



Relación entre la expresión de ID1 e ID3 y el microambiente tumoral inmune de la médula ósea en adultos con leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B

Jenny Nathaly Poveda Garavito

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento Microbiología, Maestría en Inmunología
Bogotá, Colombia

2024

Relación entre la expresión de ID1 e ID3 y el microambiente tumoral inmune de la médula ósea en adultos con leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B

Jenny Nathaly Poveda Garavito

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Inmunología

Directora:

Alba Lucía Combata Rojas MSc., Ph.D.

Codirector:

Carlos Alberto Orozco Castaño MSc., Ph.D.

Línea de Investigación:

Aspectos Inmunológicos del Cáncer

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Biología del Cáncer- Instituto Nacional de Cancerología

Grupo de Investigación traslacional en Oncología - Instituto Nacional de

Cancerología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento Microbiología, Maestría en Inmunología

Bogotá, Colombia

2024

*A mi familia natal y a quienes
en el transcurso de mi vida
se han convertido en una.*

*"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran
belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un
técnico: también es un niño colocado ante fenómenos
naturales que lo impresionan como un cuento de
hadas".*

Marie Curie

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Jenny Nathaly Poveda Garavito

Fecha 30/01/2024

Agradecimientos

A los pacientes que generosamente decidieron participar en este estudio de investigación, les expreso mi profundo agradecimiento. Su colaboración altruista ha sido fundamental para avanzar en el conocimiento y mejorar las perspectivas en el campo de las ciencias.

A mi mamá quien no ha dudado un solo día en apoyarme y en medio de las adversidades siempre ha sido la voz de aliento que me ha motivado a continuar, a mi papá por siempre sentirse orgulloso de mi trabajo académico y hablar tan bien de mí, incluso cuando yo misma no he podido. A ambos, por trabajar siempre tan duro y apoyarme en las decisiones que he tomado, a pesar de ser tan diferentes a los caminos que conocían.

A mi hermano Juan Camilo, que ha sido el mejor compañero de viaje, de quien siempre he podido aprender un poco más y quien me ha brindado el más amor seguro.

A mi prima Adriana, quien ha sido mi mayor ejemplo de lo que es una mujer en el poder y quien jamás ha dudado en apoyarme.

A mi gran amiga Diana Chitiva, a quien agradezco infinitamente cada palabra llena de sabiduría, empatía y amor. Es una fortuna poder coincidir en esta vida. Tú fuiste la persona que más se alegró de mi ingreso a la Universidad Nacional y ahora, varios años después no me cabe duda de que serás quien más va a celebrar la culminación de este ciclo. Que la vida nos regale elegirnos conscientemente la una a la otra en cada paso de este camino.

A quien considero mi hermana, Mónica Pinzón, gracias por ser hace más de 20 años una fuente de sabiduría, por brindarme lo mejor de ti en cada etapa que hemos vivido que ha sido tan distinta, tengo la certeza que mi alma y tu alma se escogieron para amarse mucho antes de esta vida.

A Fabián Rodríguez y Carolina Vargas, a quien después de este proceso puedo llamarles mis amigos. Fabián, gracias por hacerme ver que la confianza no depende del tiempo si no de la incondicionalidad de las personas, por los viajes, las palabras y los viernes de mercado. Carolina, te admiro de tantas formas que ahora mismo solo puedo sentir una

nostalgia llena de orgullo al saber que estás cumpliendo tus sueños y siempre serás una fuente de inspiración de lo que es una mujer STEM.

