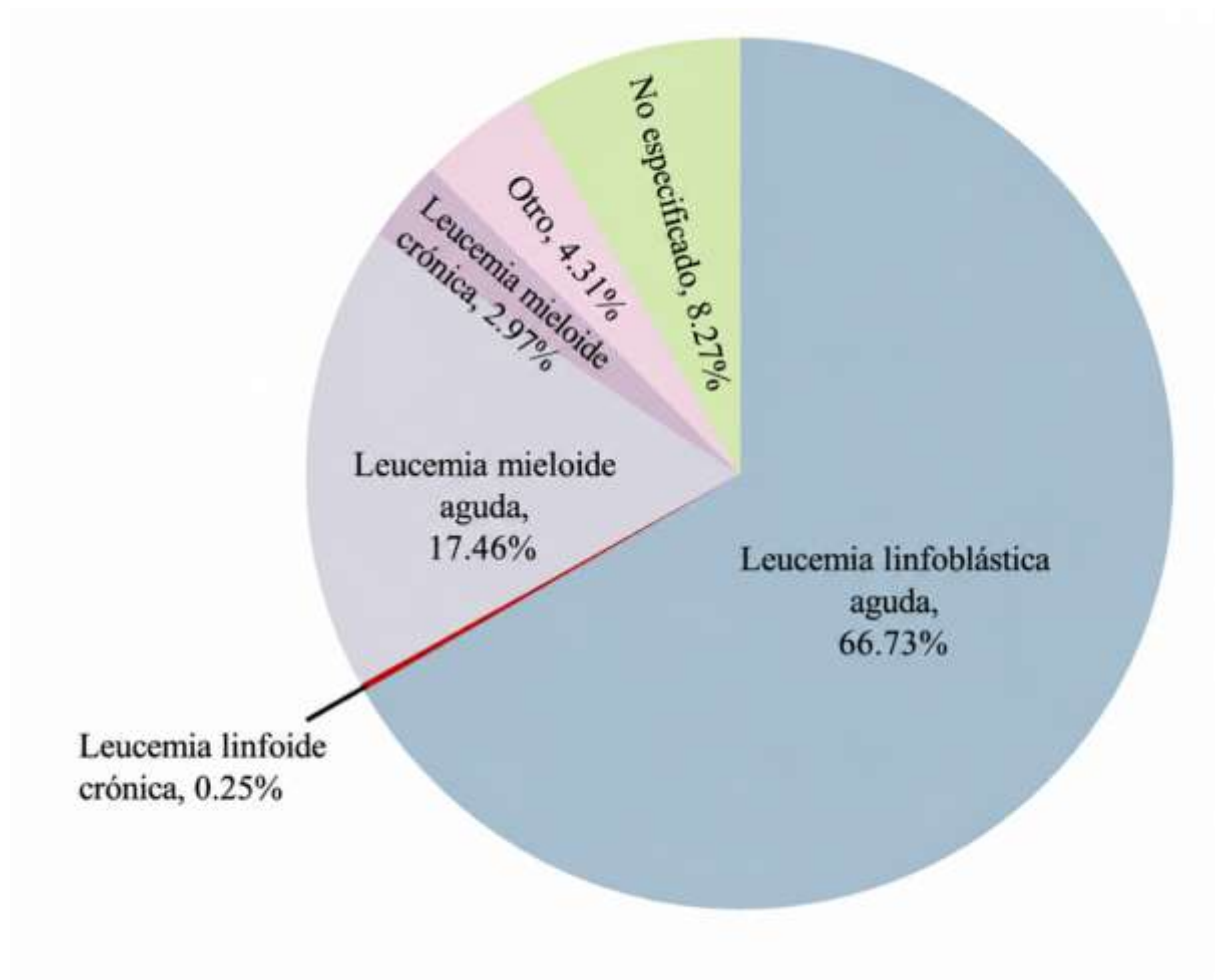


Figura 1 Distribución global de la incidencia de los principales tipos de leucemia

Representación de la proporción global de incidencia en leucemia en el mundo, siendo la leucemia linfoblástica aguda la de mayor incidencia (63.73%) (Wang, 2025)

De acuerdo con datos recientes de Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) México ocupa uno de los primeros lugares con más casos de incidencia y mortalidad en leucemia infantil, las tasas de incidencia en México van de 74.2 a 58.4 por millón, por otra parte en Estados Unidos la población hispana representa el 49.7 casos por millón, solo en LLA, comparando estas tasas de incidencia en países del continente americano, que tienen mayor ascendencia europea, se puede observar que el sur de Brasil tiene un 51.0 a 41.1% de incidencia, Argentina 47.5 - 37.7%, Puerto Rico 35.7% y Chile 34.2%. Este comportamiento ha sido reportado por diversos autores, en donde coincide que la población hispana tiende a presentar mayor incidencia de leucemia. En México también se puede ver esta gran diferencia, al sur de México los estados con mayor ascendencia indígena como lo son Puebla y Chiapas, reportan una incidencia mayor a 70 casos por millón, en comparación con estados del norte como Nuevo León con 32.5 casos (Núñez *et al.*, 2026).

Se ha reportado a lo largo de los años la tasa de incidencia de leucemia en los niños mexicanos, en 2010-2017 en la Ciudad de México se reportó 63.3 casos por millón, en 1996-2000 la incidencia fue de 58.4; en 1996-2002 se reportó 55.4; en 1996-2013 la incidencia fue de 62.2 y en 2006-2007 fue de 57.6 por millón (Núñez *et al.*, 2026).

ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1 Etiología en leucemia linfoblástica aguda tipo T

Si bien las causas que originan las leucemias agudas no son del todo claras, se ha visto que las causas son multifactoriales, estudios sugieren que algunas de estas causas están relacionadas con cambios genéticos y epigenéticos como lo son, mutaciones puntuales, aparición de genes de fusión por translocaciones cromosómicas, amplificaciones, síndromes genéticos como síndrome de Down, síndrome de Li-Fraumeni, neurofibromatosis, síndromes en donde la reparación del DNA se ve comprometida como la anemia de Fanconi y el síndrome de Blomm entre otros (Emadi,2023); (Dorantes *et al.*, 2013); (Shimony, 2023) (Bispo, *et al.*, 2020)

Existen factores de riesgo que contribuyen a las causas que pueden originar leucemia, como la radiación de terapias o de forma ocupacional, es decir, aquellas personas que trabajan con energía nuclear o radiólogos, quimioterapias, exposición a algunos compuestos químicos, exposición a pesticidas, solventes e infecciones. Dentro de las infecciones existe la hipótesis de la infección retardada de Greaves propuesta en 1988, en ella se postula que la exposición tardía a patógenos comunes, provoca una respuesta inmune anormal que desencadena LLA, por otra parte la hipótesis suprarrenal propuesta por Schmiegelow y colaboradores en 2008, propone que las infecciones tempranas inducen el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, con ello aumenta los niveles plasmáticos de cortisol, eliminando las células leucémicas y preleucemias, de esta manera se logra suprimir la inflamación y con ello la generación de nuevas células inmaduras que originan leucemia (Terwilliger y Abdul, 2017) (Bispo,2020).

2.2 Rasgos clínicos de leucemia linfoblástica aguda

La presentación clínica de la LLA es consecuencia directa de dos fenómenos fisiopatológicos: la infiltración de la médula ósea por células leucémicas, que desplaza a los precursores normales de las tres series hematopoyéticas, y la diseminación sistémica de los linfoblastos hacia órganos y tejidos extramedulares. La presentación puede ser insidiosa, con síntomas que se desarrollan durante semanas o meses, con deterioro clínico agudo en días. Esta variabilidad en la forma de presentación refleja la heterogeneidad biológica de la enfermedad y constituye un gran desafío para el diagnóstico, especialmente cuando los síntomas iniciales son inespecíficos (Terwilliger y Abdul, 2017; Arana *et al.*, 2022).

El síndrome anémico es uno de los hallazgos más frecuentes. Se manifiesta como: palidez mucocutánea, astenia, adinamia, taquicardia compensatoria y, en casos graves, disnea de esfuerzo o en reposo, la trombocitopenia es igualmente frecuente y se manifiesta clínicamente como petequias (puntos hemorrágico-pequeños de color rojo), equimosis espontáneas, epistaxis y, con menor frecuencia, sangrado gastrointestinal o hemorragia intracraneal en los casos con recuentos plaquetarios muy bajos (menos de 20,000/ μ L). La neutropenia, por su parte, es responsable de la mayor susceptibilidad a infecciones bacterianas y fúngicas, y puede manifestarse como fiebre sin foco aparente, sepsis o infecciones oportunistas (Terwilliger y Abdul, 2017).

La hepatoesplenomegalia es un hallazgo frecuente al diagnóstico, presente en el 50-70% de los pacientes con LLA, y refleja la infiltración leucémica de estos órganos. Puede manifestarse como sensación de plenitud abdominal, dolor en el hipocondrio izquierdo o derecho, y saciedad temprana. La linfadenopatía, tanto superficial como profunda (mediastínica, abdominal), es también común y puede detectarse mediante palpación o estudios de imagen. En la LLA-T en particular, la masa mediastínica anterior es una característica clínica relativamente específica del subtipo, presente en el 50-75% de los casos, y puede generar síndrome de vena cava superior con edema facial, plétora, distensión de venas del cuello y disnea, constituyendo una emergencia oncológica que requiere diagnóstico y tratamiento urgentes (Chiaretti *et al.*, 2014).

El dolor óseo es un síntoma frecuente en el ámbito pediátrico. Resulta de la expansión de la médula ósea por los linfoblastos y se manifiesta como dolor en: fémur, tibia, húmero, la columna vertebral y las articulaciones. En niños pequeños,

puede presentarse como cojera, negativa a caminar o irritabilidad inexplicable, y puede ser malinterpretado como artritis o enfermedad ortopédica benigna, retrasando el diagnóstico (Shimony, 2023).

La afectación del sistema nervioso central (SNC) al momento del diagnóstico se clasifica según los criterios del Children's Oncology Group (COG): SNC-1 (menos de 5 células/ μ L en LCR sin blastos), SNC-2 (menos de 5 células/ μ L con blastos identificables) y SNC-3 (5 o más células/ μ L con blastos, o parálisis de nervios craneales, o masa en el SNC). La afectación SNC-3 está presente en el 5% de los casos al diagnóstico y requiere tratamiento intratecal intensificado. Los síntomas de afectación del SNC incluyen cefalea persistente, náuseas, vómito, rigidez de nuca, diplopía, en casos avanzados, convulsiones o alteraciones del nivel de conciencia. La presión intracraneal elevada por infiltración meníngea puede confundirse con meningitis infecciosa, por lo que la punción lumbar con análisis citológico del LCR es un procedimiento diagnóstico esencial (Shimony, 2023; Arana *et al.*, 2022).

2.3 Diagnóstico y tratamiento de leucemia linfoblástica aguda

El diagnóstico preciso de la LLA es necesario para la ejecución del tratamiento. Se basa en la integración de múltiples estudios complementarios que permiten no sólo confirmar el diagnóstico, sino también caracterizar el subtipo molecular, el estadio de riesgo y la presencia de alteraciones con implicaciones terapéuticas directas. El análisis morfológico de la médula ósea, obtenida mediante aspirado esternal o de cresta ilíaca, es el primer paso diagnóstico: la presencia de más del 20% de linfoblastos confirma el diagnóstico de leucemia aguda. La morfología de los linfoblastos, como el tamaño, la relación núcleo-citoplasma o la presencia de nucléolos, puede orientar al linaje celular, aunque la confirmación requiere estudios complementarios (Bispo *et al.*, 2020).

La citometría de flujo multiparamétrica (CMF) es la herramienta estándar para la caracterización inmunofenotípica de la LLA. Se basa en la utilización de anticuerpos fluorescentes que permiten identificar los marcadores de superficie e intracitoplasmáticos que definen el linaje (B o T) y el estadio de maduración. Los marcadores para células B incluyen CD19, CD22, CD79a, PAX5 y CD10, mientras que los marcadores para las células T incluyen CD2, CD3 (superficial y citoplasmático), CD5, CD7 y CD1a. La CMF también permite identificar marcadores aberrantes (expresión anormal de antígenos del linaje opuesto o de estadios

inmaduros), útiles para el seguimiento de la enfermedad mínima residual (Lacobucci y Mulligan, 2017; Bispo *et al.*, 2020).

Las técnicas de FISH complementan este análisis para detectar reordenamientos específicos con mayor sensibilidad. El panel de FISH en LLA debe incluir, como mínimo, la detección de BCR: ABL1, ETV6:RUNX1, KMT2A reordenado, TCF3:PBX1. La secuenciación de nueva generación (NGS), tanto en panel dirigido como en secuenciación de genoma completo (WGS) y secuenciación de ARN (RNA-seq), ha expandido significativamente la capacidad diagnóstica y pronóstico, permitiendo identificar mutaciones puntuales, variantes de número de copia, genes de fusión y perfiles de expresión génica con valor clínico establecido (Lacobucci y Mulligan, 2017; Shimony, 2023).

El tratamiento de la LLA se organiza en tres fases secuenciales. La fase de inducción, de 4 a 6 semanas de duración, tiene como objetivo la remisión completa morfológica (menos del 5% de blastos en la médula ósea) e, idealmente, la negativización de la EMR. El esquema estándar incluye: corticoesteroides (prednisona 60 mg/m²/día o dexametasona 6-10 mg/m²/día), vincristina (1.5 mg/m² semanal), L-asparaginasa (PEG-asparaginasa 2,500 UI/m² por dosis, 1-2 dosis), y una antraciclina en los esquemas de riesgo intermedio-alto (daunorrubicina 25-45 mg/m²/semana). La profilaxis del SNC se inicia desde las primeras semanas con quimioterapia intratecal (metotrexato 12mg, citarabina 30 mg, hidrocortisona 15 mg) (Terwilliger y Abdul, 2017; Dorantes *et al.*, 2013).

La fase de consolidación, de 4 a 8 meses de duración, tiene como objetivo erradicar la enfermedad mínima residual mediante esquemas de alta intensidad. Incluye metotrexato en dosis intermedias o altas (500-5,000 mg/m² en infusión continua de 24 horas), 6-mercaptopurina, citarabina en dosis intermedias, y en protocolos específicos, bloques de reinducción que replican el esquema de inducción. En los pacientes de alto riesgo con EMR positiva persistente o con alteraciones citogenéticas adversas, el trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (alo-TCPH) en primera remisión completa puede mejorar la supervivencia. Para pacientes con LLA BCR::ABL1-positivo, la incorporación de inhibidores de tirosina quinasa (imatinib, dasatinib, ponatinib) a la quimioterapia estándar ha transformado el pronóstico de este subtipo (Shimony, 2023).

La fase de mantenimiento, de 2 a 3 años de duración, tiene como objetivo prevenir la recaída mediante la administración continua de quimioterapia de baja toxicidad:

metotrexato oral semanal (20 mg/m²) y 6-mercaptopurina diaria (75 mg/m²), con controles periódicos de médula ósea y seguimiento de la EMR. Las nuevas inmunoterapias han ampliado el arsenal terapéutico disponible: el blinatumomab (anticuerpo biespecífico anti-CD19/CD3) y el inotuzumab ozogamicina (anticuerpo conjugado anti-CD22) han demostrado eficacia en LLA-B en recaída o refractaria. Para la LLA-T en recaída, el nelarabina (análogo de nucleósido T-específico) es el agente con mayor actividad, aunque su eficacia como agente único es modesta y los resultados en recaída siguen siendo insatisfactorios en la mayoría de los pacientes adultos (Shimony, 2023; Lacobucci y Mulligan, 2017).

2.4 Citarabina como fármaco contra la leucemia linfoblástica aguda

Ante la necesidad de la eliminación de las células leucémicas, se han sintetizado distintos tratamientos que ayudan a erradicar la enfermedad, entre ellos se encuentra la citarabina. La citarabina o citosina arabinósido (1-β-D arabinofuranosilcitosina) es un análogo de la desoxicitidina, el tratamiento con este fármaco puede ser solo o en combinación con antraciclinas como daunorrubicina o idarubicina. La citarabina se puede administrar en distintas fases del tratamiento de LLA como la inducción, recaída o progresión, para la dosis de inducción se administran 3000 mg/m² cada 12 horas en combinación con metotrexato, de igual manera puede haber dosis altas en la fase de inducción, recaída o progresión, es decir, 3000 mg/m² cada 3 horas durante 5 días combinada con idarrubicina (Di Francia *et al.*, 2021)

La vía de administración de la citarabina es intravenosa, debido a que, de forma oral, el fármaco se metaboliza rápidamente en el hígado gracias a la enzima citidina desaminasa (CDA) convirtiéndolo a su forma inactiva arabinosil uracilo, órganos como bazo, hígado y riñón tienen actividad alta de CDA, por lo que administrar vía intravenosa disminuye su inactivación. La activación de citarabina inicia cuando entra a las células a través de los transportadores SLC, el transportador equilibrado humano de nucleósidos hENT1 y hENT2 codificados por los genes SLC29A1 y SLC29A2, respectivamente, estos transportadores dejan pasar el fármaco dependiendo del gradiente de concentración y los transportadores concentrativos de nucleósidos humanos hCNT3 codificados por el gen SLC29A1, requiere ATP y entrada de Ca²⁺ para su activación (Di Francia *et al.*, 2021).

La acumulación y captación de AraC están reguladas por proteínas transportadoras de membrana (ABS), en especial ABCC10 y ABCC11, que funcionan como una bomba de eflujo, la cual permite la eliminación de los metabolitos inactivos. Después de la entrada de citarabina a la célula, una serie de reacciones que incluyen la fosforilación de AraC la convierten en forma activa. La primera enzima que participa es la desoxicitidina quinasa (DCK), esta enzima añade el primer fosfato, convirtiéndola en citarabina monofosfato (Ara-CMP), posteriormente se añade el segundo fosfato por la enzima desoxicitidina monofosfato quinasa (dCMK) convirtiéndola de Ara-CMP a Ara-CDP es decir, citarabina difosfato y por último, la forma activa por la enzima nucleósido difosfato quinasa (NDK) que convierte de Ara-CDP a Ara-CTP (citarabina trifosfato) lo que impide que el fármaco salga de la célula, evitado su inactivación por la enzima CDA, la Ara-CTP tiene una constante de disociación (K_m) similar a dCTP que es el nucleótido por excelencia, lo que hace que se pueda incorporar en el DNA por la DNA polimerasa interfiriendo con la elongación de la cadena, síntesis y reparación del DNA. Los niveles de dCTP se encuentran regulados por la actividad de la citidina trifosfato sintetasa (CTPS). Esta enzima participa en la biosíntesis de pirimidinas, catalizando la conversión de uridina trifosfato a CTP. También la ribonucleótido reductasa (RR) puede catalizar la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos durante la síntesis de DNA. La citarabina en su forma activa es revertida por enzimas citosólicas de la familia 5' nucleotidasas (NT5) específicamente NT5C2 y NT5C3, estas enzimas catalizan la desfosforilación del intermediario monofosfato convirtiéndola a citarabina cuando se elimina el fosfato en 5', por otra parte la CDA elimina el grupo amino de la citosina y convierte el fármaco en su derivado inactivo, de igual manera dCMPD desamina la citarabina monofosfato a arabinósido de uracilo monofosfato (Di Francia *et al.*, 2021).

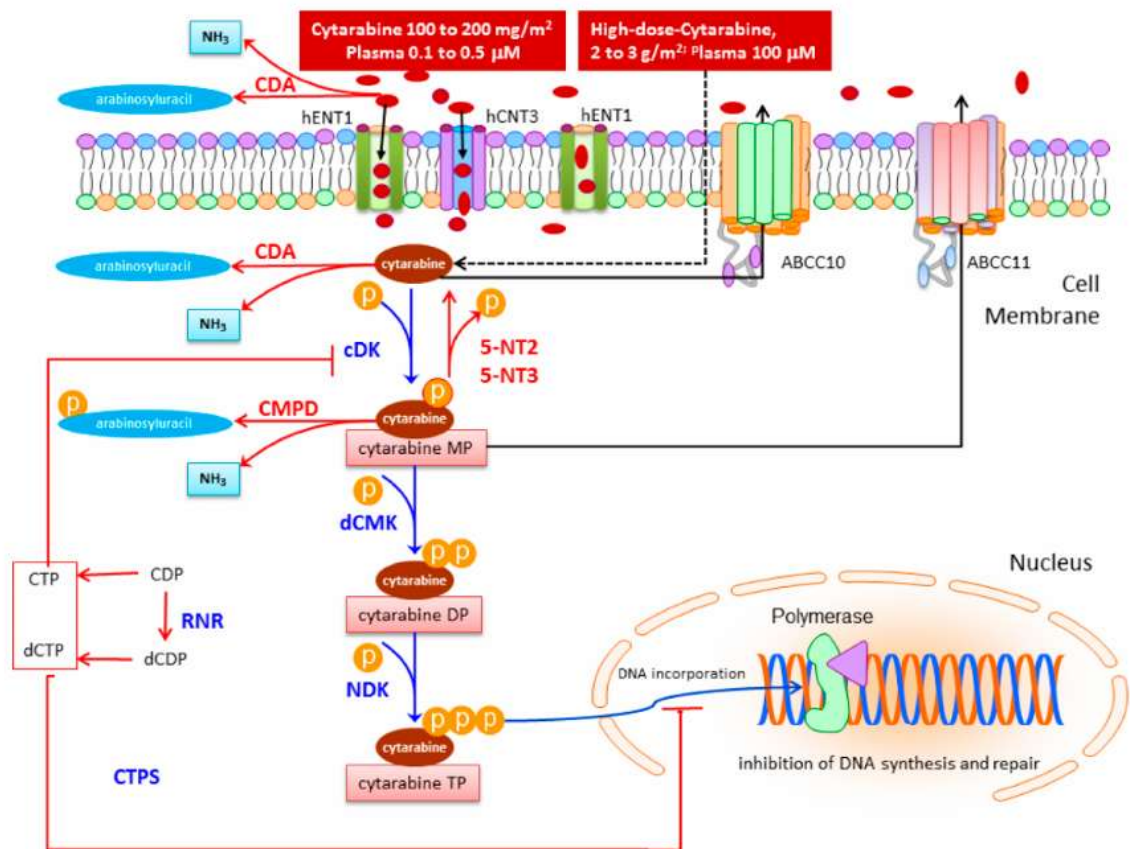


Figura 2 Mecanismo de transporte, activación intracelular y acción citotóxica de la citarabina

Tras su ingreso a la célula mediante transportadores de nucleósidos, la citarabina es convertida mediante fosforilaciones sucesivas en su forma activa, Ara-CTP. Esta activación depende de la acción coordinada de las enzimas dCK, dCMPK y NDK. Una vez formada, Ara-CTP se incorpora al ADN e interfiere con los mecanismos de replicación y reparación, lo que contribuye a la citotoxicidad del fármaco. En contraste, enzimas como CDA, 5-NT2 y 5-NT3 participan en su inactivación, mientras que proteínas transportadoras de la familia ABC pueden disminuir su acumulación intracelular al favorecer su eflujo (Di Francia *et al.*, 2021)

2.5 Cultivo celular como método de estudio de la leucemia linfoblástica aguda

Para estudiar modelos *in vivo* es necesario plantear, en primera instancia, el problema en un modelo *in vitro* como los cultivos celulares. Existen dos tipos de modelos, el clásico utilizado desde los inicios del siglo XX, es el 2D, las ventajas de usar estos modelos son el tiempo, la reproducibilidad y el mantenimiento, pero presentan desventajas como nutrientes ilimitados, menor interacción célula-célula y no es capaz de imitar las estructuras tumorales o de tejidos, es por ello que surgen los modelos 3D, para resolver algunas de las limitaciones de los modelos 2D. Los cultivos 3D presentan desventajas como la reproducibilidad, pueden ser más costosos con respecto a los 2D y son más difíciles de establecer y propagar, pero

son más cercanos en cuanto a la representación del entorno in vivo (Jense y Teng, 2020) (Kapalzyńska, 2018)

2.6 Cultivos 3D

Existen diferentes tipos de cultivos 3D: suspensión libre, flotación forzada y biorreactores y métodos de bioimpresión 3D, a su vez estos tipos de cultivo se clasifican basados en andamios o en ausencia de éstos. Los cultivos sin andamios como la suspensión libre, las células son sembradas en placa multipozos, se cubren y después se invierte la placa, esto hace que las células se agreguen entre ellas y se formen esferoides, las desventajas que se presentan en este modelo son los tamaños de los esferoides y por lo tanto la poca reproducibilidad, debido a que el tamaño está determinado por el tamaño de la gota, no existe una interacción célula-matriz extracelular, por otra parte los cultivos de flotación forzada o suspensión en líquido se forman a partir de células que son sembradas en placas recubiertas, este recubrimiento que puede ser de metacrilato 2-polihidroximetil, generan una agregación de células rápida en comparación con los cultivos de suspensión libre, estos cultivos tienen un tamaño uniforme, aunque una de las desventajas es la limitación entre las interacciones célula-matriz extracelular. Los biorreactores necesitan de agitación para la promoción de adhesión celular, este modelo tampoco tiene interacción célula matriz extracelular, el tamaño de los esferoides pueden ser variables, por lo que se necesita seleccionar de manera manual los esferoides utilizados para las pruebas con fármacos o algún otro ensayo, esto con el fin de buscar que sea reproducible. Existen también láminas de celda 3D en donde las células son cultivadas en monocapas y a su vez, éstas son apiladas para crear multicapas 3D, las desventajas son la falta de oxígeno y por lo tanto la necrosis del cultivo en regiones internas como el núcleo, este tipo de cultivos ha cobrado relevancia en los últimos años en ingeniería de tejidos (Jense y Teng, 2020).