Al grupo de investigación en Biología del cáncer del Instituto Nacional de Cancerología por ser el lugar que me permitió realizar mi proceso investigativo. A Alexander, agradezco sinceramente su cálida bienvenida al grupo de investigación, así como su generosidad al compartir su amistad y conocimiento sin reservas, deseo siga brillando con luz propia en este mar de fueguitos. A Esperanza Trujillo por transmitir su conocimiento en el laboratorio cada vez que lo requerí. A Ana María por su disposición de aprender y hacerme ver todo lo que me queda por aprender. A Paula por brindarme un lugar seguro, en el que me sentí escuchada después de más de un experimento que no salía bien. A Dayanne, Michelle y Ximena, con quienes comparto más de una lucha y quienes me han brindado su sabiduría y experiencia académica, las admiro profundamente. De cada una de ustedes he aprendido valiosas lecciones y hoy agradezco la oportunidad de llamarlas mis amigas. A Lina, en reconocimiento a quien es, a esa mujer generosa y llena de virtudes que ha venido a enseñarme cómo mantener la fortaleza del corazón sin perder la ternura del alma, como afirmó Cortázar, un simple "gracias" se queda quedo corto. Y a las demás personas que conforman el grupo les agradezco su apoyo y compañerismo.

Al grupo de medicina traslacional de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia, donde en sus integrantes encontré siempre la disposición en ayudarme con los ensayos de citometría. A Laura con quien pasé tantas tardes frente al citómetro y de esta forma la vida nos reencontró, quien me demostró que el valor de la amistad no tiene fecha en el calendario. A Nicolás por su generosidad, pues sin conocerme no dudo en leer tubos en el citómetro mientras escuchaba un congreso y hacía entrevistas. A Manuela quien siempre fue muy generosa con su conocimiento y desinteresadamente lo compartió conmigo. A todo el grupo Laura, Nicolás, Manuela, María Alejandra Villota, Oscar Rodríguez y María Alejandra Alfaro por recibirme de manera tan orgánica como amiga y hacerme parte de un lugar que me ha hecho cuestionarme más de un pensamiento fijo y sin duda me ha retado a crecer de muchas maneras. Gracias por ser uno de mis lugares favoritos. Ustedes son el verdadero, soy porque somos.

A mi amigo Oscar, quien después de 13 años de conocernos se ha convertido en una de mis personas favoritas. Agradezco su constante apoyo emocional no solo durante este

proceso, sino también en tantas otras situaciones que la vida nos ha presentado. A mi amiga Niyireth, quien me ha enseñado que ni la generosidad ni la incondicionalidad están sujetas al paso del tiempo.

A la Dra Sandra Quijano, mi sincero agradecimiento por compartir su valioso conocimiento y llevar a cabo los análisis de las citometrías de flujo.

Al Dr. Jovanny, le quiero agradecer por su valioso apoyo en los ensayos de secuenciación, análisis de datos, por responder generosamente a todas mis dudas y por estar dispuesto a abrirme las puertas en la Louisiana State University.

Al Dr. Carlos Orozco, quiero expresar mi profundo agradecimiento por su constante disposición para responder mis dudas de manera generosa y por sus invaluable contribuciones a este proyecto de investigación.

A la Dra. Alba Lucía Combita, mi más sincero agradecimiento por su generosidad a lo largo de mi maestría. Aprecio enormemente que me brindara la oportunidad de formar parte del Instituto Nacional de Cancerología y por su incondicional apoyo académico en cada proyecto que he emprendido.

Al Departamento de Microbiología, quiero expresar mi gratitud por permitirme ingresar a la Maestría de Inmunología y proporcionarme valioso conocimiento y herramientas como profesional. Quiero destacar especialmente a la profesora Myriam Lucía Navarrete por su eficiente gestión administrativa y a Ruth Molina por su constante disposición en la ayuda con los trámites administrativos.

Finalmente, deseo expresar mi profundo agradecimiento a la Universidad Nacional de Colombia por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su comunidad académica. A lo largo de mi tiempo en esta institución, he experimentado un crecimiento significativo en diversos aspectos de mi vida.

Resumen

Relación entre la expresión de ID1 e ID3 y el microambiente tumoral inmune de la médula ósea en adultos con leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B

El diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B (BCP-ALL) es una condición que generalmente presenta un pronóstico desfavorable. Investigaciones previas identificaron los genes ID1 e ID3 como predictores de mala respuesta en pacientes adultos colombianos con BCP-ALL, genes que desempeñan un papel crucial en diversos procesos relacionados con el desarrollo del cáncer. En particular, en otros modelos de cáncer, ID1 e ID3 se asociaron con la presencia de poblaciones inmunitarias reguladoras en el microambiente inmunitario tumoral (TIME). Considerando que estudios anteriores han demostrado que el desarrollo de BCP-ALL altera la composición de las células inmunitarias y el microambiente tumoral de la médula ósea (BM), influyendo en la progresión de la enfermedad y la respuesta a la terapia, este estudio tuvo como objetivo analizar la expresión diferencial de ID1 e ID3 y su posible relación con el TIME en pacientes con BCP-ALL. Para llevar a cabo el estudio, se tomaron muestras de BM de seis pacientes con BCP-ALL diagnosticados en el Instituto Nacional de Cancerología de Colombia. Inicialmente, se evaluó la expresión de ID1 e ID3 en células tumorales de BM mediante la técnica de RT-qPCR, dividiendo a los pacientes en dos categorías según la expresión de estos genes (basal y sobreexpresión). Posteriormente, se realizó una caracterización detallada de las poblaciones inmunes presentes en la BM mediante citometría de flujo, abarcando linfocitos T CD4+ (T totales y reguladores), T CD8+, células mieloides supresoras (MDSC), macrófagos (M1 y M2) y natural killer (NK). Además, se llevó a cabo un análisis de RNA-seq para evaluar los genes inmunes asociados con la respuesta contra BCP-ALL, y se analizaron los perfiles TIME utilizando paquetes como DESeq2, CIBERSORT y xCell en RStudio. Además, se consultó la base de datos pública TARGET para corroborar los datos obtenidos. Los resultados revelaron la expresión diferencial de 15,951 genes entre los dos grupos estudiados, con una sobreexpresión destacada de genes asociados con las vías de neutrófilos. El análisis de enriquecimiento de genes mostró una mayor expresión de genes implicados en la degranulación de neutrófilos, la activación de neutrófilos y la inmunidad mediada por neutrófilos. En particular, se observaron diferencias significativas en las poblaciones de neutrófilos, monocitos y linfocitos T CD4+ en pacientes con niveles elevados de ID1 e ID3 en comparación con el

grupo con expresión basal. Estos hallazgos fueron consistentes con los datos obtenidos mediante citometría de flujo. En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que los niveles de expresión de ID1 e ID3 en células leucémicas (LC) de BCP-ALL están asociados con alteraciones significativas en las poblaciones de TIME, destacando un posible papel inmunomodulador de estos genes, especialmente en las vías de los neutrófilos. Estos hallazgos podrían tener implicaciones importantes para comprender la progresión de la enfermedad y mejorar las estrategias terapéuticas en pacientes con BCP-ALL.

Palabra clave: Leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras (BCP-ALL), ID1, ID3, sistema inmunitario, microambiente, médula ósea, inmunovigilancia.

Abstract

Relationship between ID1 and ID3 expression and the bone marrow immune tumor microenvironment in adults with B precursor cell acute lymphoblastic leukemia