En los cultivos basados en matrices existen distintos tipos de matrices o soportes: Naturales, semisintéticos y sintéticos, como los hidrogeles. Su finalidad es representar aún más el entorno in vivo. Estos soportes se asemejan a la matriz extracelular; por ello, están hechos de compuestos como colágeno, citocinas y ácido hialurónico, y algunos son mezclas de distintos compuestos ya comerciales y bien definidos, como el Matrigel. Las desventajas es que los lotes de los hidrogeles pueden influir en los resultados obtenidos, el costo es elevado en

comparación con otro tipo de cultivos 3D, pero sus ventajas son la interacción célula-matriz extracelular, los esferoides con morfología y tamaño similar. La bioimpresión 3D puede imitar condiciones fisiológicas, se obtienen a través de moldes determinados en donde se colocan capas de biomateriales que contienen a las células. Estos modelos también pueden derivarse de tejidos de pacientes, las desventajas incluyen los altos costos y la estandarización que se debe de hacer, sin embargo, en los últimos años ha tenido relevancia como lo es en la impresión 3D de carne (Jense y Teng, 2020).

2.7 Microambiente tumoral

La teoría de las células madre leucémicas ha cobrado relevancia, al intentar explicar otra posible ruta para la quimiorresistencia. Las células madre hematopoyéticas (HSC) desarrollan características únicas, las cuales implican capacidad de auto-renovación, pluripotencia y proliferación. Se descubrió que existen células leucémicas capaces de presentar las características de las células madre hematopoyéticas; a estas células se les conoce como células madre de leucemia (LSC). (Rey, Pinzón y Cruz, 2020).

Las HSC se desarrollan dentro de nichos en el que se forma un microambiente especializado, generando el auto mantenimiento de las HSC, este microambiente permite que las células madre hematopoyéticas se encuentren en estado de quiescencia siempre y cuando no existan señales que le indiquen la activación de proliferación, así como su diferenciación lo que influye en el destino de las HSC (Kuhn y Tuan, 2009).

Dentro de la médula ósea se encuentran otro tipo de células, llamadas células estromales mesenquimales (MSC), estas células son capaces de diferenciarse en líneas celulares como endodermos, mesodermo y ectodermo, se ha comprobado que las MSC presentan propiedades inmunosupresoras o inmunomoduladoras gracias a la interacción célula-célula y la secreción de moléculas asociadas con el sistema inmune, permitiéndole modificar el entorno tisular para su reparación y regeneración, estas células son multipotentes, se pueden diferenciar en linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos. El nicho en el que se encuentran las MSC es un nicho perivascular asociado a vasos sanguíneos, lo que le confiere la capacidad de migrar a diversos tejidos tanto locales como distales en respuesta a lesiones o patogénesis (Kuhn y Tuan, 2009).

El microambiente de la médula ósea se subdivide en dos nichos, el nicho endosteal en donde las células hematopoyéticas tienen interacciones célula-célula con los osteoblastos lo que a su vez favorece la supervivencia y la proliferación de estas células; por otra parte, se encuentra el nicho vascular, está formado por vasos sanguíneos sinusoidales que se encuentran dentro de la cavidad de la médula y este nicho permite el movimiento de oxígeno, nutrientes y factores celulares, manteniendo la comunicación con células hematopoyéticas y otros tejidos (Rey, 2020).

Diversos autores han demostrado la importancia del microambiente de la médula ósea (BMM) para la sobrevivencia de células madre normales como las MSC y HSC, al igual que las células LSC (Karantanou, 2018).

2.8 Sistema inmune

El sistema inmune es el conjunto de mecanismos biológicos que permiten al organismo identificar y eliminar agentes extraños, como patógenos, toxinas y células tumorales, mientras mantiene la tolerancia hacia los componentes propios. Está formado por dos grandes ramas: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata proporciona una respuesta rápida e inespecífica, mediada por células como los neutrófilos, los macrófagos, las células dendríticas y las células NK (natural killer), así como por el sistema del complemento y las barreras epiteliales. La inmunidad adaptativa, por su parte, genera respuestas específicas y con memoria inmunológica, mediadas por los linfocitos T y B. En el contexto de la LLA, el sistema inmune tiene un papel dual: por un lado, como mecanismo de vigilancia el cual elimina las células leucémicas; por otro, como sistema que las células leucémicas subvierten activamente para escapar de la respuesta antitumoral (Lacobucci *et al.*, 2021); (Cheng, 2025).

Las células NK constituyen la primera línea de defensa antitumoral innata. Reconocen y eliminan células que han perdido la expresión de HLA-I (como las células tumorales) a través del mecanismo de 'missing self', sin necesidad de sensibilización previa. Su actividad está regulada por el equilibrio entre receptores activadores (NKG2D, DNAM-1) y receptores inhibidores (KIR, NKG2A/CD94). En la LLA, se ha descrito una reducción de la expresión de los ligandos activadores de NK (ULBP, MICA/B) en las células leucémicas, así como un estado de agotamiento funcional de las NK en el microambiente de la médula ósea, mediado por la

secreción de IL-10 y TGF- β por las células del estroma y los macrófagos asociados al tumor (Lacobucci *et al.*, 2021).

2.9 Células T

Las células T provienen de los timocitos que derivan de la médula ósea en el timo, para lograr la maduración de los linfocitos T, es necesaria una serie de etapas como el doble negativo (CD4-CD8-) doble positivo (CD4+CD8+) y único positivo (CD4+CD8- o CD4- CD8+) (Sun *et al.*, 2023).

Los timocitos doble negativos (DN) pueden a su vez dividirse en cuatro etapas DN1, DN2, DN3 y DN4, en cada una de las etapas ocurren diferentes procesos, por ejemplo en DN1 los timocitos inmaduros no expresan CD25 pero sí CD44 (CD44+CD25-) cuando los ligandos delta like 4 en el estroma tímico se activan, la vía Notch se enciende lo que desencadena la transcripción de CD25, por lo que el incremento de CD25 media la transición de DN1 a DN2 lo que compromete al timocito a ser linfocito T y no B, esto sucede porque a su vez activa a los factores de transcripción como GATA3, TCF1 y Bcl11b, lo que restringe a las células de linaje T.

En DN2 se da el compromiso completo hacia la línea T (DNA2.a), debido a la expresión constante de Notch, de igual manera, comienza el reordenamiento genético del TCR de los segmentos D y J (DN2b), por lo que se decide si los TCR serán $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. En DN3 el reordenamiento se completa (V-DJ), de igual manera es necesario saber si la nueva cadena β de la célula funciona de manera correcta, por lo que une a la cadena al pre-T α formando el pre-TCR, si el TCR funciona la célula sobrevivirá y dejará de reordenar la cadena β y prolifera, en caso de no ser así la célula morirá por apoptosis, en el último paso siendo DN se convierten en CD44-, CD25-, aún dependiente de la señal de Notch, ya no existe reordenamiento genético y las células se preparan para la expresión de sus correceptores CD4 y CD8. Siguiendo con los pasos, ahora las células DN4 necesitan convertirse en dobles positivas (DP), el complejo TCR $\alpha\beta$ reconoce péptidos de MHCI y MHCII de las células presentadoras de antígenos (APCs), la interacción moderada o baja del TCR de las células DP hace que las células sobrevivan, si el TCR no es capaz de reconocer al MHC la célula muere por apoptosis. Por otra parte es necesario que las células reconozcan lo propio de lo extraño para evitar la autoinmunidad, a través de la selección negativa, si el TCR de la célula DP se une con alta afinidad al MHC

de péptidos propios, la célula se elimina por delección clonal, por otra parte también puede desviar a las células CD4 a células T reguladoras (Treg), aquellas células que pasan la selección positiva y negativa, apagan uno de los dos correceptores (CD4 o CD8) lo que las convierte en una célula simple positiva (SP), por último migran a la médula del timo para la finalización de la maduración. La elección de las células T para convertirse en CD8+ o CD4+ se conoce como modelo de señalización cinética. La interacción de la célula DP con el MHC depende del co-receptor que se involucre: si se une al MHC I, el co-receptor activado es CD8, mientras que si se une al MHC II, el co-receptor activado es CD4. Independientemente de la unión de la célula al MHC, la primera respuesta de DP es disminuir la expresión de CD8, por lo que al interactuar con MHC-II existe una señalización constante y fuerte de CD4, lo que activa al factor de transcripción (FT) ThPOK, este FT apaga de manera definitiva el gen CD8, convirtiendo a la célula en CD4 o T helper (CD4+). Por otra parte, si la célula DP interactúa con MHC-I, nota la falta de señal de CD8 por la disminución natural del coreceptor, por lo que la célula interpreta que la señal de CD4 no es funcional (Sun *et al.*, 2023).

Las células T CD8+ citotóxicas son las principales efectores de la eliminación de células tumorales en la inmunidad adaptativa. Reconocen péptidos tumorales presentados por moléculas HLA-I en la superficie de las células leucémicas a través de su TCR específico, y eliminan las células diana mediante dos mecanismos principales: la exocitosis de gránulos citotóxicos que contienen perforinas y granzimas y la activación de la vía Fas-FasL, que desencadena la apoptosis por la unión del FasL (CD95L) expresado en la CTL con el Fas (CD95) de la célula target. En la LLA, la respuesta de las CTL está frecuentemente comprometida por la reducción de la expresión de HLA-I, la sobreexpresión de ligandos inhibidores (PD-L1) y el agotamiento (exhaustivo) de las CTL inducido por la estimulación antigénica crónica en el microambiente tumoral (Strazza, 2024).

2.9.1 Evasión del sistema inmune

Las células leucémicas han desarrollado múltiples y sofisticados mecanismos para evadir la vigilancia del sistema inmune, lo que constituye uno de los principales obstáculos para el control definitivo de la enfermedad. La pérdida de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (HLA-I) es uno de los mecanismos más frecuentes y mejor documentados en la LLA, observada en el 60-

90% de los casos, incluso antes del inicio del tratamiento. Esta reducción impide que las células T CD8+ citotóxicas reconozcan los péptidos tumorales presentes en la superficie de las células leucémicas, lo que genera un entorno de invisibilidad inmunológica. Las mutaciones o deleciones en los genes B2M (beta-2-microglobulina) o en los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C son algunos de los mecanismos genéticos responsables de esta pérdida (Zhang, 2025; Meyer., *et al*, 2019).

La expresión de moléculas no canónicas de HLA, como HLA-E y HLA-G, constituye un mecanismo adicional de evasión. HLA-G, normalmente expresado en la interfaz materno-fetal para inducir tolerancia inmune, ha sido encontrado sobreexpresado en diversas neoplasias hematológicas, incluyendo la LLA. Su unión a los receptores inhibidores ILT2 (LILRB1) e ILT4 (LILRB2) en células T, NK y células dendríticas suprime su actividad antitumoral. HLA-E, por su parte, se une al receptor NKG2A/CD94 en células NK y células T CD8+, transmitiendo una señal inhibidora que reduce su actividad citotóxica. Estas estrategias de mimetismo inmune permiten a las células leucémicas escapar tanto de la respuesta innata como de la adaptativa (Zhang *et al.*, 2025; Tufail *et al.*, 2025)

Los puntos de control inmune son reguladores fisiológicos de la respuesta inmune que previenen la autoinmunidad, pero que son frecuentemente aprovechados por las células tumorales para suprimir la respuesta antitumoral. En la LLA, la expresión de PD-L1 (CD274) en las células leucémicas y en las células del estroma medular inhibe la actividad de las células T CD8+ mediante su interacción con el receptor PD-1 (CD279), induciendo un estado de agotamiento que se caracteriza por la pérdida progresiva de la capacidad citotóxica, la proliferación y la producción de citocinas efectoras. Las vías TIM-3/CEACAM1, TIGIT/CD155 y LAG-3/MHC-II son otros puntos de control con relevancia creciente en la LLA. Los inhibidores de PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) y de CTLA-4 (ipilimumab) están siendo evaluados en ensayos clínicos en combinación con quimioterapia o inmunoterapias específicas (Tufail *et al.*, 2025)

Los macrófagos asociados al tumor (TAM) en el microambiente de la médula ósea adoptan un fenotipo M2 polarizado (tolerogénico) en respuesta a las citocinas secretadas por las células leucémicas y el estroma, entre ellas IL-4, IL-13, IL-10 y TGF- β . Los macrófagos M2 suprimen la actividad de las células T CD8+ mediante la producción de IL-10, TGF- β y la expresión de PD-L1 en su superficie, y secretan

factores proangiogénicos como VEGF que promueven la vascularización del tumor. La reprogramación de los TAM hacia un fenotipo M1 proinflamatorio y antitumoral, mediante el uso de inhibidores de CD47 ('señal no comerme') o de inhibidores de CSF-1R, es una estrategia terapéutica en investigación activa (Tufail *et al.*, 2025)

El desarrollo de inmunoterapias específicas para la LLA ha representado uno de los avances más significativos en oncología hematológica de la última década. Las células CAR-T (linfocitos T con receptor quimérico de antígeno) dirigidas contra CD19 han demostrado tasas de remisión completa del 70-90% en LLA-B pediátrica en etapas de recaída o refractaria, llevando a la aprobación del tisagenlecleucel (Kymriah) por la FDA en 2017 para pacientes de hasta 25 años. (Zhang, 2025).

HIPÓTESIS

La exposición a citarabina en células leucémicas co-cultivadas con esferoides de células estromales de la médula ósea, induce la activación de mecanismos de respuesta contra el fármaco, lo cual se evidenciará mediante diferencias en los perfiles proteómicos.

JUSTIFICACIÓN

La interacción de varios tipos de células, como las células estromales mesenquimales, en el microambiente de la médula ósea, contribuyen a la quimiorresistencia de las células leucémicas que se refugian en ese sitio.

Los co-cultivos 3D, permiten replicar las interacciones microambientales de la médula ósea de manera más cercana al entorno in vivo en comparación con los monocultivos o los co-cultivos 2D.

Las herramientas proteómicas, como la espectrometría de masas, permiten obtener un panorama general de los procesos celulares diferencialmente regulados en las condiciones experimentales como lo son co-cultivos 3D con fármaco (citarabina) y sin fármaco.

OBJETIVOS

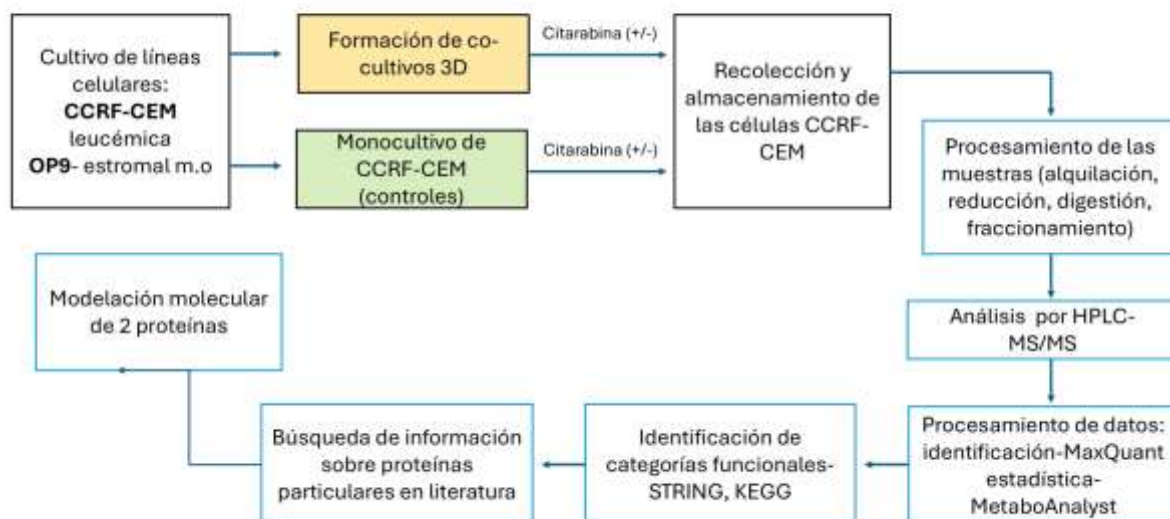
Objetivo general

Identificar los cambios proteómicos de células leucémicas co-cultivadas con células estromales de la médula ósea.

Objetivos particulares

- I. Determinar la viabilidad de las células leucémicas del co-cultivo expuestas a la citarabina.
- II. Identificar cambios en los perfiles proteómicos de células leucémicas co-cultivadas en presencia y ausencia de citarabina.
- III. Identificar y seleccionar las proteínas de interés, relacionadas con la leucemia, provenientes de los análisis proteómicos.
- IV. Evaluar las interacciones proteína-proteína de las proteínas de interés identificadas en el objetivo 3 al igual que su interacción con citarabina mediante herramientas de modelado y acoplamiento molecular.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivo Celular

Se usaron dos líneas celulares en el presente estudio: CCRF-CEM (linfocitos T de LLA) y OP-9 (células estromales de médula ósea de ratón). Las células CCRF-CEM se cultivaron en medio RPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% L-glutamina, y 1% antibiótico-antimicótico; Las células OP-9 se cultivaron en medio MEM-Alpha con las mismas condiciones de suplementación. Ambas líneas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

7.1.2 Generación del Co-cultivo 3D

Para evitar la adhesión de OP-9, las placas de 96 pozos se recubrieron con agarosa al 1% y se irradiaron con luz UV por 15 minutos. Las células OP-9 se desprendieron con tripsina-EDTA (0.05%), se contaron utilizando una cámara de Neubauer y se observaron bajo el microscopio. En cada pozo, se colocaron 50,000 células OP-9 las cuales se incubaron a 37°C de 5% CO₂ durante 24 h para formar esferoides. Posteriormente, se seleccionaron los esferoides viables, esféricos y no fragmentados a través de microscopía óptica y se añadieron 25,000 células CCRF-CEM, y se incubaron nuevamente por 22 h en las mismas condiciones.

7.2. Exposición a citarabina y evaluación de viabilidad celular

Una vez formados los co-cultivos, para observar el efecto del fármaco sobre la viabilidad, se adicionó al pozo citarabina en diferentes concentraciones (0nM - 500nM) en los esferoides y en las células CCRF-CEM en monocultivo, el cual también, tenía previamente una capa de agarosa al 1%, se incubaron por 23 h, una vez pasado el tiempo, las células en monocultivo y co-cultivo se filtraron con ayuda de un multi C-Strainer de 40 μ m para separar las dos líneas celulares, se lavaron los esferoides con solución salina de fosfatos al 1X (PBS) durante la separación con el filtro para recolectar todas las células CCRF-CEM con el tratamiento, se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió en medio RPMI suplementado, se evaluó la viabilidad de las células CCRF-CEM, con el kit de proliferación celular I (MTT) en donde a cada pozo por cada 100ul, se le agregó 10ul de reactivo MTT se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ durante 4 horas, una vez pasado el tiempo, se adicionó 100ul del buffer de solubilización, se volvió a incubar a 37 °C con 5% de CO₂ toda la noche hasta su lectura correspondiente. Las placas se leyeron a 570nM. Se escogió la concentración de citarabina en la que se observó la mayor diferencia de viabilidad entre células co-cultivadas y monocultivadas, siempre que las células co-cultivadas mantengan viabilidad mayor al 80%. Una vez que se obtuvo la concentración del fármaco (100nM), la citarabina se añadió en los co-cultivos necesarios y se incubaron por 23 h y se colectaron como se describió con anterioridad.

7.3. Producción de biomasa para análisis proteómico

Se repitió la metodología descrita en los puntos 7.1-7.3 hasta completar aproximadamente cuatro millones de células por cada condición: células leucémicas de monocultivo sin fármaco y con fármaco, al igual que las células leucémicas provenientes del co-cultivo sin estímulo de citarabina y con citarabina. Las muestras se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. Debido a la limitante del experimento, la producción de biomasa se realizó en diferentes semanas, para recolectar los millones necesarios para cada condición establecida, una vez obtenida la cantidad de células, se hicieron tres pool de cada condición para su posterior análisis.

7.4. Extracción y cuantificación de proteínas por turbidimetría

Las proteínas se extrajeron mediante precipitación con ácido trifluoroacético (TFA) utilizando una proporción 1:4 (peso/volumen) de acuerdo con el peso del botón, el botón se resuspendió hasta que la consistencia fue líquida (Doellinger 2019). Posterior a este paso, se añadió Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris-base) 2M utilizando una proporción 1:10 en relación con el volumen de la muestra con TFA, se midió que el pH estuviera en 11 y se tomó una alícuota para cuantificación de proteínas.

Para la cuantificación de las proteínas se hizo por el método de turbidimetría con MacFarland, para su preparación el cloruro de bario (BaCl_2) al 1% se diluyeron en ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% y se protegió de la luz, hasta su lectura en el espectrofotómetro a 360 nM, primero se realizó lectura de MacFarland y después se hizo la lectura de las muestras correspondientes. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de proteína en cada muestra.

$$\text{Concentración de proteína } \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} = \text{Abs360 de la muestra} * \left(\frac{0.36}{\text{Abs 360 MacFarland3}} \right)$$

7.5 Reducción y alquilación de proteínas

Se agregó tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, 1 M) al lisado para obtener a una concentración final de 10 mM, se incubó a 95°C por 5 minutos, una vez que volvió a tener una temperatura ambiente se agregó iodoacetamida (IAM) para tener una concentración final de 40 mM se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 20 minutos, una vez pasado el tiempo de incubación se midió el pH 8-9.

7.6 Digestión enzimática de proteínas

Se digirieron 3 tubos por cada muestra con alrededor de 303-320 µg de proteína dependiendo de la muestra, se agregó 4 volúmenes de agua para disminuir la concentración de Tris-base, se revisó que el pH estuviera entre 2-3 y se añadió tripsina LysC en relación 1:20 con respecto a los µg de proteína en cada tubo, se dejó incubando a 37°C por 19 horas. Pasado el tiempo, se revisó que el pH estuviera en 2 y se detuvo la digestión con 2% de ácido fórmico (FA).

7.7 Desalado de péptidos

Se preparó agua ultrapura con 0.1% de ácido fórmico (solución A) y la solución B con 60% de acetonitrilo, 40% de agua ultrapura y 0.1% de ácido fórmico.

El cartucho para desalar se activó con 1ml de solución B, posteriormente se equilibró con 2 ml de solución A y se pasó la muestra de péptidos 2 veces por el cartucho, por último, se eluyó en un microtubo nuevo la muestra con 1 ml de solución B y se dejó secar en el speed vac por aproximadamente de 4 horas.

7.8 Fraccionamiento y análisis de péptidos

Los péptidos se fraccionaron con el kit de fraccionamiento en fase inversa y alto pH de Thermo Fisher. Se preparó una solución de equilibrado con TFA al 0.1% y las soluciones de elución se prepararon de acuerdo con la siguiente tabla

Tabla 1: Preparación de buffer de elución

Número de fracción	Porcentaje de acetonitrilo	Acetonitrilo (µl)	Trietilamina
1	5	50	950
2	7.5	75	925
3	10	100	900
4	12.5	125	875
5	15	150	850
6	17.5	175	825
7	20	200	800
8	50	500	500

Los péptidos que se encontraban secos y liofilizados previamente se disolvieron de 10-100 µg en 300 µl de solución equilibrada.