The diagnosis of acute lymphoblastic leukemia of B-cell precursors (BCP-ALL) is a condition that typically carries an unfavorable prognosis. Previous research has identified the genes ID1 and ID3 as predictors of poor response in adult Colombian patients with BCP-ALL. These genes play a crucial role in various processes related to cancer development. Specifically, in other cancer models, ID1 and ID3 have been associated with the presence of regulatory immune populations in the tumor immune microenvironment (TIME). Given that previous studies have demonstrated that the development of BCP-ALL alters the composition of immune cells and the tumor microenvironment in the bone marrow (BM), influencing disease progression and therapy response, this study aimed to analyze the differential expression of ID1 and ID3 and their potential relationship with TIME in BCP-ALL patients. To conduct the study, BM samples were taken from six patients diagnosed with BCP-ALL at the National Cancer Institute of Colombia. Initially, the expression of ID1 and ID3 in BM tumor cells was evaluated using the RT-qPCR technique, categorizing patients into two groups based on the expression of these genes (basal and overexpression). Subsequently, a detailed characterization of immune cell populations present in BM was performed using flow cytometry, including CD4+ T lymphocytes (total and regulatory), CD8+ T cells, myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages (M1 and M2), and natural killer (NK) cells. Additionally, an RNA-seq analysis was conducted to assess immune genes associated with the response against BCP-ALL, and TIME profiles were analyzed using packages such as DESeq2, CIBERSORT, and xCell in RStudio. Furthermore, the public TARGET database was consulted to corroborate the obtained data. The results revealed differential expression of 15,951 genes between the two studied groups, with prominent overexpression of genes associated with neutrophil pathways. Gene enrichment analysis showed increased expression of genes involved in neutrophil degranulation, neutrophil activation, and neutrophil-mediated immunity. Specifically, significant differences were observed in the populations of neutrophils, monocytes, and CD4+ T lymphocytes in patients with elevated levels of ID1 and ID3 compared to the group with basal expression. These findings were consistent with data obtained through flow cytometry. In conclusion, the results of this study suggest that the expression levels of ID1

and ID3 in leukemia cells (LC) of BCP-ALL are associated with significant alterations in TIME populations, highlighting a potential immunomodulatory role of these genes, especially in neutrophil pathways. These findings could have important implications for understanding disease progression and improving therapeutic strategies in BCP-ALL patients.

Keywords: B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL), ID1, ID3, immune system, microenvironment, bone marrow, immunosurveillance.

Contenido

	Pág.
Agradecimientos	V
Resumen	VIII
Abstract	X
Introducción	1
Problema de investigación	3
Objetivos	6
1. Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (BCP-ALL)	7
1.1 Maduración de las células B y biología de la BCP-ALL.....	8
1.2 BCP-ALL en adultos.....	11
1.3 Diagnóstico y pronóstico en BCP-ALL.....	11
1.4 Tratamiento en BCP-ALL.....	15
2. Genes ID	18
2.1 Función y clasificación.....	18
2.2 ID y el cáncer.....	20
3. Microambiente tumoral	22
3.1 Microambiente tumoral.....	22
3.2 Microambiente tumoral inmune (TIME).....	22
4. Metodología	24
4.1 Consideraciones éticas.....	24
4.2 Buenas prácticas de laboratorio.....	24
4.3 Tipo de estudio, criterios de inclusión y exclusión.....	25
4.4 Obtención de médula ósea y metodología por objetivo.....	26
4.4 Análisis de información.....	35
5. Resultados	40
5.1 Caracterización de la población de estudio.....	40
5.2 Evaluación de la expresión de <i>ID1</i> e <i>ID3</i> en células leucémicas en pacientes con BCP-ALL.....	42
5.3 Evaluación de las poblaciones inmunes en el microambiente tumoral (TIME) según la expresión de <i>ID1</i> e <i>ID3</i>	44
5.4 La expresión de <i>ID1</i> e <i>ID3</i> induce el aumento en las vías de degranulación y activación de los neutrófilos.....	52
5.5 Evaluación <i>in silico</i> : confirmación de datos obtenidos en bases de datos públicas.....	57
6. Discusión	63