Para activar la columna, se colocó en un microtubo de 2 ml, se removió el tapón de la parte inferior y se centrifugó a 5,000 xg por 2 minutos, descartando el eluato. Posteriormente se agregó 300 µl de acetonitrilo puro y se centrifugó a 500 rpm por 2 minutos, se lavó la columna dos veces con solución de equilibrado y se centrifugó a 500 rpm durante 2 minutos. Para fraccionar los péptidos, se cargó en la columna

300 µl de la muestra y se centrifugó a 3000 xg por 2 minutos, los péptidos se lavaron con 300µl de agua ultrapura, se centrifugaron 5000 xg por dos minutos, posteriormente para fraccionar los péptidos se eluyeron de acuerdo con el contenido de cada fracción descrita en la tabla X y se centrifugó a 3000 xg por 2 minutos en cada fracción, se recolectó y se rotuló con el número de fracción correspondiente, después de eso se secó en el speed vac por aproximadamente 4 horas y se guardó a -80 °C. Se analizaron mediante nano HPLC acoplado a espectrometría de masas en un espectrómetro de tipo Q-TOF, adquiriendo espectros con alta resolución y aplicando un modo de adquisición dependiente de datos como ha sido reportado (Nevárez 2023).

7.8.1 Identificación y cuantificación de proteínas

Para identificar y cuantificar proteínas, se utilizó MaxQuant v1.6.6.0, empleando la base de datos de proteínas de *Homo sapiens* y *Mus musculus* de UniProtKB. La cuantificación libre de etiquetas (LFQ) se realizará con una tasa de descubrimiento falso del 1%.

7.8. Análisis bioinformático y estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizó el software MetaboAnalyst 6.0, en el cual los valores faltantes fueron imputados a una quinta parte del valor positivo mínimo detectado. Posteriormente, los datos se normalizaron por mediana y se transformaron mediante logaritmo base 10 ($\log_{10}$). Las abundancias se compararon usando la prueba de t de Student y el gráfico de volcán (tasa de cambio mayor o igual a 1.5 y valor de p menor o igual a 0.05).

Las listas de proteínas con diferencias significativas en abundancia se analizaron mediante KEGG y STRING, con el objetivo de identificar procesos biológicos y vías metabólicas, para cada condición, los resultados obtenidos fueron corroborados mediante anotaciones de Gene Ontology (GO) para el fortalecimiento de los datos.

RESULTADOS.

8.1 Viabilidad de células en monocultivo

Para conocer la concentración de citarabina a la cual se iban a exponer a las células en co-cultivo y monocultivo, se midió la viabilidad de las células leucémicas en monocultivo a diferentes concentraciones del fármaco (0-500 nM), con la finalidad de determinar la concentración a la que la citarabina afecta la viabilidad celular y establecer una comparación con células leucémicas de co-cultivo. Observamos que la viabilidad de las células en monocultivo a 200nM es de 70% y disminuye de manera dependiente de la concentración del fármaco, sin embargo, a 100nM la viabilidad fue de 89% en monocultivo, sin diferencia estadísticamente significativa en comparación con concentraciones menores y con cultivos sin el fármaco (fig.3 y 4). La concentración a 100nM nos permitió recuperar el 89% de células vivas, con el fin de cumplir nuestra condición de realizar un análisis proteómico sin excesiva contaminación con células muertas y de esta manera observar la respuesta de las células leucémicas al fármaco.

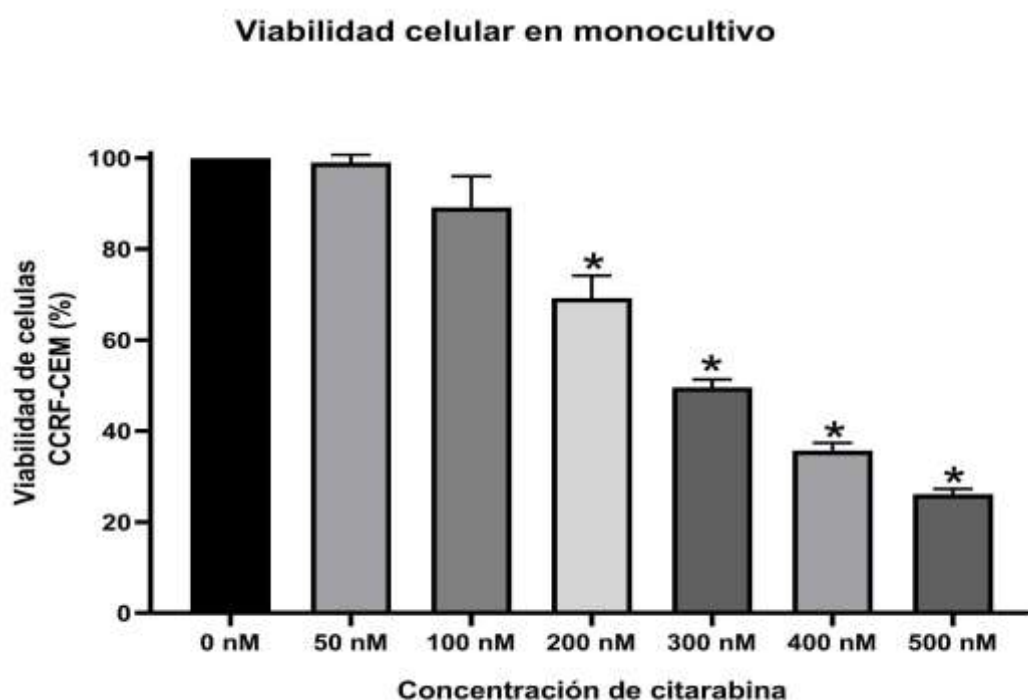


Figura 3 Viabilidad de células leucémicas (CCRF-CEM) en monocultivo

Se muestran diferentes concentraciones de citarabina (0 nM-500 nM) en donde * son estadísticamente significativas respecto a la concentración de 0 nM.

Posteriormente se expuso a las células leucémicas en co-cultivo, a las concentraciones 0-300 nM, se observó que la viabilidad de las células co-cultivadas es igual o cercana al 100% a las concentraciones seleccionadas, de igual manera observamos que en 100nM, la viabilidad es del 100%, dado que, a esa concentración, las células cosechadas de monocultivos muestran alta viabilidad, se eligió esa concentración de citarabina para generar la biomasa que será utilizada para los análisis proteómicos (fig 4).

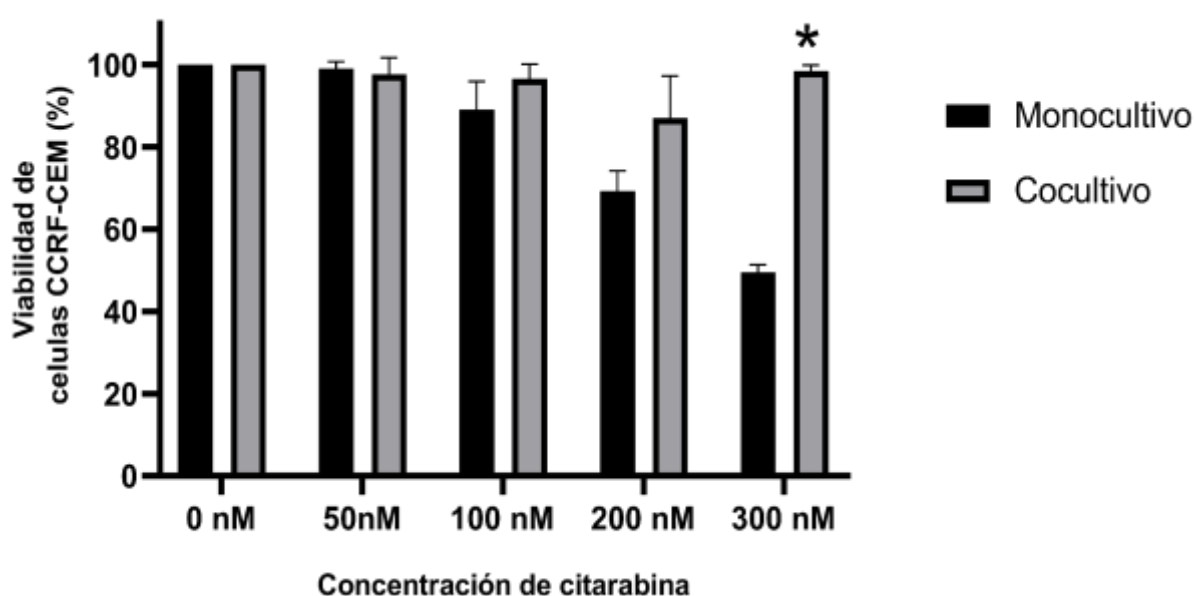


Figura 4 Viabilidad celular

Células leucémicas (CCRF-CEM) en monocultivo a diferentes concentraciones de citarabina (0nM-300nM) (barra negra) y células leucémicas (CCRF-CEM) en co-cultivo 3D con células estromales de la médula ósea (OP-9) a las mismas concentraciones de citarabina (barra gris).

Para conocer la afectación del fármaco a las células estromales en esferoide 3D (OP9) se midió la viabilidad de los esferoides con citarabina a la concentración elegida (100nM) y el control a 0 nM, observamos que no hay un cambio significativo entre la viabilidad de 100 nM y 0 nM de las células OP9 en el esferoide 3D (fig 5).

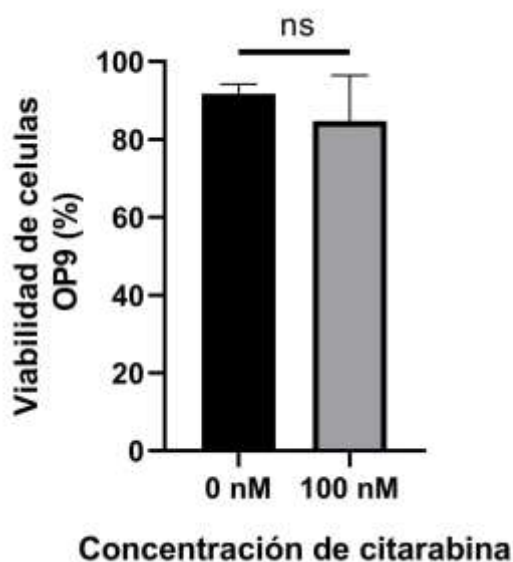


Figura 5 Viabilidad del esferoide 3D

Comparación de la viabilidad de esferoides de células estromales de la médula ósea (OP9) a dos concentraciones 0 y 100 nM

Por otra parte, también observamos la morfología de las células del esferoide, tanto en co-cultivo como en monocultivo, lo que observamos es que no hay disgregación de las células en co-cultivo ni en monocultivo de células estromales a 0 nM ni a 100 nM (fig 6).

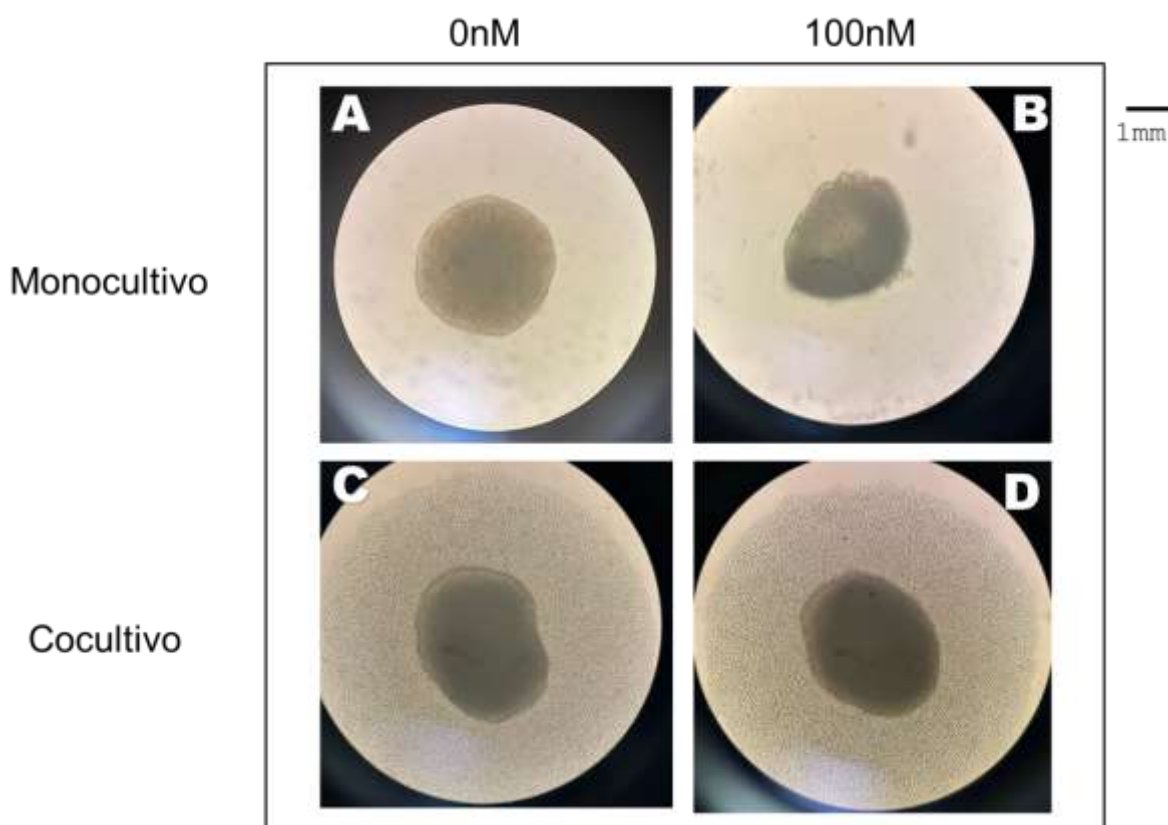


Figura 6 Morfología del esferoide 3D en monocultivos y co-cultivos

A) células estromales de la médula ósea en esferoide 3D a 0 nM de citarabina B) células estromales de la médula ósea en esferoide 3D a 100nM C) co-cultivo de esferoides 3D de células estromales (centro) con células de leucemia linfoblástica aguda (alrededor) a 0 nM D) Co-cultivos de esferoides 3D de células estromales de la médula ósea con células de leucemia linfoblástica aguda expuestas a 100 nM de citarabina-

La concentración a 100 nM nos permitió recuperar el 89% de células vivas, con el fin de cumplir nuestra condición de poder realizar un análisis proteómico sin excesiva contaminación con células muertas y de esta manera observar la respuesta de las células leucémicas al fármaco, se analizó mediante citometría de flujo la pureza de las células leucémicas cosechadas en co-cultivos con células estromales, donde observamos una pureza de 99.97% (fig 7).

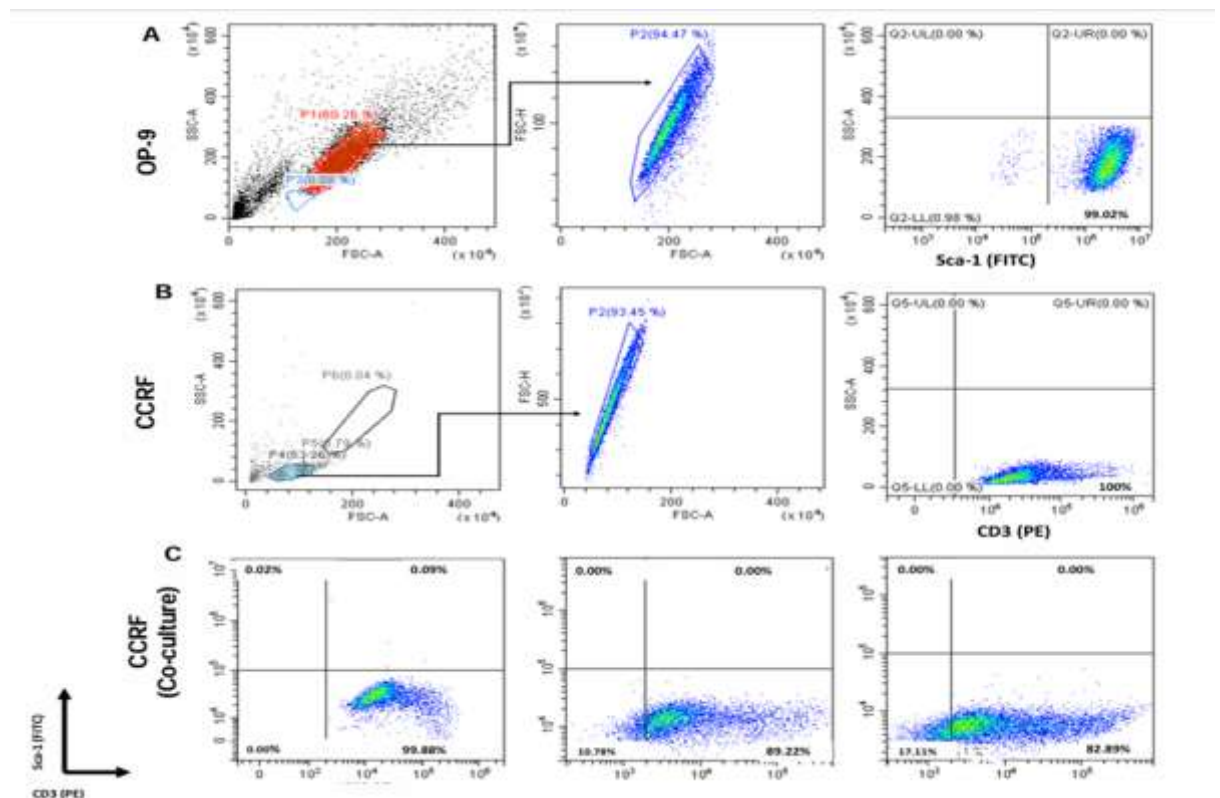


Figura 7 Pureza de las células CCRF-CEM

A) Identificación de las células OP-9 por dispersión frontal (FSC-A) y lateral (SSC-A) para la selección de la población OP-9, seguida de la discriminación de las células individuales o singlets a partir de FSC-H vs FSC-A. Por último, se evaluó la población de células OP-9 que son positivas al anticuerpo Sca-1 **B)** análisis de las células CCRF-CEM utilizando la misma estrategia de la selección celular en el panel A, se evaluó la población de células positivas a CD3, es decir células CCRF-CEM **C)** Pureza de las células CCRF-CEM provenientes de tres co-cultivos 3D con células OP9 independientes, la identificación de células CCRF-CEM son positivas para CD3 y su porcentaje se encuentra en el eje de las X, mientras que las células que podrían ser contaminación de OP9 son positivas a SCA-1 y el porcentaje de células se encuentra en la parte superior de los cuadrantes.

8.2 Generación de células bajo 4 condiciones: para análisis proteómicos,

Se cultivaron alrededor de 4 y 6 millones de células por condición, las condiciones experimentales fueron las siguientes: *i*) monocultivo sin citarabina, *ii*) co-cultivo sin citarabina, *iii*) monocultivo con citarabina y *iv*) co-cultivo con citarabina, estas condiciones se analizaron a través de HPLC acoplado a espectrometría de masas en donde obtuvimos un total de 1440 proteínas totales para la condición *i*, 1437 proteínas totales para la condición *ii*, 1488 proteínas totales para la condición *iii* y 1358 proteínas totales para la condición *iv* (fig.8).

En los diagramas de Venn de todas las proteínas de las cuatro condiciones podemos observar que 42 proteínas son exclusivas de co-cultivo sin el fármaco y 20 proteínas exclusivas de los co-cultivos con citarabina, a su vez comparten 22 proteínas, para las proteínas de monocultivo 75 proteínas son exclusivas de monocultivo con citarabina, y 67 proteínas exclusivas de monocultivo sin citarabina y comparten 27 proteínas entre las dos condiciones.

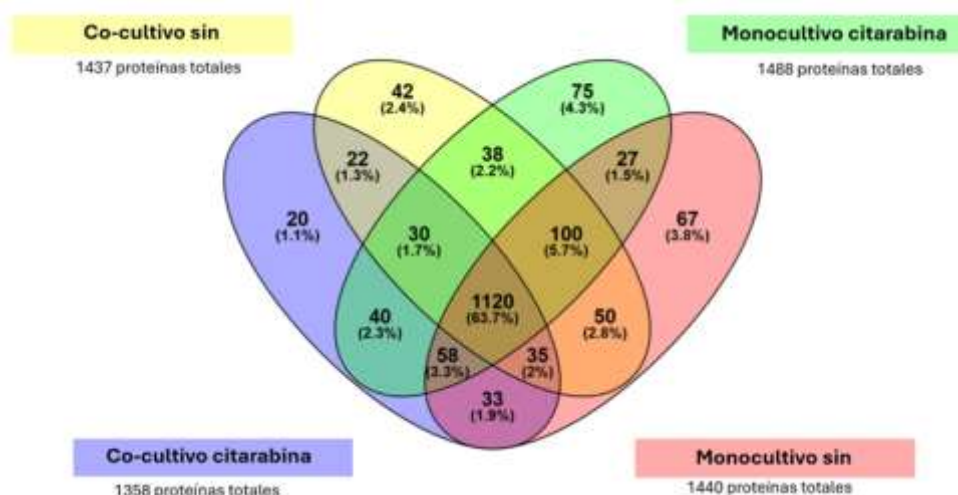


Figura 8 Diagrama de Venn de las proteínas totales en diferentes condiciones experimentales

En donde se obtuvieron: *i*) 1488 proteínas totales de monocultivo sin citarabina *ii*) 1437 proteínas totales de co-cultivo sin citarabina, *iii*) 1488 proteínas totales de monocultivo con citarabina y *iv*) 1358 proteínas totales de co-cultivo con citarabina

8.3 Análisis global de los perfiles proteómicos

Utilizando los datos proteómicos de las cuatro condiciones experimentales, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado representado mediante un mapa de calor (heatmap), con el objetivo de evaluar los cambios en la abundancia de las proteínas entre las distintas condiciones experimentales. Se observaron patrones de expresión diferenciados entre las condiciones tratadas y no tratadas con el fármaco. Asimismo, se observó que las réplicas biológicas de

cada condición se agruparon entre sí, indicando similitud en sus perfiles proteómicos. En el mapa de calor, las proteínas de mayor abundancia se representan en rojo, mientras que las de menor abundancia se muestran en azul (Figura 9).

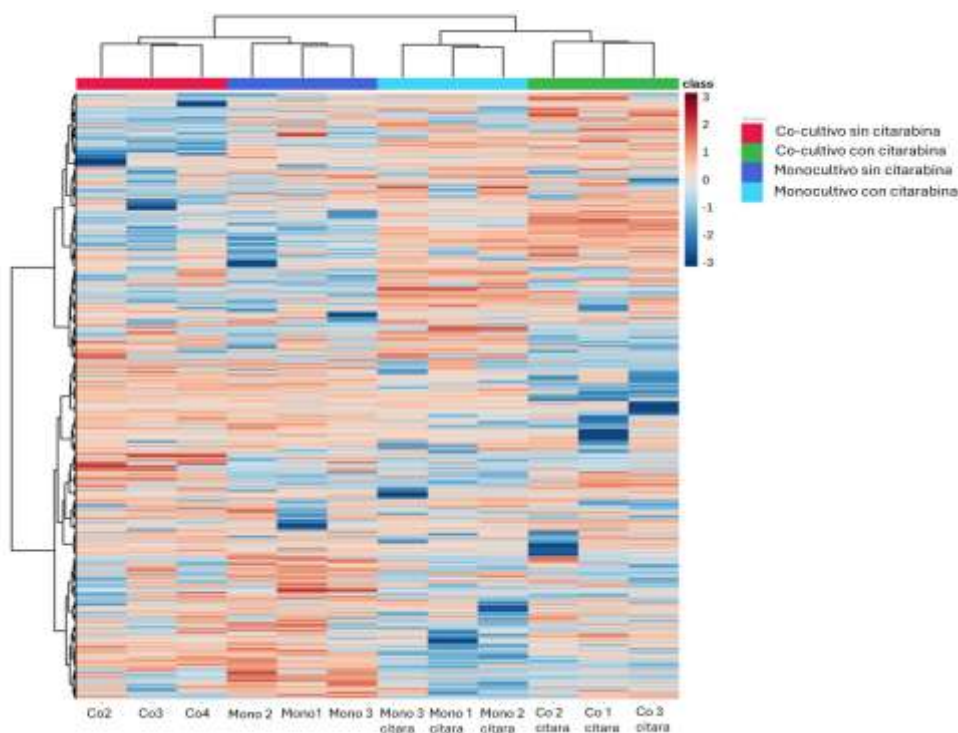


Figura 9 Visión general del agrupamiento del conjunto total de proteínas identificadas en las cuatro condiciones

Mapa de calor de las cuatro condiciones: observamos, del lado derecho, las células en monocultivo y cocultivo tratadas con citarabina, y, a la izquierda, las células tratadas sin el fármaco. Se señalan clústeres con diferencias en abundancias entre las condiciones.