Perspectivas	71
Divulgación del conocimiento.....	73
Referencias.....	75

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Maduración de las células B y el establecimiento de BCP-ALL.....	8
Figura 2: Distribución de edad de los subtipos de leucemia linfoblástica aguda (ALL) . .	10
Figura 3: Diagnóstico y evaluación del riesgo en la BCP-ALL en adultos para la consecución de la CR y el tratamiento post remisión orientado al riesgo.	17
Figura 4: Factores que influyen en las funciones dependientes del contexto de las proteínas E e Id en el desarrollo y el cáncer.	21
Figura 5: Participantes del estudio de investigación.	27
Figura 6: Metodología.	28
Figura 7: Clasificación de los pacientes según niveles de expresión de <i>ID1</i> e <i>ID3</i>	43
Figura 8: Estrategia de gating	45
Figura 9: Citometría de flujo representativa de la BM.....	47
Figura 10: Diferencias entre poblaciones inmunes según expresión de <i>ID1</i> e <i>ID3</i>	48
Figura 12: Comparación de poblaciones celulares inmunes entre pacientes que sobreexpresaron <i>ID1</i> o <i>ID3</i> versus pacientes con expresión basal de <i>ID1</i> e <i>ID3</i>	51
Figura 13: Estimación de la infiltración de las poblaciones inmunes utilizando el método de deconvolución xCell según la expresión de <i>ID1</i> e <i>ID3</i>	52
Figura 14: Genes diferencialmente expresados según niveles de expresión de <i>ID1</i> e <i>ID3</i>	53
Figura 15: Genes diferencialmente expresados en pacientes con sobreexpresión de <i>ID1</i> e <i>ID3</i>	54
Figura 16: Análisis de enriquecimiento funcional mediante la ontología KEGG de vías.	55
Figura 17: Análisis de Interacción Proteína-Proteína con la Herramienta STRING en el Grupo de Pacientes con Sobreexpresión de <i>ID1</i> e <i>ID3</i>	56
Figura 18: Análisis de Enriquecimiento Funcional de Vías KEGG en Pacientes con Alta Expresión de <i>ID1</i>	58
Figura 19: Análisis de Enriquecimiento Funcional de Vías KEGG en Pacientes con Alta Expresión de <i>ID3</i>	59
Figura 20: Correlación entre la expresión de <i>ID1</i> e <i>ID3</i>	60
Figura 21: Correlación entre la expresión de <i>PD-1</i> e <i>ID3</i>	61
Figura 22: Análisis de Interacción Proteína-Proteína en BCP-ALL vs. Individuos Sanos.	62

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Criterios diagnósticos de BCP-ALL.	13
Tabla 2: Factores de alto riesgo en adultos con BCP-ALL.	14
Tabla 3: Factores de transcripción HLH.	19
Tabla 4: Poblaciones evaluadas y anticuerpos usados en la citometría de flujo.....	33
Tabla 5: Variables del estudio.	39
Tabla 6: Características de la población de estudio.	41
Tabla 7: Expresión de <i>ID1</i> en muestras evaluadas.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 8: Expresión de <i>ID3</i> en muestras evaluadas.	43
Tabla 9: Porcentajes de células del TIME evaluadas mediante citometría de flujo.....	46

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>BCP-ALL</i>	Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B
<i>ChT</i>	Quimioterapia
<i>INC</i>	Instituto Nacional de Cancerología
<i>LC</i>	Células leucémicas
<i>BM</i>	Médula ósea
<i>ID</i>	Inhibidor de diferenciación
<i>HLH</i>	Hélice-bucle-hélice
<i>TIME</i>	microambiente tumoral inmune
<i>OS</i>	Supervivencia global
<i>MDSC</i>	Células Supresoras Derivadas de Mieloides
<i>DC</i>	Células dendríticas
<i>MRD</i>	Enfermedad residual mínima
<i>CR</i>	Remisión completa
<i>HSC</i>	Células madre hematopoyéticas
<i>MPP</i>	Célula progenitora multipotente
<i>LP</i>	Célula progenitora linfoide
<i>Pro-B</i>	Célula progenitora B
<i>Pre-B</i>	Célula precursora B
<i>Ph</i>	Cromosoma Filadelfia
<i>AYA</i>	Adolescentes y jóvenes adultos
<i>DFS</i>	Supervivencia libre de enfermedad
<i>ALL</i>	leucemia linfoblástica aguda
<i>RT-qPCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
<i>Hyper-CVAD</i>	Ciflofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona
<i>HSCT</i>	Trasplante de células madre
<i>CAR-T</i>	Células T con receptores de antígeno quimérico
<i>TME</i>	Microambiente tumoral
<i>t-SNE</i>	Incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t
<i>TAM</i>	Macrófagos asociados a tumores
<i>CSC</i>	Células madre cancerosas
<i>TIL</i>	Células T intratumorales
<i>CTL</i>	Linfocitos T citotóxicos
<i>NET</i>	Trampas extracelulares de neutrófilos