También se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con los datos de las 4 condiciones entre las muestras. En el gráfico se observa una separación en el PC1 de 19.7% y en el PC2 de 13.9% de la variabilidad total, aunque la separación de los dos componentes es baja, el comportamiento que se observa, es frecuente en análisis proteómicos por la alta dimensionalidad de los datos, sin embargo el agrupamiento en las réplicas biológicas y la separación entre condiciones siguieren una diferencia entre ellos (fig. 10). También se puede observar que las condiciones tratadas con citarabina se agrupan del lado derecho, mientras que las condiciones sin tratamiento se agrupan del lado izquierdo y no presentan una separación entre ellas (co-cultivo sin citarabina y monocultivo sin citarabina). Por otra parte, se observa una separación en el PC2 entre los co-cultivos y monocultivos tratados con

citarabina, lo que indica que el tratamiento genera perfiles diferenciales dependiendo del tipo de cultivo (fig. 10).

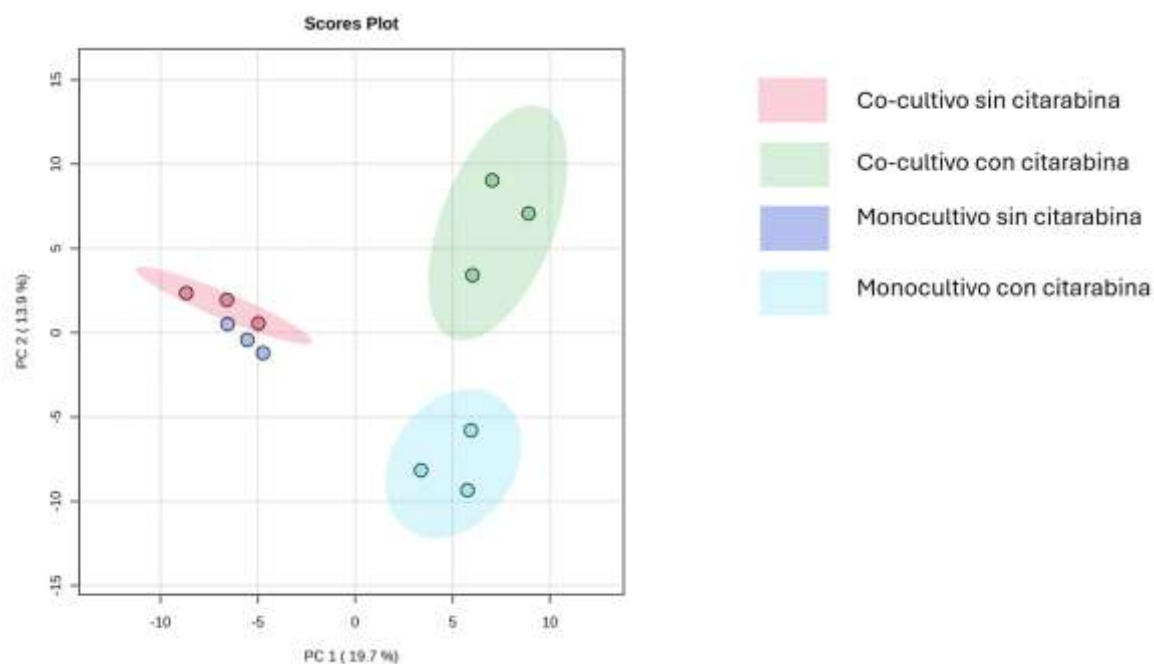


Figura 10 Diagrama de componentes principales (PCA) de las cuatro condiciones en monocultivos y co-cultivos tratados y no tratados con citarabina

Se observa la separación de las células en co-cultivos y monocultivos con respecto a los modelos que no tienen fármacos.

8.4 Análisis de datos por efecto de las células estromales

A pesar de que el principal determinante de las diferencias entre nuestras condiciones experimentales fue la presencia de citarabina, sí se destacaron proteínas con diferencias significativas en abundancia determinada por el tipo de cultivo. Para comparar la abundancia de las proteínas identificadas, se realizó un volcano plot, en donde se encontraron 35 proteínas sobreexpresadas en el conjunto (co-cultivo con citarabina + co-cultivo sin citarabina) vs (monocultivo con citarabina + monocultivo sin citarabina) y 41 proteínas subexpresadas, menos abundantes en (co-cultivo con citarabina + co-cultivo sin citarabina) (fig.11)

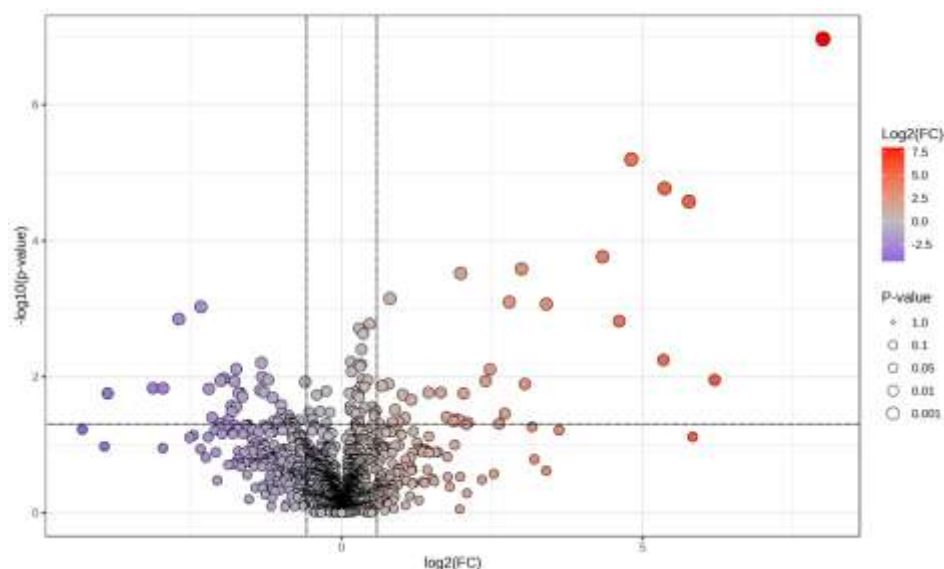


Figura 11 Gráfica volcano plot por efecto del fármaco

De las proteínas totales, al agrupar las muestras por tipo de cultivo y comparar (co-cultivo con citarabina + co-cultivo sin citarabina) vs (monocultivo con citarabina + monocultivo sin citarabina), se encontraron 76 proteínas totales con tasa de cambio (fold change) de al menos 1.5 y valor de $p < 0.05$, de las cuales 35 proteínas están subexpresadas (menos abundantes en co-cultivo con citarabina + co-cultivo sin citarabina) y 41 proteínas sobreexpresadas (co-cultivo con citarabina + co-cultivo sin citarabina).

8.5 Análisis de datos por efecto del fármaco

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de las abundancias de proteínas en presencia de citarabina, se realizó un análisis de datos por efecto del fármaco, para esto se hizo un trabajo con una matriz en la que se compararon dos grupos: (co-cultivos con citarabina y monocultivos con citarabina) vs (co-cultivos sin citarabina y monocultivos sin citarabina).

Se llevó a cabo un diagrama de calor, en el que se aprecia la agrupación de las muestras con tratamiento y sin tratamiento, donde las muestras tratadas con citarabina tendieron a agruparse de manera independiente respecto a las muestras no tratadas. Asimismo, se identificaron patrones diferenciales en la abundancia proteica, reflejados por regiones con mayor intensidad en color rojo y menor intensidad en color azul (fig. 12)

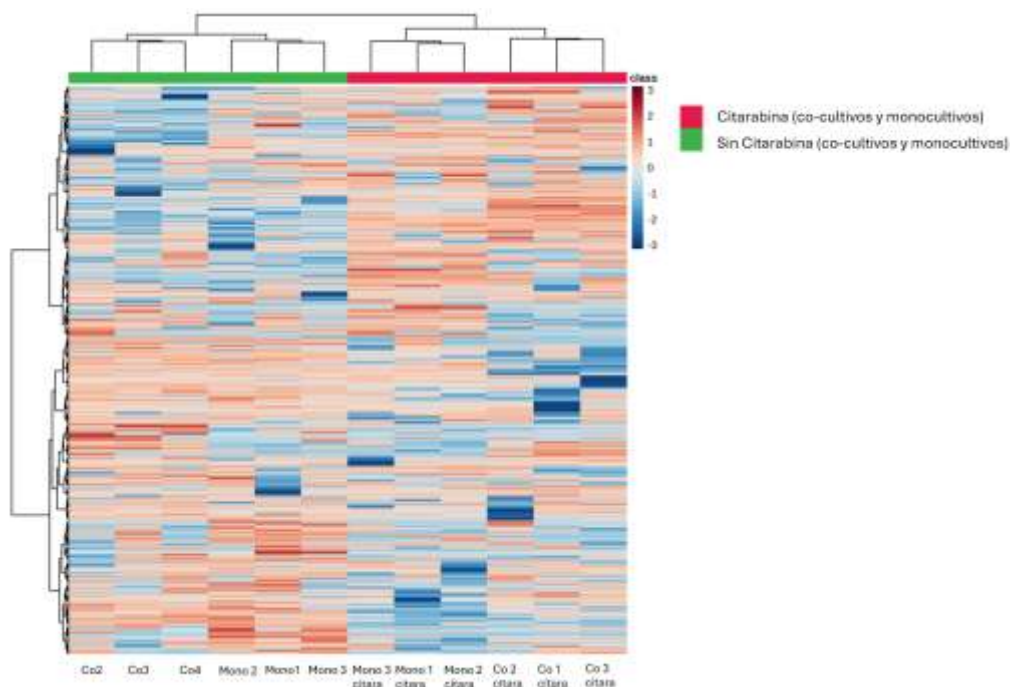


Figura 12 Mapa de calor por efecto del fármaco

Se observa el diagrama de calor en donde la agrupación está dada por los co-cultivos y monocultivos sin citarabina (barra roja) y los co-cultivos y monocultivos sin el fármaco (barra verde), se observan clústeres diferentes en las dos condiciones.

Con el fin de evaluar la variabilidad de los datos, se realizó un diagrama de componentes principales (PCA), en donde se observó una separación por el PC1 entre las muestras tratadas con citarabina y las que no son tratadas, lo que nos indica que el tratamiento produce cambios en el perfil proteómico global, y que a su vez existe una separación entre las muestras con citarabina indicando que los proteomas en co-cultivos y monocultivos se modulan de forma diferente por el tratamiento (fig 13).

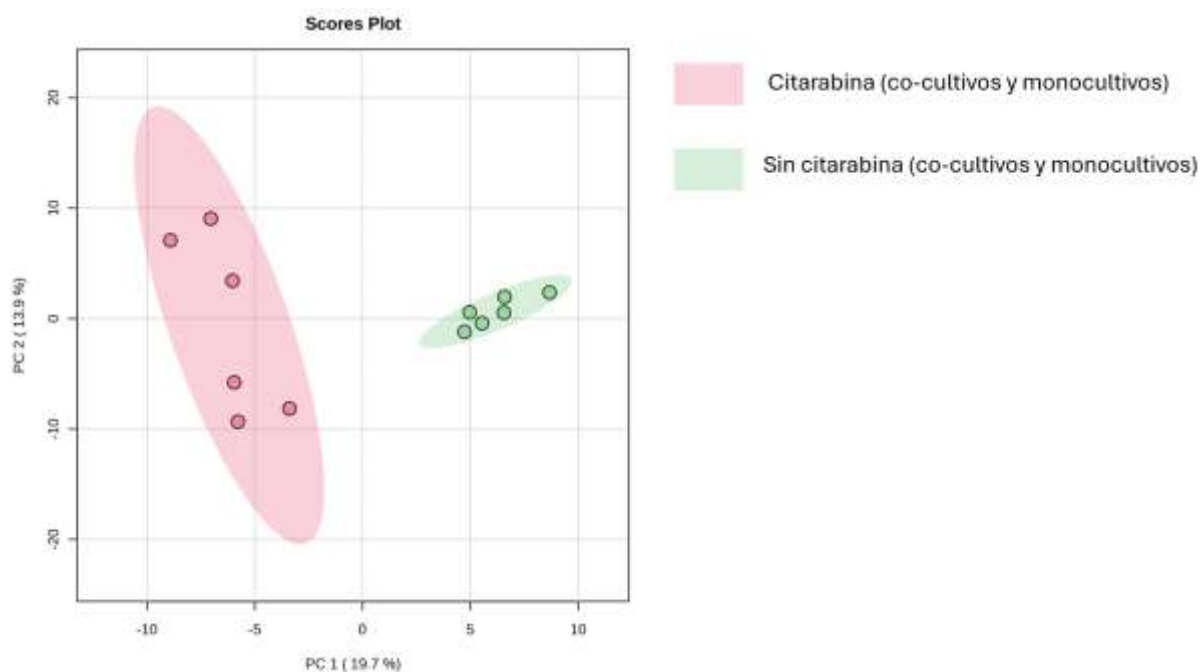


Figura 13 Agrupación general de las proteínas por ausencia o presencia del fármaco

Diagrama de componentes principales en el que se observa la separación, según el PC 1, entre los modelos con citarabina (rosa) y los sin citarabina (verde).

Para comparar la abundancia de las proteínas, también se realizó un volcano plot, donde se obtuvieron 89 proteínas sobreexpresadas: (co-cultivos con citarabina y monocultivos con citarabina) vs (co-cultivos sin citarabina y monocultivos sin citarabina) y 142 proteínas subexpresadas en (co-cultivos con citarabina y monocultivos con citarabina) vs (co-cultivos sin citarabina y monocultivos sin citarabina) (fig. 14)

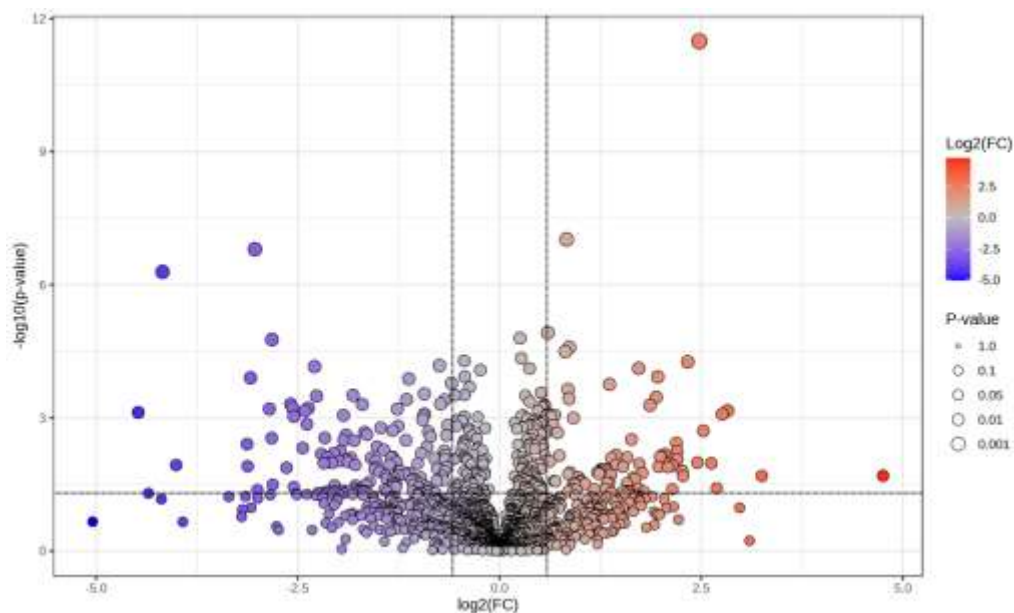


Figura 14 Diagrama volcano plot de las condiciones de (co-cultivos y monocultivos con citarabina) vs (co-cultivos y monocultivos sin citarabina).

Se obtuvieron un total de 231 proteínas con un valor de $p < 0.05$ y un fold change de 1.5, de las cuales 89 proteínas están sobreexpresadas : (co-cultivos con citarabina y monocultivos con citarabina) vs (co-cultivos sin citarabina y monocultivos sin citarabina) y 142 proteínas subexpresadas : (co-cultivos con citarabina y monocultivos con citarabina) vs (co-cultivos sin citarabina y monocultivos sin citarabina).

8.6 Efecto del fármaco en células de co-cultivo

Para estudiar el efecto del fármaco, particularmente en los co-cultivos, se compararon los co-cultivos con citarabina frente a los co-cultivos sin citarabina. En el diagrama de calor podemos observar clústeres en donde hay un evidente cambio en abundancia de las proteínas (fig. 15)

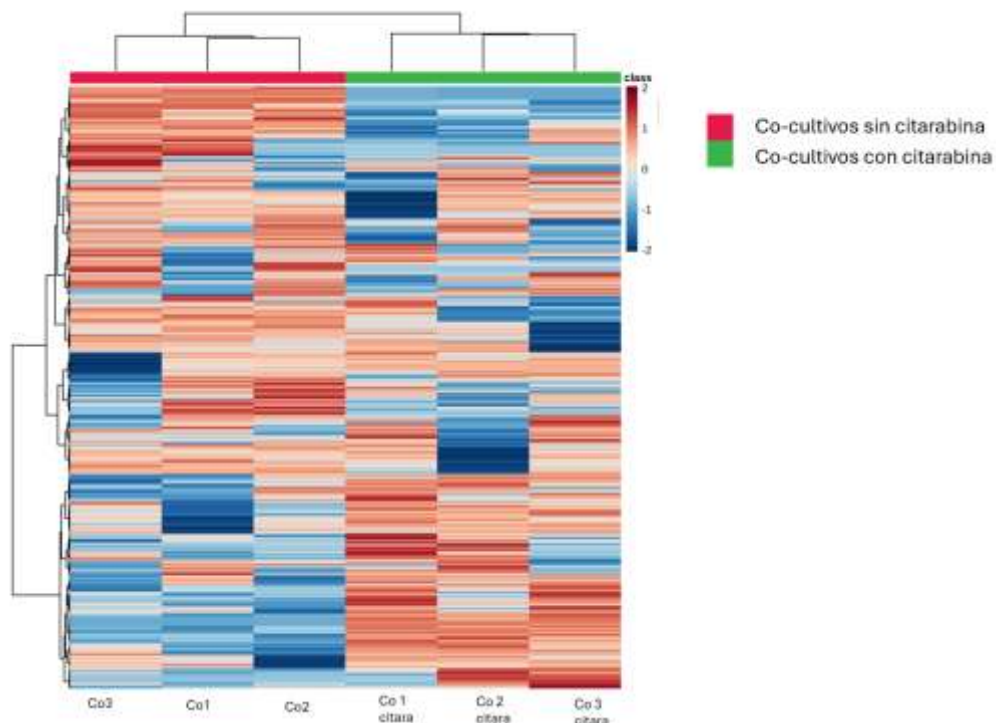


Figura 15 Visualización general de las proteínas en co-cultivos con citarabina y sin citarabina

Diagrama de calor, observamos algunos clústeres con patrones diferentes entre los co-cultivos sin citarabina (barra roja) con respecto a los co-cultivos con citarabina (barra verde).

En el diagrama de componentes principales (PCA) se observó la separación por el PC1 entre las muestras tratadas con citarabina y las que no son tratadas, lo que nos indica que el tratamiento con el fármaco induce cambios en el perfil proteómico global (fig. 16)

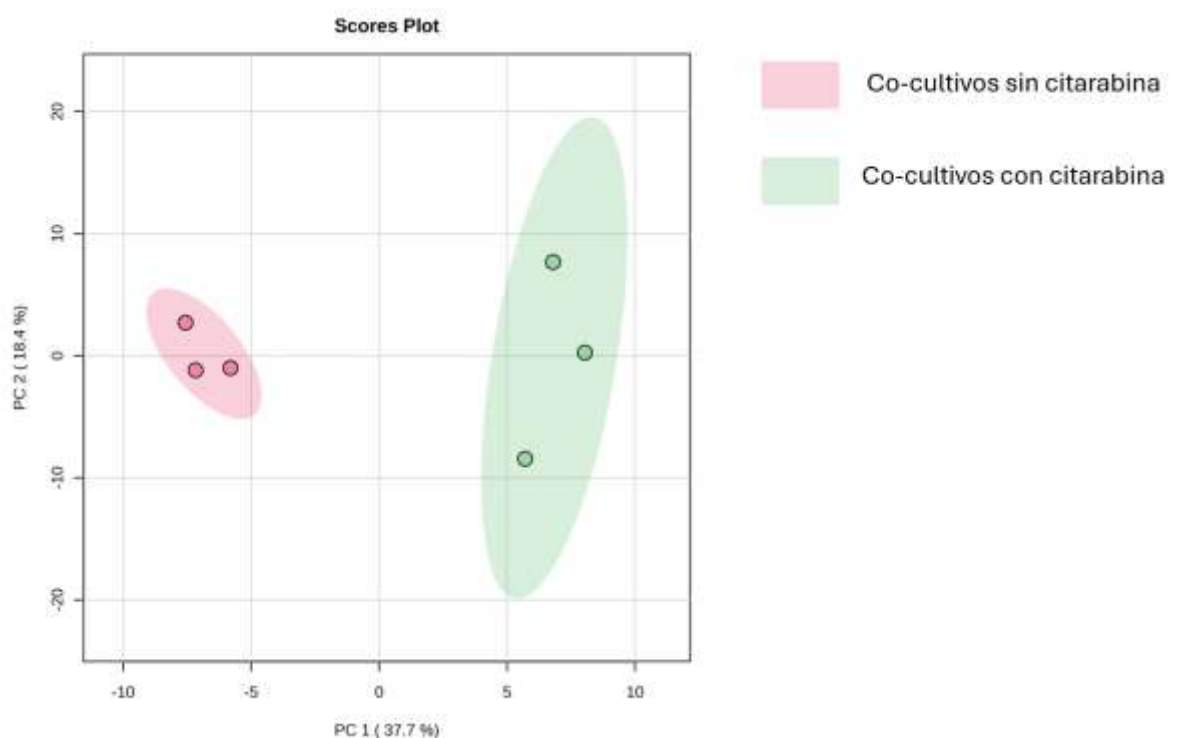


Figura 16 Diagrama de componentes principales en co-cultivos con citarabina y sin citarabina

Observamos la separación por el PC1 de 37.7% de los co-cultivos con citarabina (derecha) y sin citarabina (izquierda).

También se realizó un volcano plot, donde se obtuvieron 89 proteínas sobreexpresadas: co-cultivos con citarabina vs co-cultivos sin citarabina y 142 proteínas subexpresadas en co-cultivos con citarabina vs co-cultivos sin citarabina (fig. 17) .

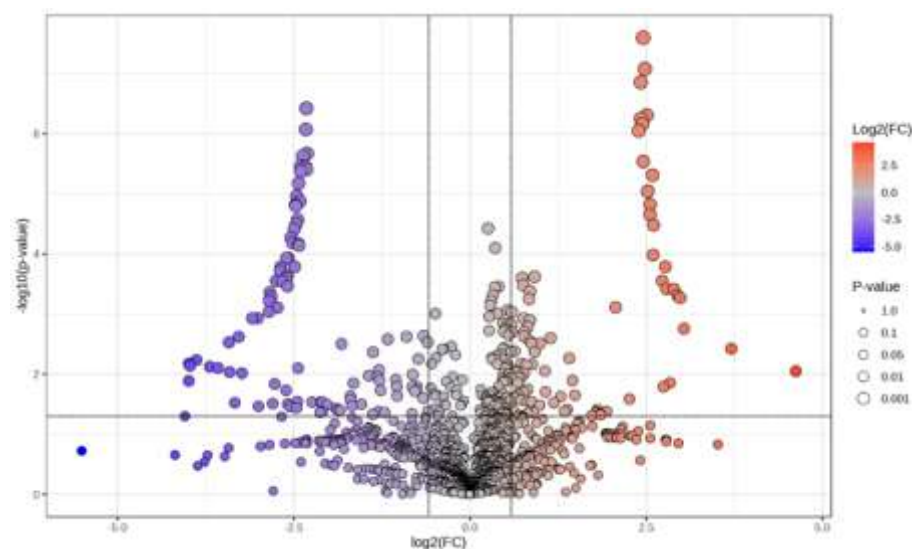


Figura 17 Volcano plot de las proteínas de co-cultivos con presencia y ausencia del fármaco

Se obtuvo un total de 186 proteínas con un fold change mayor o igual a 1.5 y un valor de $p < 0.05$, de las cuales 88 proteínas se encuentran sobreexpresadas en co-cultivo con citarabina vs co-cultivo sin citarabina y 98 proteínas subexpresadas más en co-cultivo con citarabina vs co-cultivo sin citarabina.

Para analizar las categorías de procesos biológicos en los que estaban participando las proteínas sobreexpresadas de co-cultivo con citarabina vs co-cultivo sin citarabina, se realizó un análisis ontológico a través de STRING en donde podemos observar que las proteínas sobreexpresadas en co-cultivo con citarabina, participan en procesos metabólicos como glucólisis, gluconeogénesis, beta-oxidación, procesos metabólicos de ATP, etc (fig 18)

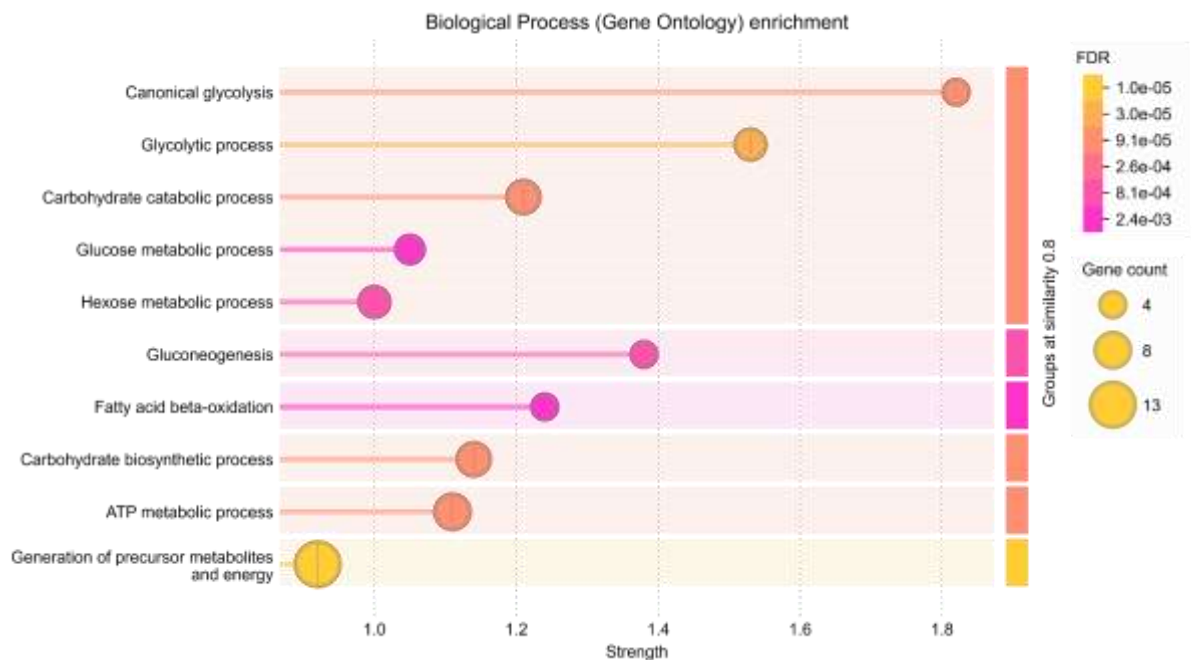


Figura 18 Procesos biológicos de las proteínas sobreexpresadas

Dentro de los procesos biológicos que destacan de las 88 proteínas, se encuentran procesos de glucólisis y metabolismo de la glucosa.

Por otra parte, las proteínas subexpresadas mayormente en co-cultivo con fármaco vs co-cultivo sin fármaco podemos observar procesos biológicos como transporte de mRNA, localización de RNA, expresión de genes, etc (fig 19)

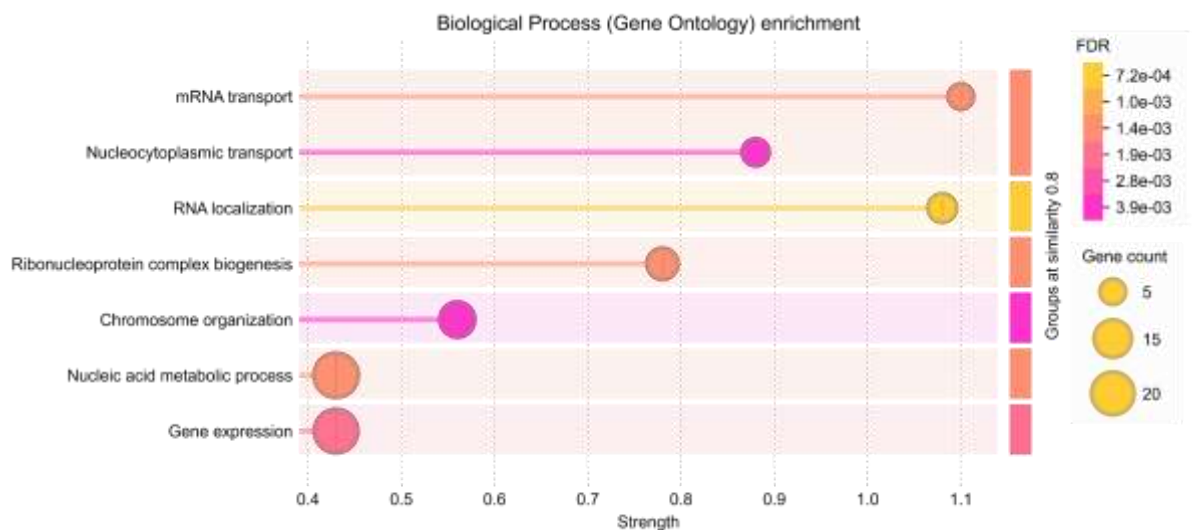


Figura 19 Procesos biológicos de las proteínas subexpresadas

De los procesos biológicos representativos de las 98 proteínas destacan transporte de RNA, localización de RNA, biogénesis de complejos de ribonucleoproteínas, entre otras.

De igual manera el análisis de procesos biológicos, de las proteínas totales sobreexpresadas y subreexpresadas mayormente en co-cultivo con citarabina vs co-cultivo sin citarabina, arrojó como resultado un agrupamiento principalmente en categorías relacionadas con metabolismo de energía como procesos de glucólisis,

procesos metabólicos de glucosa, procesos metabólicos de ATP y generación de metabolitos precursores de energía (fig 20).

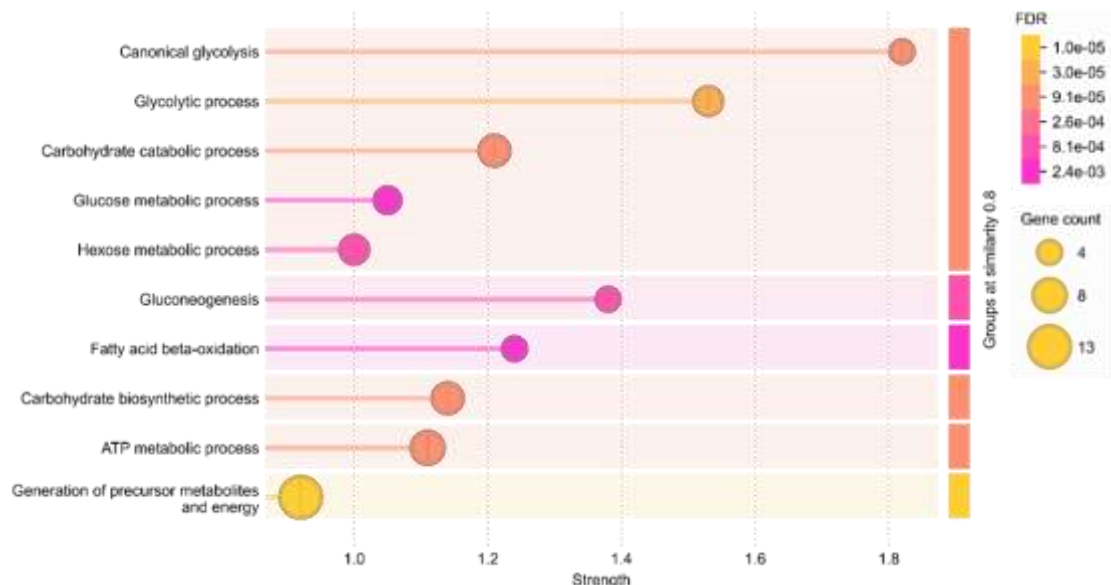


Figura 20 Procesos biológicos de todas las proteínas diferencialmente reguladas

En donde las categorías que sobresalen son relacionadas con procesos metabólicos como la glucólisis, procesos metabólicos de ATP, beta-oxidación, entre otras. En este análisis se alimentaron tanto las proteínas sub- como las sobre-expresadas.

Por otra parte, se realizó un enriquecimiento de vías a través de KEGG, los datos agrupan una sobreexpresión de categorías como: glucólisis, biosíntesis de aminoácidos y metabolismo del carbón (fig. 21).

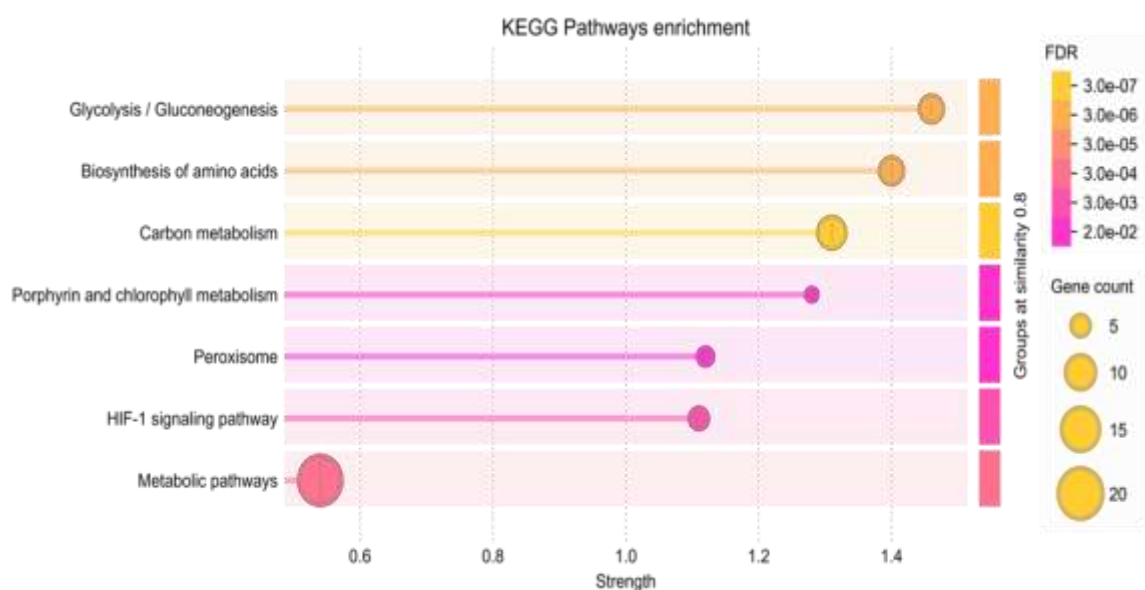


Figura 21 Vía de enriquecimiento de KEGG de los co-cultivos

De todas las proteínas diferencialmente reguladas, destacan vías como la glucólisis/gluconeogénesis, biosíntesis de aminoácidos, metabolismo de carbono, entre otros.

Para conocer las interacciones proteína-proteína se realizó un análisis con STRING, con las proteínas sobrerreguladas y subreguladas en donde observamos diferentes clústeres, dentro del clúster más representativo se encuentra la glucólisis (color rojo), beta oxidación (color salmón), elongación de uso mitótico y componentes del centrosoma (color rosa claro) y proteosoma (color café) (fig. 22)

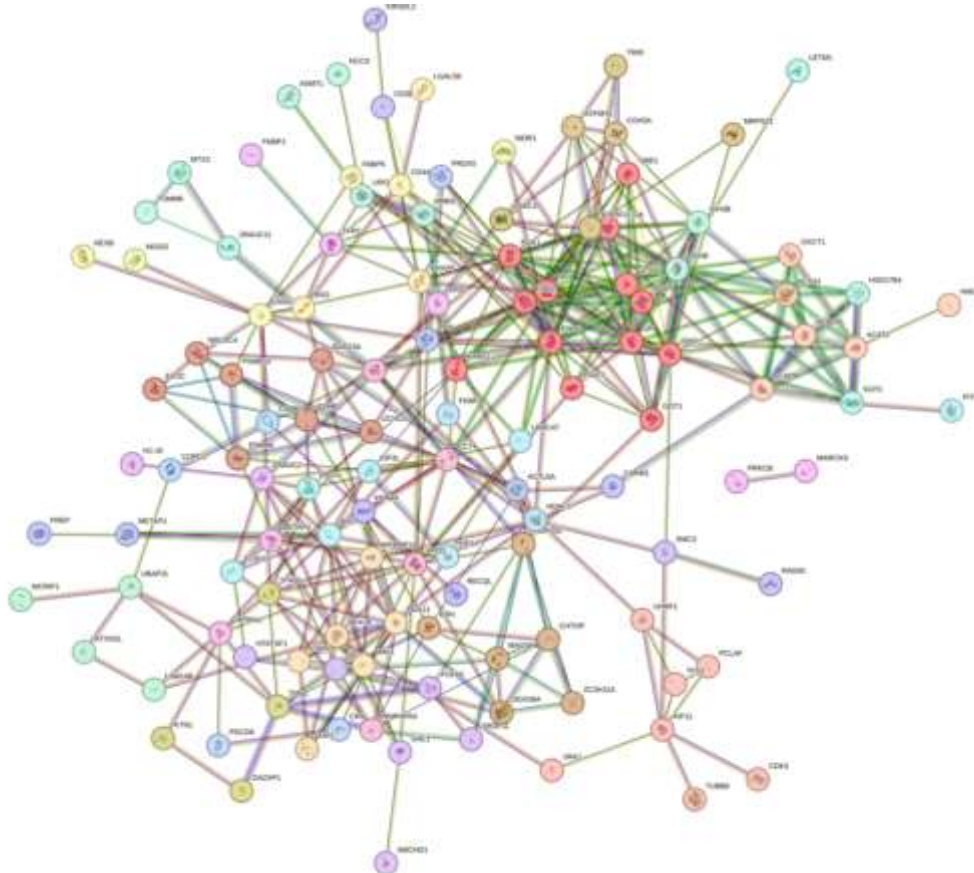


Figura 22 Análisis de interacción proteína-proteína por STRING en co-cultivos

Las 186 proteínas con regulación diferencial en los co-cultivos en presencia y ausencia de citarabina se agruparon en diferentes clústeres, en donde los más representativos son glucólisis (rojo) beta oxidación (color salmón), elongación de uso mitótico y componentes del centrosoma (color rosa claro) y proteosoma (color café).

8.6 Perfil proteómico de monocultivos con citarabina

Para la visualización del efecto de la citarabina sobre la abundancia de las proteínas en las condiciones de monocultivo, se realizó un mapa de diagrama de calor, se observa que hay una agrupación entre las proteínas que tienen el fármaco y las proteínas que no lo tienen. Observamos clústeres diferenciales entre ambas condiciones (fig. 23).

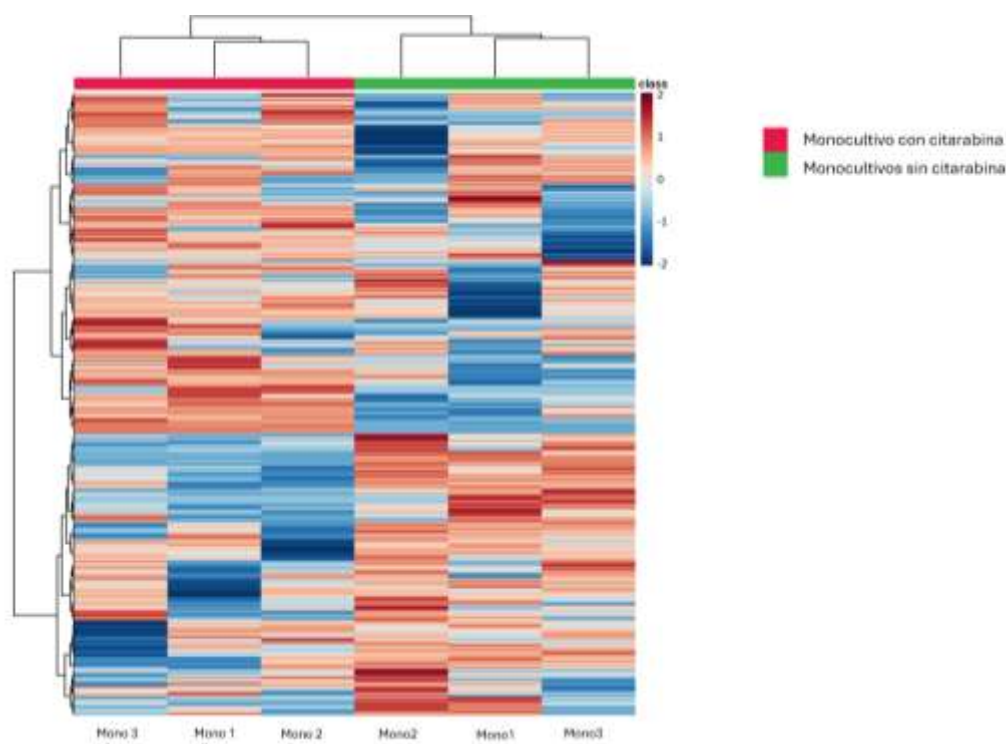


Figura 23 Diagrama de calor de las proteínas de monocultivo

Se observan algunos clústeres con patrones distintos en monocultivo con citarabina (barra roja) en comparación con los monocultivos sin citarabina (barra verde).

De igual manera, se realizó un análisis de componentes principales con la finalidad de evaluar la variabilidad entre los dos grupos. El PC1 explica el 38.4% de la varianza total, lo que nos permite observar la separación de los monocultivos con fármacos de los monocultivos sin citarabina. Por otro lado, el PC2 explicó el 17.7% de la varianza (fig. 24).

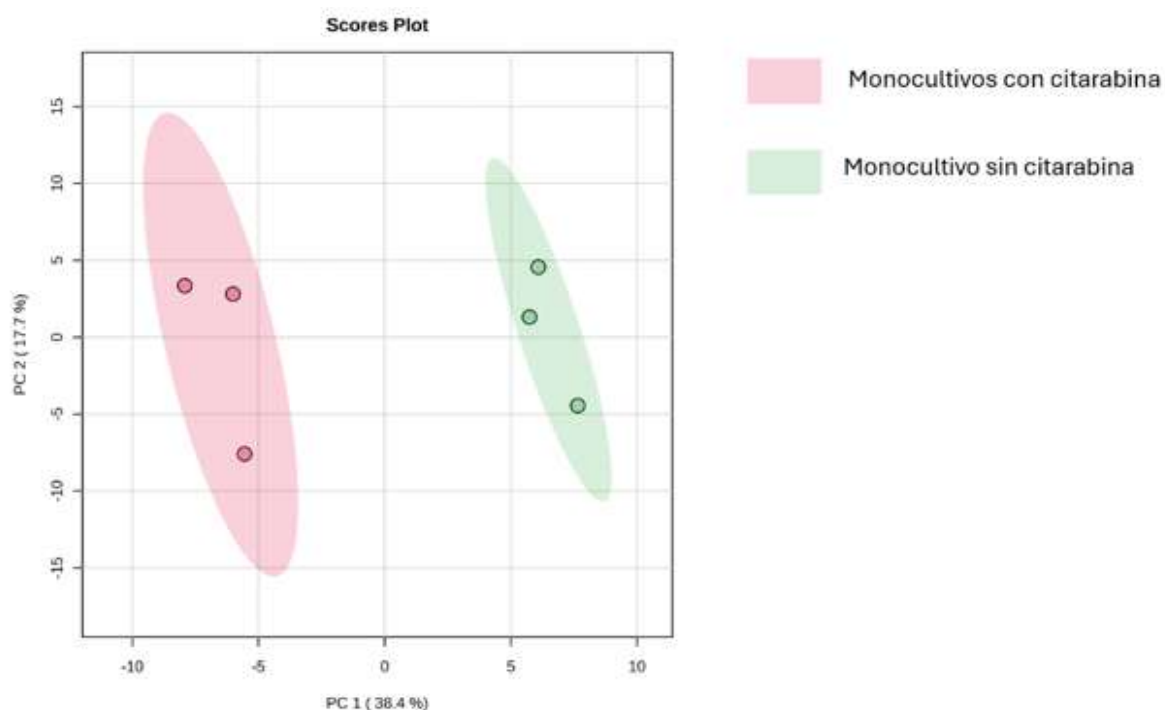


Figura 24 Diagrama de componentes principales de monocultivos tratados y no tratados con citarabina

Donde observamos la separación del primer componente en donde los monocultivos sin citarabina se agrupan del lado derecho y del lado izquierdo del PC1 se agrupan los monocultivos con citarabina.