Introducción

La leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (BCP-ALL, por sus siglas en inglés) es una neoplasia agresiva que afecta la maduración de las células B (1). Es el cáncer con mayor incidencia en niños, quienes suelen tener tasas de curación superiores al 90% en la mayoría de los países desarrollados. En adultos, los regímenes quimioterapéuticos son basados en los esquemas pediátricos; sin embargo, las tasas de curación no superan el 30 % (2). En Colombia, los esquemas terapéuticos implementados en BCP-ALL en adultos no han mostrado resultados satisfactorios (3). De esta manera, la resistencia a la quimioterapia (ChT, por sus siglas en inglés) multiagente intensiva permanece como un obstáculo significativo (4).

Uno de los desafíos en el tratamiento de la BCP-ALL es facilitar un enfoque terapéutico apropiado, por lo que la identificación de nuevos factores de pronóstico que permitan aumentar la precisión de la estratificación del riesgo es importante y así evitar sobretratamientos. En este contexto, el grupo de investigación en biología del cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INC), realizó un estudio donde se encontró que la sobreexpresión de los genes ID1 e ID3 de células leucémicas (LC, por sus siglas en inglés) en médulas óseas (BM, por sus siglas en inglés) provenientes de pacientes adultos con BCP-ALL en el momento del diagnóstico estaba asociada a un peor pronóstico en respuesta a la ChT (5). Los genes ID1 e ID3 han sido asociados con otros modelos tumorales incluyendo próstata, colon, colorrectal, tiroides entre otros e incluso han sido propuestos como blancos terapéuticos (6).

Las proteínas inhibidoras de la diferenciación (ID) son reguladores transcripcionales y se expresan ampliamente en distintos tipos celulares (7). Pertenecen a la familia de factores de transcripción hélice-bucle-hélice (HLH) y tienen la capacidad de formar homodímeros y

heterodímeros entre los miembros de esta familia (8,9) . En células tumorales, el aumento de las ID ha sido asociado con la disminución en la diferenciación y el aumento en la proliferación (10,11). Adicionalmente, se ha encontrado que, en modelos murinos, tanto ID1 como ID3 se asocian con el aumento de células supresoras en el microambiente tumoral inmune (TIME, por sus siglas en inglés) (12,13).

El TIME en la BM se caracteriza por ser un ambiente complejo que involucra interacciones entre las células hematopoyéticas y no hematopoyéticas que facilitan el proceso de la hematopoyesis. Sin embargo, las LC de la BCP-ALL transforman los nichos de la BM mediante alteraciones en la señalización celular, promoviendo la patogénesis y la evasión al tratamiento (14).

Con el fin de establecer si la expresión de ID1 e ID3 de las LC tiene una influencia sobre las poblaciones que conforman el TIME de la BM en pacientes con diagnóstico BCP-ALL, en este estudio se analizó las diferencias en la expresión de genes asociados a la respuesta inmune en BM de pacientes con BCP-ALL según la expresión de ID1 e ID3 en LC. Para ello, se incluyeron pacientes que ingresaron al INC, quienes mediante consentimiento informado aceptaron participar en este estudio.

Problema de investigación

De acuerdo con los datos reportados por Globocan para el año 2020, se estimó que a nivel mundial, las leucemias representaron el catorceavo tipo de cáncer con mayor incidencia y el onceavo en mortalidad (15). En Colombia, para este mismo año, las tasas de incidencia y mortalidad en adultos correspondieron al 6.8 y 5.4 por cada 100.000 personas, respectivamente. Estos datos muestran que casi el 80% de las personas que presentan estos diagnósticos fallecen por la enfermedad (16).

Es importante destacar que la BCP-ALL es la neoplasia más común en niños, donde el tratamiento ha tenido un éxito notable en oncología. Con los protocolos de ChT contemporáneos, la BCP-ALL pediátrica se ha vuelto altamente tratable, con tasas de supervivencia global (OS) superiores al 90 %. No obstante, el pronóstico de la enfermedad en población adulta disminuye sustancialmente de manera proporcional a la edad en el momento del diagnóstico (17).

La BCP-ALL se caracteriza por alteraciones genéticas recurrentes que inician la enfermedad y que son importantes para la estratificación del riesgo (2). Las variables de riesgo más relevantes incluyen la edad, el recuento de leucocitos y la respuesta al tratamiento, medida por presencia o ausencia de la enfermedad residual mínima (MRD) y la citogenética. La estratificación es crucial para la toma de decisiones en la elección del tratamiento (18). La falta de respuesta al tratamiento en adultos puede atribuirse a que los adultos albergan características de mayor riesgo en el momento del diagnóstico, tienen mayores comorbilidades y el desarrollo de resistencia a la ChT después de las recaídas. No obstante, los factores de riesgo predisponentes para adultos con BCP-ALL aún no son conocidos. La necesidad de mejorar los resultados de la BCP-ALL en adultos ha llevado a avances significativos en el desarrollo de fármacos, la reevaluación de la estratificación del riesgo y un mejor entendimiento de la patogenia de la enfermedad (19).

En este sentido, el aumento de ID1 e ID3 mostró estar correlacionado con las variables de riesgo anteriormente mencionadas, indicando que son biomarcadores valiosos para la estratificación del riesgo en población colombiana (5). Estos genes están involucrados en más de un sello distintivo del cáncer (6). Sin embargo, la evidencia sugiere que evitan la eliminación de las células tumorales por parte del sistema inmune, induciendo un aumento de perfiles tolerogénicos en las células inmunes que promueven la evasión del reconocimiento de células tumorales, especialmente en el TIME (13).

En modelos de melanoma murino, se encontró que ID1 tiene la capacidad de alterar la diferenciación mieloide. El aumento en la expresión de ID1 promovió la expansión de las Células Supresoras Derivadas de Mieloides (MDSC) en el TIME, mientras que, las Células Dendríticas (DC) disminuyeron (20). Las MDSC con alta expresión de ID1 condujeron a la inhibición de la activación de linfocitos T CD8+, el aumento del crecimiento tumoral y la progresión metastásica (20). Adicionalmente, se evaluó la expresión de ID1 en células mieloides provenientes de pacientes con diagnóstico de melanoma en estadio III, donde se encontró que el aumento de ID1 está asociado con la expresión de marcadores fenotípicos e inmunosupresores de MDSC monocíticas, mientras que la regulación negativa se asoció con un fenotipo mieloide más inmunogénico (13). Con respecto a ID3 en modelos murinos, se demostró que el aumento de ID3 regula positivamente el factor de transcripción FOXP3 en linfocitos T CD4+, lo que induce al aumento de células T reguladoras en el TIME (12,21). Estos estudios destacan los roles críticos de ID1 e ID3 en la supresión de la respuesta antitumoral durante la progresión del tumor, la modulación del TIME y finalmente la metástasis (22).