Con el fin de identificar proteínas diferencialmente abundantes entre las condiciones monocultivos con y sin citarabina, se realizó un análisis mediante volcano plot, donde se obtuvieron 80 proteínas sobrerreguladas en monocultivo con citarabina vs monocultivo sin citarabina y 79 proteínas subreguladas en monocultivo con citarabina vs monocultivo sin citarabina (fig 25)

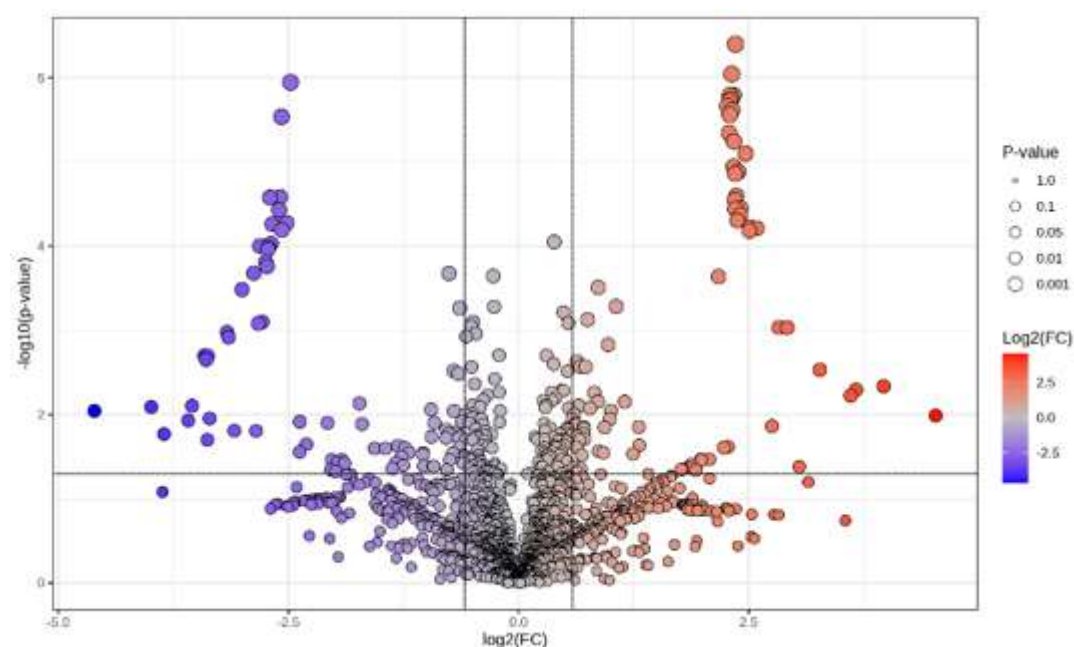


Figura 25 Análisis de PCA y diagrama volcano plot de las proteínas de monocultivos

Las proteínas totales (159) obtenidas del análisis de volcano plot, muestran un fold change de 1.5 y un valor de $p < 0.05$, de las cuales 80 proteínas están sobrerreguladas en monocultivo con citarabina vs monocultivo sin citarabina y 79 subreguladas en monocultivo con citarabina vs monocultivo sin citarabina

A partir de las proteínas subreguladas y sobrerreguladas identificadas en el volcano plot, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para identificar procesos biológicos y vías metabólicas asociadas a la ausencia y presencia del fármaco en las condiciones de monocultivo. De acuerdo a los procesos biológicos, podemos observar un enriquecimiento en procesos biológicos como: corte y empalme de RNA, procesamiento de RNA y procesos metabólicos de RNA, (fig 26)

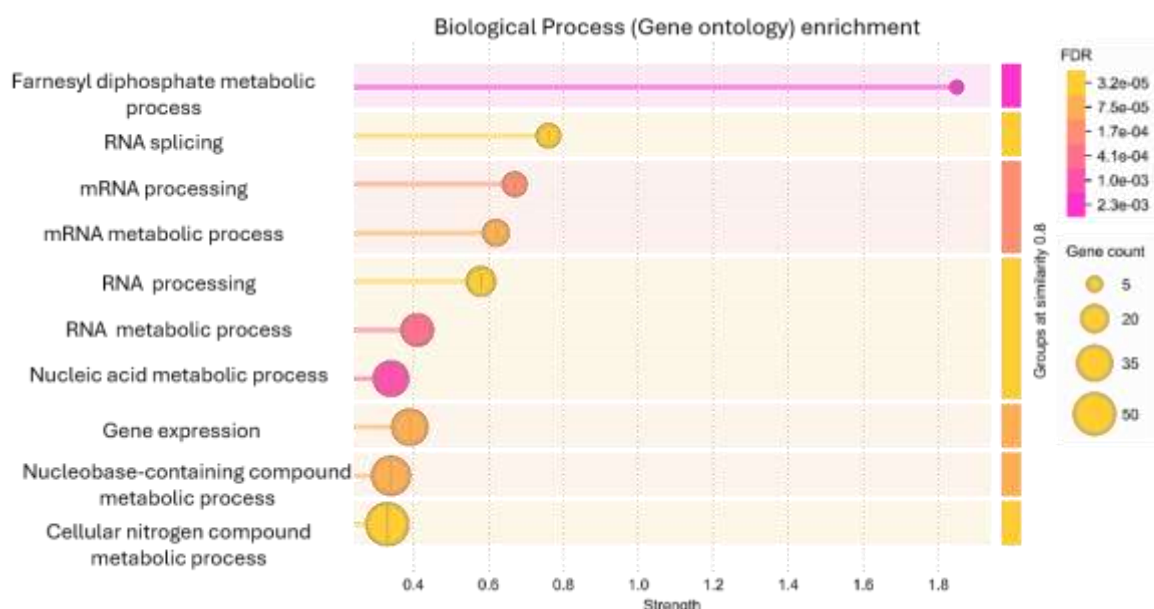


Figura 26 Procesos biológicos en monocultivos con y sin citarabina

Observamos que la comparación entre las proteínas de monocultivo con citarabina vs monocultivo sin citarabina participa en procesos biológicos relacionados con el metabolismo de difosfato farnesil y procesamiento de RNA, al igual que en corte y empalme de RNA.

Por otra parte, la vía de enriquecimiento de KEGG muestra que esta sobrerrepresentado el metabolismo de galactosa (fig 27).

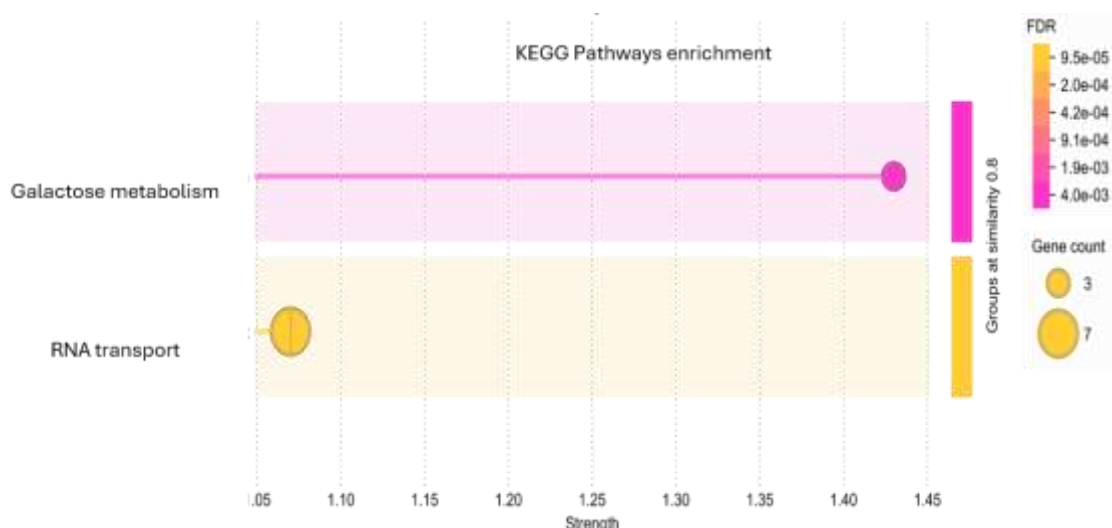


Figura 27 Vías metabólicas de enriquecimiento KEGG en monocultivos con y sin citarabina

La vía de enriquecimiento de KEGG señala un aumento en la degradación de la galactosa.

Con el fin de explorar la posible interacción funcional entre las proteínas diferencialmente abundantes, se realizó un análisis de redes de interacción proteína-proteína en STRING. El análisis arrojó una red altamente interconectada

entre proteínas relacionadas con la regulación por protooncogenes (rosa), una baja expresión de adhesión celular (color café) y de la pausa ribosomal durante la traducción (rojo) (fig. 28).

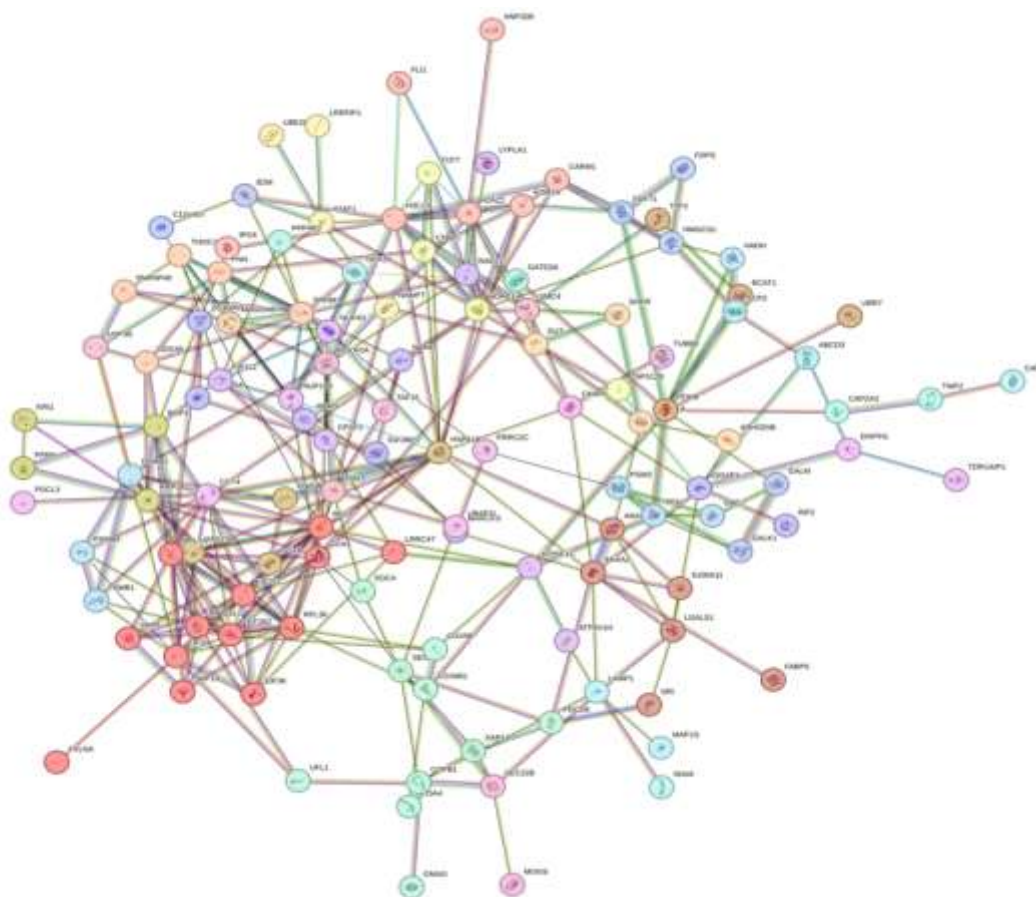


Figura 28 Análisis de interacción proteína-proteína por STRING en monocultivos

Las proteínas totales del volcano plot de los monocultivos con citarabina vs los monocultivos sin citarabina se agruparon en diferentes clústeres como: proteínas relacionadas con regulación por protooncogenes (rosa), una baja expresión de adhesión celular (color café) y pausa ribosomal durante la traducción (rojo).

8.7 Perfil proteómico de la presencia del fármaco.

Si bien la respuesta proteómica a la citarabina es muy diferente entre los co-cultivos y los monocultivos, se intentó buscar coincidencias en las proteínas moduladas. Para ello se realizó un diagrama de Venn de las proteínas que se encontraban reguladas diferencialmente tanto en co-cultivos como monocultivos y se encontraron 25 proteínas que se relacionan con respuesta al estrés, señalización y regulación epigenética, por otra parte 134 proteínas son exclusivas de monocultivo

con fármaco y sin fármaco, las funciones se relacionan con la adhesión celular, pausa ribosomal y regulación de protooncogenes, por último 161 proteínas son exclusivas de los co-cultivos con el fármaco y sin fármaco, de los cuales la función se relaciona con glucólisis, beta oxidación y elongación del huso mitótico (fig 29).

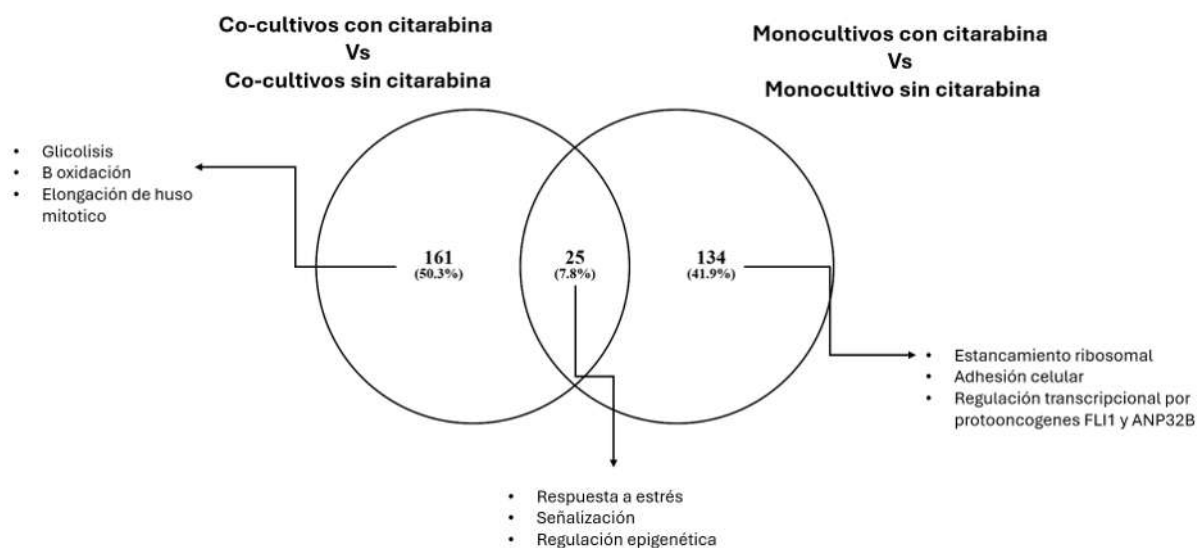


Figura 29 Diagrama de Venn de las proteínas con regulación diferencial en condiciones en monocultivo con y sin fármaco vs cocultivos con y sin fármaco

El 7.8% de las proteínas con regulación diferencial están compartidas y sus funciones están relacionadas con procesos biológicos como respuesta al estrés, señalización y epigenética, mientras que las proteínas exclusivas de cocultivos tienen procesos biológicos relacionados con glucólisis, beta-oxidación y elongación del huso mitótico; por último, las proteínas de monocultivos están relacionadas con estancamiento ribosomal, adhesión celular y regulación transcripcional por protooncogenes.

8.8 Integración de modelos biológicos propuestos

Con la finalidad de integrar todos los datos obtenidos sobre las proteínas diferencialmente reguladas, se proponen cuatro modelos. En el primer modelo se incluyen los cambios proteómicos observados en los co-cultivos con fármaco (fig. 30), y en el segundo modelo se incluyen los cambios proteómicos observados en monocultivos con el fármaco (fig. 31). Podemos observar la respuesta diferente ante la exposición a la citarabina, por una parte, las células leucémicas que estuvieron en co-cultivo activan procesos como glucólisis, beta-oxidación y procesos de síntesis de grupo hemo, de igual manera se sugiere por los datos obtenidos bioinformáticamente, que la señalización en las células co-cultivadas con citarabina es principalmente mediante IL-8 (fig 30). En comparación, en los monocultivos, la presunta activación está dada por TNF α (fig. 31) y la respuesta al

fármaco es principalmente mediada por procesos de corte y empalme de RNA (fig. 31).

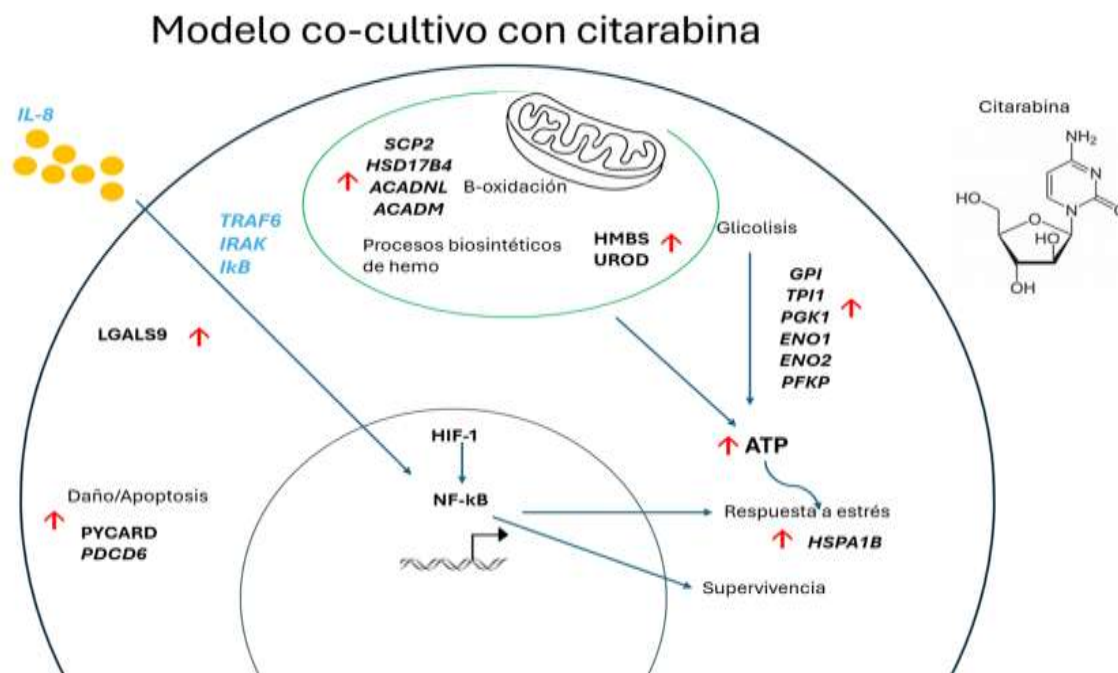


Figura 30 Modelo propuesto de co-cultivo con citarabina

De acuerdo con los análisis bioinformáticos, se construyó el siguiente modelo que representa los posibles mecanismos biológicos asociados a las proteínas de abundancia diferencial. Se observa un incremento de proteínas relacionadas con glucólisis, beta-oxidación y procesos biosintéticos de hemo lo que contribuye a un aumento de síntesis de ATP, la posible participación de IL-8 puede estar asociada con la activación de NF-κB y HIF-1 favoreciendo la supervivencia de las células leucémicas. Las flechas rojas indican mayor abundancia en co-cultivo con citarabina comparada con co-cultivo sin citarabina de las proteínas en letras negras. La activación de las proteínas en letras azules se infirió a partir de análisis bioinformáticos con STRING.

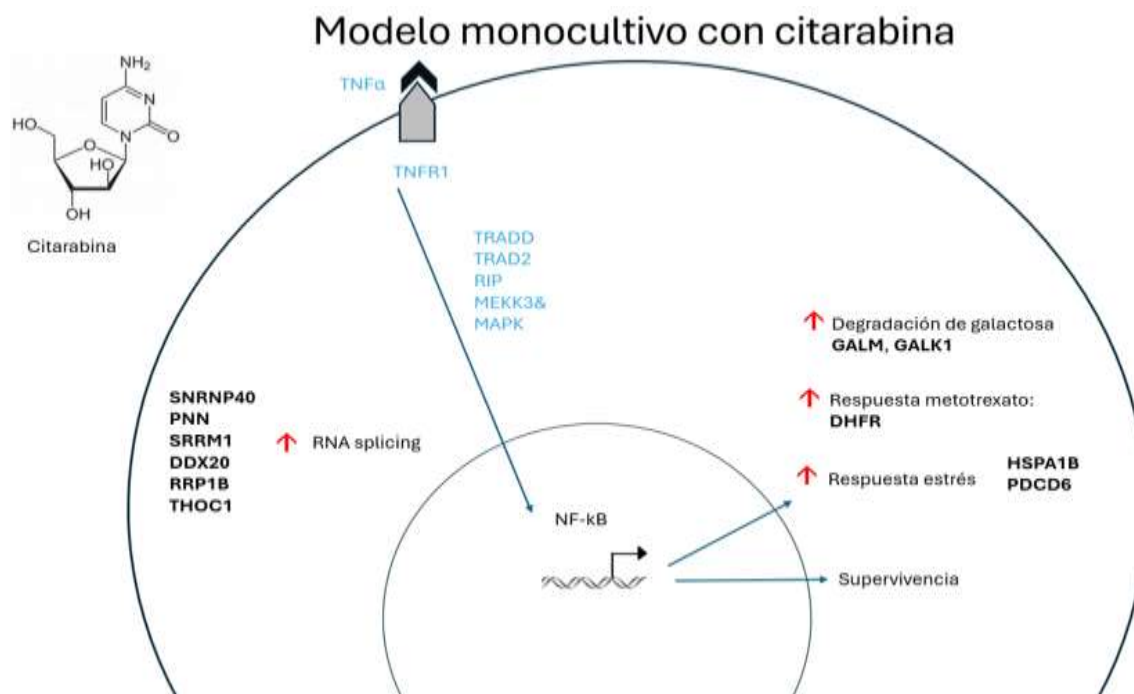


Figura 31 Modelo propuesto del efecto de citarabina en células de monocultivo

El modelo representa los posibles mecanismos biológicos a partir de los datos obtenidos de los análisis bioinformáticos. Observamos la posible participación de TNF- α , asociada a la activación de NF- κ B, aumentando la degradación de galactosa y la respuesta al estrés, lo que puede estar relacionado con la supervivencia de las células. Por otra parte, también encontramos un aumento en el corte y empalme de RNA. Las flechas rojas indican mayor abundancia en mono-cultivo con citarabina comparado con mono-cultivo sin citarabina de las proteínas en letras negras. La activación de las proteínas en letras azules se infirió mediante la literatura.

Otro de los modelos propuestos es el efecto de la citarabina en ambos tipos de cultivos (fig 32), la respuesta celular en ambos modelos podría estar señalizada por CD44 y HLA-C activando respuestas a estrés, elevando la migración y adhesión, al igual que activando la regulación epigenética (fig 32). Por último, se propone un modelo del efecto de las células estromales sobre las células leucémicas co-cultivadas, donde se cree que existe una transferencia de proteínas de las células estromales a las células leucémicas, lo que induce las proteínas glucolíticas, inhibe p53 y activa NF- κ B (fig. 33).

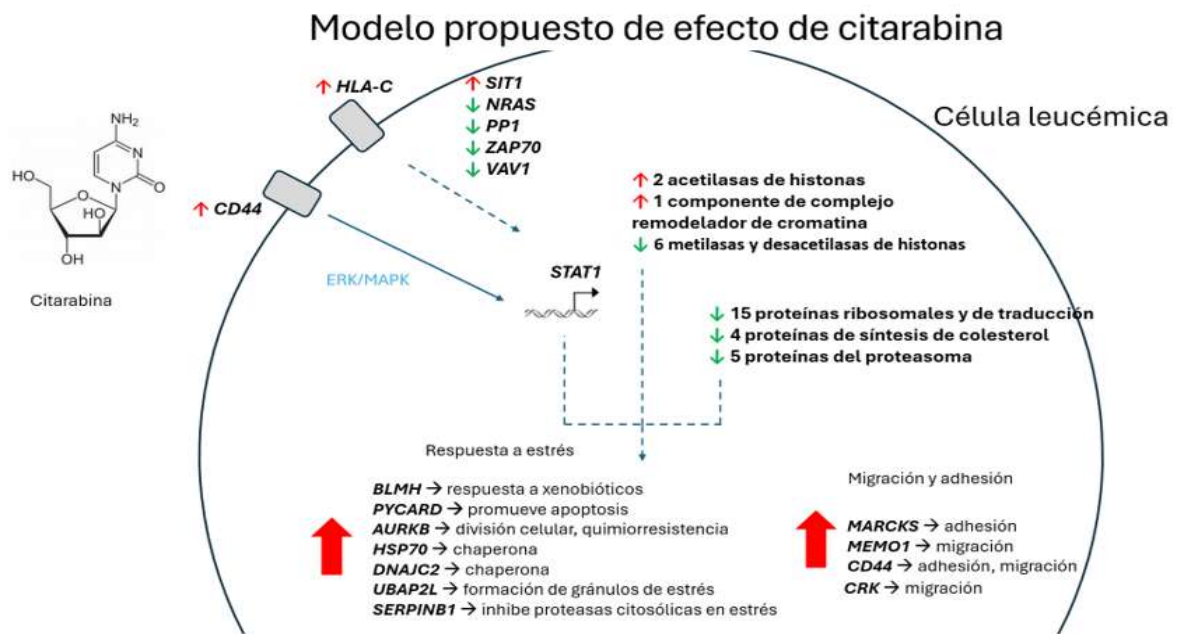


Figura 32 Modelo propuesto del efecto de citarabina en ambos tipos de cultivo de células leucémicas

Con los resultados de los análisis bioinformáticos obtenidos del estudio podemos observar la participación de CD44 y HLA-C en donde se sugiere la activación de STAT1 y con ello el aumento de respuestas a estrés, migración y adhesión celular al igual que procesos epigenéticos, que podrían explicar en general la respuesta de la célula ante el fármaco. Las flechas rojas indican mayor abundancia en células en presencia de citarabina comparada con células sin citarabina de las proteínas en letras negras. Las flechas verdes indican una relación de abundancia opuesta. La activación de las proteínas en letras azules se infirió mediante análisis bioinformáticos con STRING.

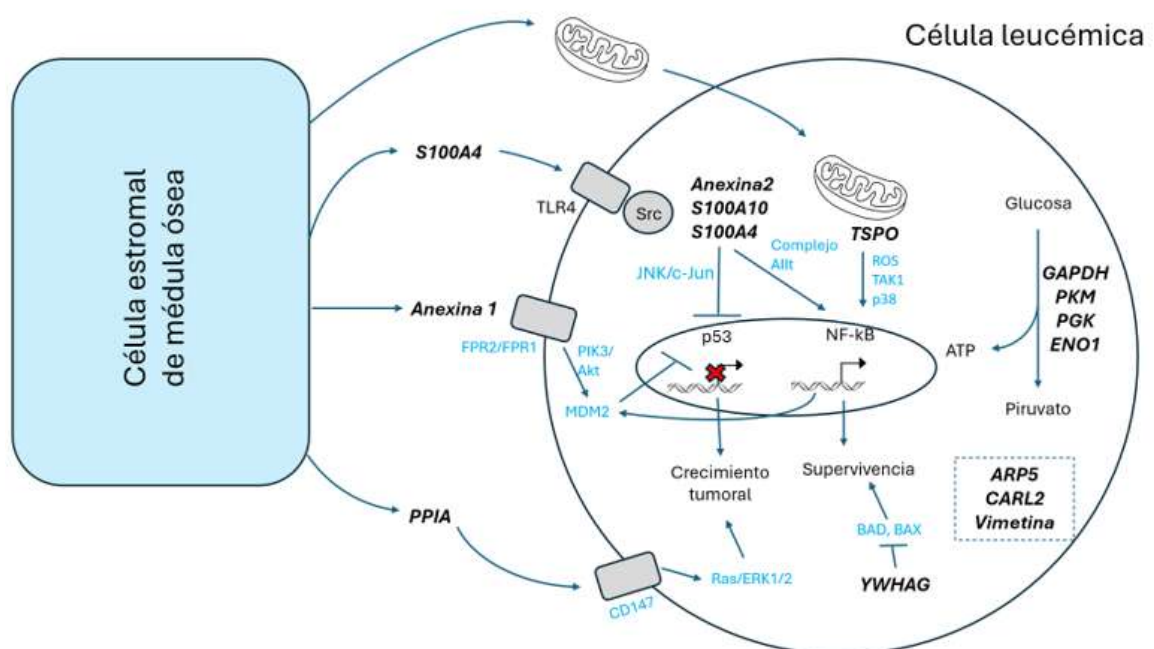


Figura 33 Modelo propuesto del efecto de las células estromales en las células leucémicas co-cultivadas

Con los datos bioinformáticos obtenidos observamos transferencia de proteínas de las células estromales a las células leucémicas (PPIA, anexina 1, S100A4 y mitocondrias) se sugiere que estas proteínas pueden inhibir a p53 y activar a NF-κB induciendo el crecimiento tumoral y la supervivencia de las células leucémicas, por otro lado, observamos un incremento de proteínas relacionadas a la degradación de glucosa lo que podría reforzar la supervivencia de las células (las proteínas transferidas e inducidas se representan en letras negras y fueron detectadas en los análisis proteómicos). La activación de las proteínas en letras azules se infirió mediante análisis bioinformáticos con STRING.

8.9 Acoplamiento molecular

La transferencia intercelular de la proteína S100A4 y la señalización de supervivencia del complejo S100A4-Anexina 2 (fig 33), representan un hallazgo que puede ser relevante en la quimiorresistencia mediada por el microambiente tumoral. Por ello, se realizó un análisis más profundo para explorar la posible modulación de ese complejo señalizador por citarabina. El acoplamiento molecular mostró que la citarabina presentó una mayor afinidad teórica por la anexina 2 (−7.4 kcal/mol) que por la S100A4 (−4.5 kcal/mol). En la anexina 2, el ligando se ubicó en la interfaz de dimerización entre las cadenas A y B, mientras que en S100A4 se localizó en la hélice 3 y en la región bisagra. Los residuos que conforman los sitios de interacción se muestran en las figuras 34 y 35

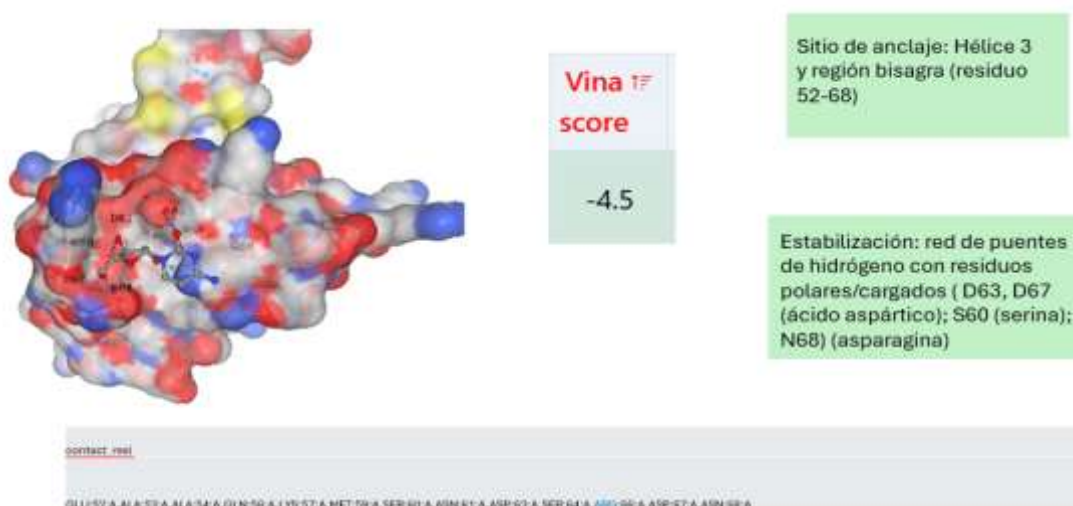


Figura 34 Acoplamiento molecular de la citarabina a la proteína S100A4.

Representación tridimensional del complejo predicho entre citarabina y la proteína S100A4 mediante acoplamiento molecular. La molécula de citarabina se localiza en una región que abarca la hélice 3 y la región bisagra (residuos 52–68) de la proteína. El mejor modelo de unión presentó una energía de afinidad estimada de -4.5 kcal/mol según el programa DB-Dock2

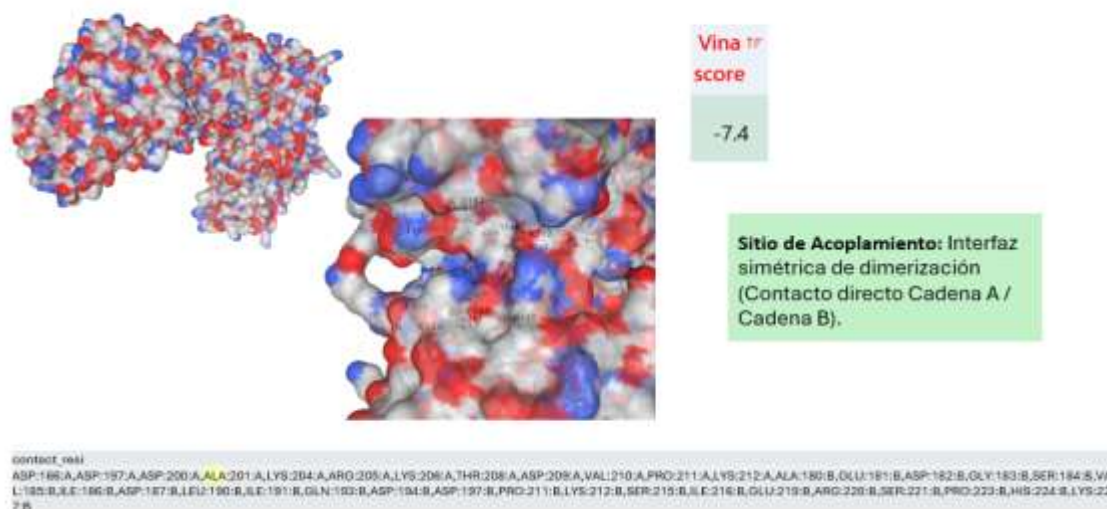


Figura 35 Predicción del sitio de unión de la citarabina a la anexina 2 mediante acoplamiento molecular.

El análisis de acoplamiento molecular predijo la unión de citarabina en la interfaz de dimerización de anexina, ubicada entre las cadenas A y B. El mejor complejo presentó una energía de afinidad de -7.4 kcal/mol. Los residuos mostrados en la parte inferior corresponden a los aminoácidos localizados en el sitio de acoplamiento y que podrían participar en las interacciones responsables de la estabilidad del complejo anexina 2-citarabina.

DISCUSIÓN

La protección contra el fármaco observada en las células leucémicas co-cultivadas con células estromales de la médula ósea es evidente al alcanzar el 100% de viabilidad a concentraciones superiores a 100 nM (fig 4), en comparación con los monocultivos (fig 3), en donde la viabilidad descendió progresivamente a partir de 200 nM. Este resultado valida el modelo experimental 3D para el estudio de la quimiorresistencia asociada al microambiente tumoral, replicando con mayor fidelidad las condiciones in vivo de la médula ósea que los modelos 2D.

El efecto protector de las células estromales OP-9 sobre las células CCRF-CEM frente a la citarabina coincide con lo reportado por Nevárez y colaboradores en 2023, quienes emplearon el mismo modelo 3D y documentaron protección frente al

metotrexato y la vincristina. Dicho fenómeno es consistente con la literatura que describe al microambiente de la médula ósea como un nicho protector en el que las células estromales mesenquimales favorecen la resistencia a fármacos mediante señalización por contacto directo, es decir, célula-célula (Meyer y Hermiston, 2019).

La elección de 100 nM como concentración de trabajo fue determinante para garantizar que los proteomas obtenidos reflejaran células fisiológicamente activas, con viabilidad superior al 80%, evitando la contaminación de las muestras con proteínas procedentes de procesos de apoptosis o necrosis. De igual manera, para comprobar que no hubiera disgregación del esferoide 3D y de esa manera asegurarnos de que no existiera contaminación, observamos la morfología de los esferoides 3D a través de un microscopio óptico, donde se observa que el esferoide se encuentra intacto a 100 nM (fig. 6). También se comprobó la pureza de los cocultivos a través de citometría de flujo, en donde observamos que la pureza es de 99.97% (fig. 7).

La concentración subinhibitoria representa una aportación novedosa del presente estudio, ya que la mayoría de los trabajos reportados emplean concentraciones cercanas a la IC₅₀ (500–1000 nM), con lo que se estudia un fenómeno más extremo de daño celular, mientras que en este estudio se explora la respuesta temprana al fármaco en un contexto de estrés leve, lo que permitió revelar la gran diferencia en la adaptación al fármaco entre co- y mono-cultivos

El análisis global de los perfiles proteómicos mediante PCA y mapa de calor reveló que la principal fuente de variabilidad entre las cuatro condiciones experimentales fue la presencia de citarabina y no el tipo de cultivo (fig 9 y 10). Sin embargo, al estratificar el análisis, se observó que las células en co-cultivo y monocultivo responden al fármaco de manera cualitativamente distinta, lo que quedó reflejado en la separación en el PC2 entre co-cultivos y monocultivos tratados (fig. 10) pese a que la separación por el componente dos es de 13.4, es decir, una separación baja. Este resultado es consistente con la idea de que el microambiente estromal no sólo confiere protección directa frente al fármaco, sino que además modula la naturaleza de la respuesta celular al mismo. La comparación entre co-cultivos y monocultivos con presencia de citarabina, identificó 76 proteínas con abundancia diferencial en donde el valor de p es menor a 0.05 y la tasa de cambio es mayor o igual a 1.5, de las cuales 35 estuvieron sobreexpresadas y 41 subexpresadas en las condiciones de co-cultivo con fármaco (fig 11).

Este conjunto de proteínas refleja cambios biológicos sustanciales inducidos por la presencia de células OP-9, que van más allá de la protección física de las células leucémicas dentro del esferoide. Al analizar el efecto global del fármaco en ambos modelos de cultivo se observó nuevamente que el cambio está dado por la presencia o ausencia del fármaco (fig. 12), esto se puede reafirmar por la separación del PCA por el componente uno, aunque la separación es de 19.7 (figura 13), donde observamos la separación de las proteínas con fármaco en color rosa de las proteínas sin fármaco en color verde, de la comparación de los co-cultivos y monocultivos con citarabina vs co-cultivos y monocultivos sin fármaco, se identificaron 231 proteínas con regulación diferencial, siendo 89 sobreexpresadas y 142 subexpresadas en las condiciones tratadas respecto a las no tratadas (fig 14).

El mayor número de proteínas subexpresadas sugiere que la citarabina suprime ampliamente procesos celulares basales, mientras que la inducción de un subconjunto de proteínas podría reflejar mecanismos adaptativos frente al estrés genotóxico. Las proteínas obtenidas de las comparaciones en co-cultivos con citarabina vs co-cultivos sin citarabina indican que existe un cambio notable en los perfiles proteómicos de las células leucémicas cosechadas de monocultivos en comparación con las cosechadas de co-cultivos cuando ambos tipos de cultivos se retan a 100 nM de citarabina (fig 15 y 16).

Por otra parte, los análisis bioinformáticos de enriquecimiento funcional que incluyen categorías de procesos biológicos y enriquecimiento de vías de KEGG sugieren una mayor representación de proteínas asociadas a glucólisis en co-cultivos tratados con citarabina en comparación con los resultados obtenidos en células leucémicas de monocultivo, en donde es evidente el procesamiento de RNA (fig 18, 21, 26 y 27). Se ha reportado la transferencia de mitocondrias en co-cultivos de células estromales y células leucémicas expuestas a citarabina en donde se sugiere que esta transferencia de mitocondrias podría estar relacionada con la quimiorresistencia a citarabina (Burt, *et al.*, 2019), por otra parte los procesos metabólicos como beta-oxidación y glucólisis en algunos tipos de cáncer favorecen la proliferación y supervivencia de las células tumorales, en especial la enolasa 2 se ha relacionado con resistencia a glucocorticoides en LLA de igual manera, PFKP se ha encontrado sobreexpresada y se asocia a mal pronóstico e inmunoregulacion tumoral en diferentes tipos de cáncer, mientras que HSPA1B se ha descrito como

una proteína protectora frente al estrés celular, en cáncer de mama su inhibición detiene la proliferación celular, migración e invasión tumoral (Liu *et al.*, 2018); (Peng *et al.*, 2023); (Zang *et al.*, 2024).

El perfil proteómico diferencial de las células en co-cultivo tratadas con citarabina reveló un enriquecimiento notable en procesos relacionados con el metabolismo energético, particularmente glucólisis, beta-oxidación de ácidos grasos, metabolismo de glucosa, generación de ATP y biosíntesis de grupos hemo (fig 18 y 20).

La red de interacción proteína-proteína construida con las 186 proteínas de regulación diferencial en co-cultivos mostró cúmulos bien definidos en torno a glucólisis (rojo), beta-oxidación (salmón), elongación del huso mitótico y componentes del centrosoma (rosa claro) y proteosoma (café), lo que sugiere una reprogramación metabólica amplia en respuesta a la presencia simultánea de células estromales y citarabina (fig. 22). Este fenómeno es compatible con el denominado efecto Warburg inverso, en el que las células tumorales incrementan su capacidad glucolítica en respuesta a la presión del microambiente para sostener la demanda de ATP necesaria para la supervivencia.

En particular, la sobreexpresión de ENO2 (enolasa 2) en los co-cultivos es relevante, pues esta enzima glucolítica ha sido relacionada con resistencia a glucocorticoides en LLA (Liu *et al.*, 2018), lo que podría indicar un mecanismo compartido de resistencia a distintos agentes quimioterápicos. Asimismo, la sobreexpresión de PFKP en co-cultivos, una fosfofructocinasa reguladora del flujo glicolítico, se ha asociado a mal pronóstico e inmunoregulación tumoral en diferentes tipos de cáncer (Peng *et al.*, 2023), reforzando la hipótesis de que el ambiente estromal potencia rutas metabólicas que favorecen la supervivencia leucémica.

La beta-oxidación como proceso enriquecido en co-cultivos es igualmente relevante, ya que el catabolismo de ácidos grasos proporciona una fuente alternativa de acetil-CoA para la producción de ATP mitocondrial, lo que complementa la glucólisis e indica una flexibilidad metabólica aumentada en las células leucémicas del co-cultivo con citarabina. Esta transferencia de mitocondrias desde las células estromales OP-9 hacia las CCRF-CEM, ya descrita por Burt y colaboradores (2019) en co-cultivos expuestos a citarabina, podría explicar en parte

el incremento en la capacidad oxidativa y la supervivencia observadas. Además, la presencia del cúmulo asociado al proteosoma en la red STRING sugiere una mayor actividad de degradación de proteínas dañadas, posiblemente como mecanismo de control de calidad frente al estrés inducido por el fármaco. En conjunto, estos datos indican que las células leucémicas en co-cultivo activan una respuesta adaptativa metabólica robusta, que les permite mantener viabilidad ante la citarabina.

En contraste, el perfil proteómico de las células en monocultivo tratadas con citarabina estuvo dominado por procesos asociados al metabolismo de RNA, en particular corte y empalme de RNA (RNA splicing), procesamiento de RNA y metabolismo de mRNA (fig 26), con la vía de degradación de galactosa como la más enriquecida en KEGG (fig. 27). La red STRING de los monocultivos reveló cúmulos funcionales en torno a la regulación por protooncogenes (rosa), adhesión celular (café) y estancamiento ribosomal (rojo) (figura 27). La sobrerrepresentación de procesos de corte y empalme de RNA en células tratadas con citarabina concuerda con lo reportado por Morales y colaboradores (2023) en muestras resistentes a citarabina en leucemia mieloide aguda (LMA), quienes documentaron una sobreexpresión de componentes del spliceosoma y del metabolismo de mRNA. Aunque el contexto celular difiere (LMA vs LLA y resistencia clínica vs respuesta subinhibitoria), la convergencia en estas categorías biológicas sugiere que la modulación del procesamiento del RNA podría representar una respuesta conservada ante el daño causado por la citarabina sobre los ácidos nucleicos. La citarabina, al incorporarse a cadenas de RNA en formación, puede perturbar el procesamiento co-transcripcional del RNA, lo que actuaría como señal para reclutar factores del spliceosoma como mecanismo compensador. Las proteínas relacionadas con protooncogenes en monocultivos tratados sugieren, además, una activación de vías transcripcionales de supervivencia, posiblemente como respuesta al estrés genotóxico.

La proteína de choque térmico HSPA1B, detectada en condiciones de co-cultivo con citarabina, ha sido descrita como un factor protector frente al estrés en células de cáncer de mama (Zhang y Bi, 2024), y su ausencia en los monocultivos podría reflejar una menor capacidad de las células aisladas para iniciar esta respuesta protectora, lo que, en conjunto, apuntaría a una menor preparación adaptativa de los monocultivos frente al fármaco. Por otra parte, en muestras resistentes a citarabina en leucemia mieloide aguda (LMA) se ha reportado una sobreexpresión

de corte y empalme de RNA y metabolismo de mRNA, lo que sugiere que hay una correlación entre la sobrerrepresentación de estas categorías biológicas y la resistencia al fármaco (Morales, *et al.*, 2023). Esto podría sugerir que nuestros datos de células en monocultivo pueden relacionarse con una respuesta al estrés por presencia de citarabina.

La comparación de las proteínas con regulación diferencial entre monocultivos (con y sin fármaco) y co-cultivos (con y sin fármaco) mediante diagrama de Venn mostró que sólo el 7.8% de las proteínas son compartidas entre ambos modelos de cultivo (fig 8), representando un núcleo de respuesta común relacionado con respuesta al estrés, señalización y regulación epigenética. La pequeña proporción de proteínas compartidas contrasta con la marcada especificidad de cada modelo: 134 proteínas exclusivas de monocultivos (vinculadas a adhesión celular, estancamiento ribosomal y regulación transcripcional por protooncogenes) y 161 proteínas exclusivas de co-cultivos (relacionadas con glucólisis, beta-oxidación y elongación del huso mitótico). Esta divergencia refuerza la idea de que la presencia de células estromales reorienta la respuesta celular de las células leucémicas, privilegiando rutas metabólicas de producción de energía frente a procesos de control del ciclo del RNA presentes en las células solitarias.

Entre las discrepancias de nuestros resultados y lo reportado en la literatura encontramos que procesos como la migración y adhesión no son exclusivos de co-cultivos, como lo reporta Juárez en 2023 o Liu en 2019. Nuestros resultados sugieren que la migración y la adhesión se inducen en respuesta al fármaco y no por la presencia de células estromales. Esta observación podría explicarse por el carácter 3D del modelo empleado en este trabajo: al crecer las células CCRF-CEM en suspensión alrededor de los esferoides OP-9, los contactos célula-sustrato son mínimos, de modo que las señales de adhesión derivadas de las células estromales se atenúan en comparación con lo que ocurriría en sistemas 2D.

Hasta donde sabemos, las respuestas a 100 nM de citarabina en las líneas celulares utilizadas en este proyecto no han sido reportadas, por lo que nuestro estudio contribuye a conocer los efectos de concentraciones de citarabina a las que las líneas CCRF-CEM y OP-9 mantienen alta viabilidad celular y experimentan un estrés leve. La mayoría de los estudios utilizan concentraciones cercanas a la IC50 (500–1000 nM), mientras que en nuestro estudio empleamos una concentración subinhibitoria para estudiar el efecto de la citarabina en células en monocultivo.

Los modelos de integración proteómica propuestos en este trabajo permiten una lectura sistemática de cómo las células leucémicas procesan la señal de citarabina en función de su entorno de cultivo. En los co-cultivos tratados (Modelo 1) (fig 30), los datos bioinformáticos sugieren la participación de IL-8 como posible mediador de señalización, el cual podría activar tanto NF- κ B como HIF-1, dos factores de transcripción ampliamente reconocidos por favorecer la supervivencia tumoral, la adaptación metabólica hipóxica y la resistencia a la apoptosis. HIF-1 en particular regula directamente genes glucolíticos como LDHA, ENO2 y PFKP, lo que es consistente con el enriquecimiento en glucólisis observado en co-cultivos con citarabina.

En contraste, en los monocultivos con citarabina tratados (Modelo 2) (fig 31), la señalización parece estar mediada por TNF- α , cuya activación de NF- κ B en este contexto favorece el incremento en la degradación de galactosa y la respuesta al estrés, junto con un aumento en el corte y empalme de RNA. La diferencia en los mediadores de señalización (IL-8 en co-cultivos vs TNF- α en monocultivos) podría reflejar la contribución de las células estromales como fuente de señales paracrinas que reorienta la respuesta transcripcional de las células leucémicas. El tercer modelo propuesto (fig 32) identifica a CD44 y HLA-C como mediadores compartidos de la respuesta a citarabina en ambos tipos de cultivo, lo que estaría ligado a la activación de STAT1, la inducción de respuesta al estrés, el incremento en migración y adhesión y la activación de la regulación epigenética. El 7.8% de proteínas compartidas entre monocultivos y co-cultivos, enriquecidas en respuesta al estrés y procesos epigenéticos, concuerda con este modelo integrador (fig. 29). Finalmente, en los modelos de integración propuestos en este trabajo, podemos observar que las vías de señalización entre monocultivos y co-cultivos son diferentes (fig 32), mientras que en monocultivos la supuesta activación está dada por TNF- α , en los co-cultivos esto está dado por IL-8, esto podría estar relacionado con la respuesta diferente que observamos ante el fármaco.

El cuarto modelo de integración propuesto aborda la transferencia de proteínas desde las células estromales OP-9 hacia las células leucémicas CCRF-CEM (fig 33). Proteínas como: PPIA, Anexina 2, S100A4 y componentes mitocondriales, han sido documentadas previamente en contextos de comunicación intercelular y transferencia de material biológico entre células del microambiente tumoral. La transferencia de mitocondrias desde células estromales a células leucémicas

expuestas a citarabina fue descrita por Burt y colaboradores (2019), quienes demostraron que este fenómeno protege a las células leucémicas del estrés oxidativo inducido por el fármaco. Los incrementos en glicoproteínas observados en co-cultivos podrían ser en parte consecuencia de esta transferencia, que busca ampliar la capacidad metabólica oxidativa y que requiere un aumento coordinado en el flujo glicolítico para mantener el equilibrio redox.

De acuerdo con nuestro modelo propuesto, las proteínas transferidas podrían inhibir p53 y activar NF- κ B, favoreciendo la proliferación y supervivencia de las células leucémicas, lo cual es consistente con la viabilidad del 100% observada en co-cultivos a 100 nM de citarabina.

La selección de S100A4 y Anexina A2 se basa en su relevancia biológica en diversos cánceres, como la colocalización de ambas proteínas en células endoteliales (Semov *et al.*, 2005), la asociación de S100A4 con metástasis e invasión en distintos tipos de cáncer (Fei *et al.*, 2017) y el papel de Anexina A2 en la degradación de la matriz extracelular e invasión tumoral (Christensen, 2018). La descripción de estas proteínas en el contexto de LLA sería novedosa, ya que su colocalización había sido reportada principalmente en células endoteliales, no en líneas leucémicas; por lo tanto, los resultados del modelado molecular enriquecerán el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de resistencia mediados por el microambiente.

En conjunto, los resultados de este estudio ofrecen una visión integrativa de cómo la presencia del microambiente estromal de la médula ósea reconfigura la respuesta proteómica de las células leucémicas frente a la citarabina. Mientras que en monocultivos la respuesta al fármaco es predominantemente el procesamiento del RNA y la regulación transcripcional por protooncogenes, en co-cultivos la respuesta está dominada por la reprogramación metabólica hacia la producción de energía mediante glucólisis y beta-oxidación, lo que confiere una ventaja de supervivencia clara. Las redes de interacción proteína-proteína obtenidas de STRING revelan la complejidad y la coherencia funcional de estos cambios, con clústeres bien definidos que integran múltiples vías biológicas de manera coordinada. Los modelos de integración propuestos conectan estas observaciones moleculares con mediadores de señalización como IL-8, TNF- α , NF- κ B y HIF-1, ofreciendo un marco interpretativo para diseñar estrategias de intervención que impidan la reprogramación metabólica mediada por el estroma.

Dos de las proteínas propuestas para el modelado molecular son S100A4 y Anexina A2; se ha observado colocalización de estas proteínas en células endoteliales, pero no en LLA (Semov, 2005). El modelado molecular entre S100A4, Anexina A2 y la molécula de citarabina representa un paso fundamental para comprender si la transferencia de estas proteínas desde las células estromales modifica la afinidad o la accesibilidad del fármaco a sus dianas intracelulares. Lo que se observa del modelado con la citarabina es que, de acuerdo con el modelado molecular, podría existir una mayor afinidad de la anexina 2 con la citarabina, esto de acuerdo con la energía libre de gibbs la cual fue de -7.4, es decir tiene una afinidad alta, en comparación con la proteína S100A4 en la cual la energía libre de gibbs fue de -4.7 el cual se clasifica como una afinidad baja (fig 34. y 35). Estos resultados del modelado de citarabina nos llevan a hipotetizar que la citarabina podría estar siendo secuestrada por la proteína anexina 2 y, a su vez, reducir la biodisponibilidad del fármaco para las células leucémicas; sin embargo, esta hipótesis requiere validación experimental adicional para ser confirmada, por lo que los resultados deben interpretarse con cautela.

En síntesis, este trabajo proporciona la primera descripción sistemática de las respuestas proteómicas de células CCRF-CEM ante citarabina a una concentración subinhibitoria en un modelo 3D de co-cultivo y establece una base sólida para el estudio mecanístico de la quimiorresistencia asociada al microambiente en LLA.

CONCLUSIONES

- La elección de la concentración de citarabina para trabajar en este proyecto fue de 100nM, debido a que se obtiene una viabilidad de 89% en monocultivo y de 100% en co-cultivo, lo que nos permite comparar la respuesta inicial a una dosis subinhibitoria.
- El modelo experimental de co-cultivo reproduce el efecto protector de las células leucémicas mediado por las células estromales (viabilidad 100% a 300nM) con respecto a las células leucémicas en monocultivo (viabilidad 50% a 300nM)
- La pureza de las células leucémicas cosechadas de co-cultivo 3D fue de 99.97% garantizando que los procesamientos proteómicos son de las células leucémicas.
- La respuesta ante el fármaco en monocultivos y co-cultivos es diferente en co-cultivo con fármaco, es clara la inducción de la glicólisis y obtención de energía metabólica en comparación con los co-cultivos y monocultivos sin fármaco.
- La citarabina podría poseer un rol dual inesperado en el microambiente tumoral uniéndose a la región entre las dos subunidades de Anexina 2, probablemente modificando alguna de sus múltiples funciones y además compitiendo con los nucleótidos fisiológicos en el sitio activo de la DNA polimerasa
- Probablemente la anexina puede secuestrar a citarabina y de esa manera bajar la biodisponibilidad para combatir a las células leucémicas

PERSPECTIVAS

- Realizar el proteoma de la concentración a 300 nM de los co-cultivos
- Validar algunas proteínas obtenidas a 100 nM y 300 nM mediante western blot

BIBLIOGRAFÍA

- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. O., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A. M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J. K. C., Cheuk, W., Chng, W. J., Choi, J. K., Chuang, S. S., Coupland, S. E., Czader, M., Dave, S. S., de Jong, D., ... Xiao, W. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 36(7), 1720–1748. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>
- Álvarez-Zúñiga, C. D., Garza-Veloz, I., Martínez-Rendón, J., Ureño-Segura, M., Delgado-Enciso, I., & Martinez-Fierro, M. L. (2023). Circulating Biomarkers Associated with the Diagnosis and Prognosis of B-Cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers*, 15(16), 4186. <https://doi.org/10.3390/cancers15164186>
- Arana-Luna, Luara L., Alvarado-Ibarra, Martha, Silva-Michel, Luis G., Morales-Maravilla, Adrián, González-Rubio, María del C., Chávez-Aguilar, Lénica A., Tena-Iturralde, María Fernanda, Mojica-Balceras, Liliana, Zapata-Canto, Nidia, Galindo-Delgado, Patricia, Miranda-Madrado, María Raquel, Morales-Hernández, Alba E., Silva-Vera, Karina, Grimaldo-Gómez, Flavio A., Hernández-Caballero, Álvaro, Bates-Martin, Ramón A., Álvarez-Vera, José L., Tepepa-Flores, Fredy, Teomitzi-Sánchez, Óscar, Fermín-Caminero, Denisse J., Peña-Celaya, José A. de la, Salazar-Ramírez, Óscar, Flores-Villegas, Luz V., Guerra-Alarcón, Lidia V., Leyto-Cruz, Faustino, Inclán-Alarcón, Sergio I., Milán-Salvatierra, Andrea I., Ventura-Enríquez, Yanet, Pérez-Lozano, Uendy, Báez-Islas, Pamela E., Tapia-Enríquez, Ana L., Palma-Moreno, Orlando G., Aguilar-Luévano, Jocelyn, Espinosa-Partida, Arturo, Pérez-Jacobo, Luis F., Rojas-Castillejos, Flavio, Ruiz-Contreras, Josué I., Loera-Fragoso, Sergio J., Medina-Coral, Jesús E., Acosta-Maldonado, Brenda L., Soriano-Mercedes, Emely J., Saucedo-Montes, Erick E., Valero-Saldana, Luis M., González-Prieto, Susana G., Nava-Villegas, Lorena, Hernández-Colin, Ana K., Hernández-Alcántara, Areli E., Zárate-Rodríguez, Pedro A., Ignacio-Ibarra, Gregorio, Meillón-García, Luis A., Espinosa-Bautista, Karla A., Ledesma de la Cruz, Cindy, Barbosa-Loría, Diego M., García-Castillo, Carolina, Balderas-Delgado, Carolina, Cabrera-García, Álvaro, Pérez-Zúñiga, Juan M., Hernández-Ruiz, Eleazar, Villela-

Peña, Atenas, Gómez Cortés, Sue Cynthia, Romero-Rodelo, Hilda, Garzón-Velásquez, Katheryn B., Serrano-Hernández, Cristina, Martínez-Ríos, Annel, Pedraza-Solís, María Luisa, Martínez-Coronel, Jorge A., Narváez-Davalos, Iris M., García-Camacho, Alinka S., Merino-Pasaye, Laura E., Aguilar-Andrade, Carolina, Aguirre-Domínguez, Juan A., Guzmán-Mera, Pedro G., Delgado-de la Rosa, Elizabeth, Flores López, Perla E., González-Aguirre, Lilia L., Ramírez-Alfaro, Edgar M., Vera-Calderón, Heidi, Meza-Dávalos, María Lizeth, Murillo-Cruz, Juan, Pichardo-Cepín, Yayra M., & Ramírez-Romero, Eva F.. (2022). Consenso de leucemia mieloide aguda en México. *Gaceta médica de México*, 158(spe), M1-M51. Epub 16 de mayo de 2022. <https://doi.org/10.24875/gmm.m21000597>

- Bispo, J. A. B., Pinheiro, P. S., & Kobetz, E. K. (2020). Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(6), a034819. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034819>
- Burt, R., Dey, A., Aref, S., Aguiar, M., Akarca, A., Bailey, K., Day, W., Hooper, S., Kirkwood, A., Kirschner, K., Lee, S. W., Lo Celso, C., Manji, J., Mansour, M. R., Marafioti, T., Mitchell, R. J., Muirhead, R. C., Cheuk Yan Ng, K., Pospori, C., Puccio, I., ... Fielding, A. K. (2019). Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. *Blood*, 134(17), 1415–1429. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001398>
- Chen, J. Y., Shih, L. J., Liao, M. T., Tsai, K. W., Lu, K. C., & Hu, W. C. (2025). Understanding the Immune System's Intricate Balance: Activation, Tolerance, and Self-Protection. *International journal of molecular sciences*, 26(12), 5503. <https://doi.org/10.3390/ijms26125503>
- Chiaretti, S., Zini, G., & Bassan, R. (2014). Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 6(1), e2014073. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2014.073>
- Christensen, M. V., Høgdaal, C. K., Jochumsen, K. M., & Høgdaal, E. V. S. (2018). Annexin A2 and cancer: A systematic review. *International journal of oncology*, 52(1), 5–18. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4197>
- Di Francia, R., Crisci, S., De Monaco, A., Cafiero, C., Re, A., Iaccarino, G., De Filippi, R., Frigeri, F., Corazzelli, G., Micera, A., & Pinto, A. (2021). Response and Toxicity to Cytarabine Therapy in Leukemia and Lymphoma:

From Dose Puzzle to Pharmacogenomic Biomarkers. *Cancers*, 13(5), 966.
<https://doi.org/10.3390/cancers13050966>

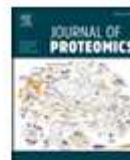
- Domínguez, P. M., Romero-Ramírez, H., & Rodríguez, A. J. C. (2015). Células madre hematopoyéticas: Origen, diferenciación y función. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 15(1), 29–37.
- Dorantes-Acosta, E., Medina-Sanson, A., Dávila-Ornelas, K., & López, B. (2013). Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Gaceta Mexicana de Oncología*, 12(3), 136-142.
- Emadi, A., & Law, J. Y. (2023). Generalidades sobre las leucemias. Manual MSD Versión Para Profesionales. <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/hematolog%C3%ADa-y-oncolog%C3%ADa/leucemias/generalidades-sobre-las-leucemias>
- Fei, F., Qu, J., Zhang, M., Li, Y., & Zhang, S. (2017). S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review. *Oncotarget*, 8(42), 73219–73239. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18016>
- Jensen, C., & Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 33. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science : AMS*, 14(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Karantanou, C., Godavarthy, P. S., & Krause, D. S. (2018). Targeting the bone marrow microenvironment in acute leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 59(11), 2535–2545. <https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1434886>
- Kuhn, N. Z., & Tuan, R. S. (2010). Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *Journal of cellular physiology*, 222(2), 268–277. <https://doi.org/10.1002/jcp.21940>
- Lacobucci, I., & Mullighan, C. G. (2017). Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the*

American Society of Clinical Oncology, 35(9), 975–983.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.7836>

- Lacobucci, I., Kimura, S., & Mullighan, C. G. (2021). Biologic and Therapeutic Implications of Genomic Alterations in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of clinical medicine*, 10(17), 3792. <https://doi.org/10.3390/jcm10173792>
- Latosińska, J. N., Latosińska, M., Seliger, J., Žagar, V., & Apih, T. (2024). Butterfly Effect in Cytarabine: Combined NMR-NQR Experiment, Solid-State Computational Modeling, Quantitative Structure-Property Relationships and Molecular Docking Study. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 17(4), 445. <https://doi.org/10.3390/ph17040445>
- Liu, C. C., Wang, H., Wang, W. D., Wang, L., Liu, W. J., Wang, J. H., Geng, Q. R., & Lu, Y. (2018). ENO2 Promotes Cell Proliferation, Glycolysis, and Glucocorticoid-Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 46(4), 1525–1535. <https://doi.org/10.1159/000489196>
- Meyer, L. K., & Hermiston, M. L. (2019). The bone marrow microenvironment as a mediator of chemoresistance in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 2(4), 1164–1177. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.63>
- Morales, M. L., García-Vicente, R., Rodríguez-García, A., Reyes-Palomares, A., Vincelle-Nieto, Á., Álvarez, N., Ortiz-Ruiz, A., Garrido-García, V., Giménez, A., Carreño-Tarragona, G., Sánchez, R., Ayala, R., Martínez-López, J., & Linares, M. (2023). Posttranslational splicing modifications as a key mechanism in cytarabine resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 37(8), 1649–1659. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-01963-4>
- Nevárez-Ramírez, A. J., Guzmán-Ortiz, A. L., Cortes-Reynosa, P., Perez-Salazar, E., Jaimes-Ortega, G. A., Valle-Rios, R., Marín-Hernández, Á., Rodríguez-Zavala, J. S., Ruiz-May, E., Castrejón-Flores, J. L., & Quezada, H. (2023). Shotgun Proteomics of Co-Cultured Leukemic and Bone Marrow Stromal Cells from Different Species as a Preliminary Approach to Detect Intercellular Protein Transfer. *Proteomes*, 11(2), 1. <https://doi.org/10.3390/proteomes1102001>

- Núñez-Enríquez JC, Pelayo R, Flores Lujano J, *et al.* Epidemiología de la leucemia infantil en México y Latinoamérica: efectos de la vulnerabilidad y la justicia social. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2026;64(1):e6794. doi: 10.5281/zenodo.17469264
- Peng, J., Li, P., Li, Y., Quan, J., Yao, Y., Duan, J., Liu, X., Li, H., Yuan, D., & Wang, X. (2023). PFKP is a prospective prognostic, diagnostic, immunological and drug sensitivity predictor across pan-cancer. *Scientific reports*, 13(1), 17399. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43982-2>
- Raetz, E. A. y Gojo, I. (2018). Leucemia linfoblástica aguda. 2da Ed. Sociedad de Lucha contra la Leucemia y el Linfoma. https://www.ils.org/sites/default/files/file_assets/PS33S_ALL_Spanish_2019_FINAL.pdf
- Ramírez Maldonado, V., Navas Acosta, J., Maldonado Marcos, I., Villaverde Ramiro, Á., Hernández-Sánchez, A., Hernández Rivas, J. M., & Benito Sánchez, R. (2024). Unraveling the Genetic Heterogeneity of Acute Lymphoblastic Leukemia Based on NGS Applications. *Cancers*, 16(23), 3965. <https://doi.org/10.3390/cancers16233965>
- Rey Caro, L. A., Pinzón, P., & Cruz Rodríguez, N. (2020). Mecanismos moleculares emergentes y células madre leucémicas en la quimiorresistencia de tumores hematológicos. *Salud UIS*, 52(2), 131–146. <https://doi.org/10.18273/revsal.v52n2-2020007>
- Semov, A., Moreno, M. J., Onichtchenko, A., Abulrob, A., Ball, M., Ekiel, I., Pietrzynski, G., Stanimirovic, D., & Alakhov, V. (2005). Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *The Journal of biological chemistry*, 280(21), 20833–20841. <https://doi.org/10.1074/jbc.M41263200>
- Shimony, S., Stahl, M., & Stone, R. M. (2023). Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology*, 98(3), 502–526. <https://doi.org/10.1002/ajh.26822>
- Strazza, M., Song, R., Hiner, S., & Mor, A. (2024). Changing the location of proteins on the cell surface is a promising strategy for modulating T cell functions. *Immunology*, 173(2), 248–257. <https://doi.org/10.1111/imm.13828>
- Sun, L., Su, Y., Jiao, A., Wang, X., & Zhang, B. (2023). T cells in health and disease. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 235. an

- Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*, 7(6), e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
- Tufail, M., Jiang, C. H., & Li, N. (2025). Immune evasion in cancer: mechanisms and cutting-edge therapeutic approaches. *Signal transduction and targeted therapy*, 10(1), 227. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02280-1>
- Wang, M., Bi, Y., Fan, Y., Fu, X., & Jin, Y. (2025). Global incidence of childhood cancer by subtype in 2022: a population-based registry study. *EClinicalMedicine*, 89, 103571. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2025.103571>
- Zhang, M., & Bi, X. (2024). Heat Shock Proteins and Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*, 25(2), 876. <https://doi.org/10.3390/ijms25020876>
- Zhang, M., Liu, C., Tu, J., Tang, M., Ashrafizadeh, M., Nabavi, N., Sethi, G., Zhao, P., & Liu, S. (2025). Advances in cancer immunotherapy: historical perspectives, current developments, and future directions. *Molecular cancer*, 24(1), 136. <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02305-x>



Review

Intercellular transfer of proteins and mitochondria - the contribution of proteomics

Ana Laura Guzmán-Ortiz^a, Erandi Pérez-Figueroa^a, Ricardo Valle-Ríos^{a,b},
Karen Melissa Martínez-González^{a,c}, Héctor Quezada^{a,*}

^a Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez 162, 06720 México City, México

^b Unidad Universitaria de Investigación en Cáncer e Inmunología, División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, 04510 México City, México

^c Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, San Lorenzo 290, 03100 México City, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Mass spectrometry
Trans-SILAC
BONCAT
Affinity capture-MS/MS
TransitID
Extracellular vesicles
Tunneling nanotubes
Trogocytosis
Plasmodesmata

ABSTRACT

One of the mechanisms of intercellular communication is the transfer of proteins and organelles among cells. This has been observed in diverse phylogenetic groups, and can be mediated by extracellular vesicles, like exosomes or exophores, tunneling nanotubes, pores like plasmodesmata or processes like trogocytosis. The vast majority of studies in this field have used confocal microscopy and flow cytometry to detect proteins from donor cells in recipient cells. Proteomics has not been widely used, despite the fact that efficient tools are available for the labeling, enrichment and unbiased large-scale identification of the transferred proteins. Among these tools are trans-SILAC, affinity capture-MS/MS, BONCAT, TransitID and the use of cells from different species. In this review we describe illustrative examples of the intercellular transfer of proteins and mitochondria indicating the experimental methodologies used, both proteomics and non-proteomics, and emphasizing the capabilities of the mass spectrometry-based strategies.

1. Introduction

Intercellular communication is a fundamental process of all living things. Cells of the same, or different species, exchange molecular messages to perform basic functions like response to environmental conditions, social behaviors in microbes, differentiation and development in multicellular organisms, homeostatic maintenance, etc. The most studied mechanism is the binding of extracellular ligands to membrane receptors. For example, quorum sensing in gram-negative species of bacteria [1], pheromone-based communication in fungi [2], or paracrine, autocrine and endocrine communication [3–5]. The molecular nature of the ligands is very diverse, they can be metabolites, peptides, proteins, polysaccharides, nucleic acids, etc., which can transmit signals diffusing in the extracellular media or acting attached to the surface of one of the interacting cells (communication by direct cell-cell or cell-extracellular matrix contact). When the ligand binds to the corresponding receptor, an intracellular signal is transduced, and a cellular response is triggered. These types of receptor-ligand interactions are typically extracellular and non-covalent.

Molecular messengers can also be molecules that are internalized into the cytoplasm or integrated into the phospholipid bilayer at the plasma membrane of the recipient cell, these messages are exchanged through processes like secretion and internalization of extracellular vesicles (EVs) e.g. exosomes or exophers [6,7], movement of cytoplasmic components through pores connecting adjacent cells (gap junctions in animals, plasmodesmata in plants or septum in filamentous fungi [8–10], the extraction of a fragment of one cell by the other [11], or by connecting cells through long membrane protrusions (of which the most studied type in animal cells is tunneling nanotubes) [12]. The result is the intercellular transfer of metabolites, RNAs, proteins and organelles whose functions contribute to the resultant physiological changes in the recipient cells. The importance of this transfer is illustrated by the evolution of various mechanisms to perform this task in diverse phylogenetic groups.

In particular, the intercellular transfer of proteins and mitochondria has been reported to have prominent effects on the recipient cells. For example, making cells responsive to inflammatory stimulus [13], contributing to the adaptive immune response [14,15], extragenetic

* Corresponding author.

E-mail addresses: vallerios@unam.mx (R. Valle-Ríos), hquezada@himfg.edu.mx (H. Quezada).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2025.105491>

Received 28 February 2025; Received in revised form 27 May 2025; Accepted 23 June 2025

Available online 9 July 2025

1874-3919/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.



Gobierno de
México

Salud
Secretaría de Salud



LA SECRETARÍA DE SALUD
y el Hospital Juárez de México
OTORGAN LA PRESENTE

CONSTANCIA

A

MARTÍNEZ GONZÁLEZ KAREN MELISSA

Por haber participado como **ASISTENTE** en el curso

“Aplicaciones Clínicas de la Citometría de Flujo”

que se llevó a cabo en el Auditorio “Dr. Manuel Velasco Suárez”
los días 20 al 22 de agosto del 2025

Duración del curso: 12 horas

Dr. Antonio Gutiérrez Ramírez
Subdirector de Enseñanza

Dra. Paola Alhelí Sánchez Jacobo
Encargada del Servicio de Extensión Continua

Dra. en C. Nayeli Goreti Nieto Velázquez
Coordinadora del curso



Ciudad de México, México, AGOSTO 2025



2025
Año de
La Mujer
Indígena



La Asociación Mexicana de Investigadores de los Institutos Nacionales de Salud y
Hospitales de Alta Especialidad A.C.
AMIINSHAE A.C.

OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

Karen Melissa Martínez-González, Ana Laura Guzmán-Ortiz, Abigail Morales-Sánchez, Pedro Cortes-Reynosa, Eduardo Pérez-Salazar y Héctor Quezada-Pablo

Por la presentación de su trabajo de investigación titulado:

La transferencia horizontal de mitocondrias y proteínas en el microambiente de la médula ósea puede contribuir a la quimiorresistencia de células leucémicas

Dentro del IX Congreso de la AMIINSHAE, celebrado los días 4 y 5 de diciembre de 2025, en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México,


Dr. Rosendo Luria Pérez
Presidencia Colegiada de la
AMIINSHAE A.C.


Dr. Edgar Alejandro Medina Torres
Presidencia Colegiada de la
AMIINSHAE A.C.


Dra. Guillermina J. Baay Guzmán
Comité organizador del IX Congreso
de la AMIINSHAE A.C.


Dra. Marcela Salazar García
Comité organizador del IX Congreso
de la AMIINSHAE A.C.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

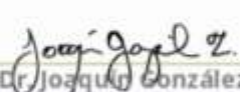
**EL GOBIERNO DE MÉXICO
A TRAVÉS DEL
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
OTORGAN EL PRESENTE**

**RECONOCIMIENTO
A**

KAREN MELISSA MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Por su asistencia al Curso Básico para usuarios de la Red de Citometría del IMSS




Dr. Joaquín González
Ibarra
Jefe de División de Desarrollo
de la Investigación


Dra. Michelle Olivares
González
Jefa de Área de Difusión de la
Investigación

Ciudad de México, a 28 de octubre de 2025



OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A:

KAREN MELISSA MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Por su participación como:

ASISTENTE

Dentro de la Reunión Anual de Investigación, celebrada el 4 y 5 de julio de 2024 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Dra. Mara Medeiros Domingo
Directora de Investigación

Dra. Marcela Salazar García
Jefa de Departamento de Investigación Educativa



Hospital Infantil de México Federico Gómez

La Dirección de Enseñanza y Desarrollo Académico otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a

Karen Melissa Martínez González

por su participación en el curso

Cultivo de células en Investigación Biomédica

Realizado del 02 al 30 de octubre de 2025

Claudia Gutiérrez Camacho
Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico



Folio
34

Marcela Salazar García
Profesora Titular