Es conocido que un mecanismo central en el desarrollo y progresión de las LC implica la generación de un TIME de tipo inmunosupresor el cual es mediado en parte por factores secretados por estas células (23,24). Especialmente en el microambiente de la BM, donde las interacciones celulares directas y la producción de factores solubles mantienen y promueven el desarrollo de la BCP-ALL, la angiogénesis y el inicio de un fenotipo invasivo y metastásico (25,26). En concordancia con lo anterior, las LC tienen la capacidad de evadir la eliminación inmunitaria. Aunque algunos mecanismos de evasión inmunitaria son similares tanto en el cáncer hematológico como en el sólido, las leucemias emplean métodos únicos para evadir el sistema inmunológico. Sin embargo, la forma en que las LC evaden el sistema inmunitario sigue sin comprenderse por completo (27,28).

Se sabe que la leucemia altera la composición celular y soluble de la BM. Se ha demostrado que la falta de presentación y procesamiento de antígenos contribuye a la regulación de la tolerancia de las células inmunitarias en las neoplasias malignas hematológicas (28). Sin embargo, la influencia de la expresión de los genes ID1 e ID3 en el TIME de la BM sigue siendo desconocido. Por tanto, en este estudio, la pregunta de investigación planteada fue ¿Existe una relación entre la expresión de ID1 e ID3 de los LC y la composición del TIME de la BM en pacientes con BCP-ALL?

Objetivos

I. Objetivo general

Establecer si hay una relación entre la expresión de ID1 e ID3 de los blastos leucémicos y el TIME en BM de pacientes adultos con BCP-ALL.

II. Objetivos específicos

- Evaluar la expresión de ID1 e ID3 en blastos a partir de BM de pacientes adultos con BCP-ALL.
- Caracterizar la población de células inmunitarias presentes en el TIME de la BM en adultos con diagnóstico de BCP-ALL.
- Establecer si hay diferencias en la expresión de genes asociados a la respuesta inmune en BM de pacientes con BCP-ALL según la expresión de ID1 e ID3 en blastos.

1. Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (BCP-ALL)

La BCP-ALL se caracteriza por un bloqueo en la diferenciación a nivel de las células progenitoras o precursoras de células B. Estas células adquieren alteraciones genéticas que inducen la proliferación y acumulación de células progenitoras linfoides, invadiendo la BM, la sangre y, eventualmente, sitios extramedulares (2,19,29). Como se destacó anteriormente, la BCP-ALL es el cáncer más común en niños, quienes presentan notables tasas de supervivencia. Sin embargo, en adultos, esta enfermedad suele ser de difícil tratamiento, lo cual puede atribuirse a las diferencias en las características biológicas entre ambos grupos de edad (18,30).

La BCP-ALL exhibe una distribución bimodal, con un primer pico de incidencia en individuos alrededor de los 5 años y un segundo pico alrededor de los 50 años. Se considera principalmente una leucemia pediátrica con un 80% de los casos en niños y un 20% en adultos (19). La mediana de edad al diagnóstico es de 14 años, y aproximadamente el 60% de los pacientes son diagnosticados antes de los 20 años. El 25 % alrededor de los 45 años y el 11 % alrededor de los 65 años (19). La BCP-ALL es relativamente poco común durante la niñez tardía, la adolescencia y la adultez temprana (19).

Aunque los factores de riesgo predisponentes de la BCP-ALL en adultos son desconocidos, a diferencia de la situación en la leucemia infantil, su tratamiento resulta más desafiante en el grupo adulto. La estrategia terapéutica para adultos se basa principalmente en el régimen de ChT multiagente intensiva, desarrollado hace cinco décadas para la BCP-ALL pediátrica, donde continúa demostrando eficacia. Este régimen comprende fases de terapia de inducción, consolidación, mantenimiento y profilaxis del sistema nervioso

central, con el objetivo de reducir la carga de LC a un punto no detectable morfológicamente, logrando así un estado de remisión completa (CR). Posteriormente, se busca alcanzar la negatividad en la MRD negativa (18,30).

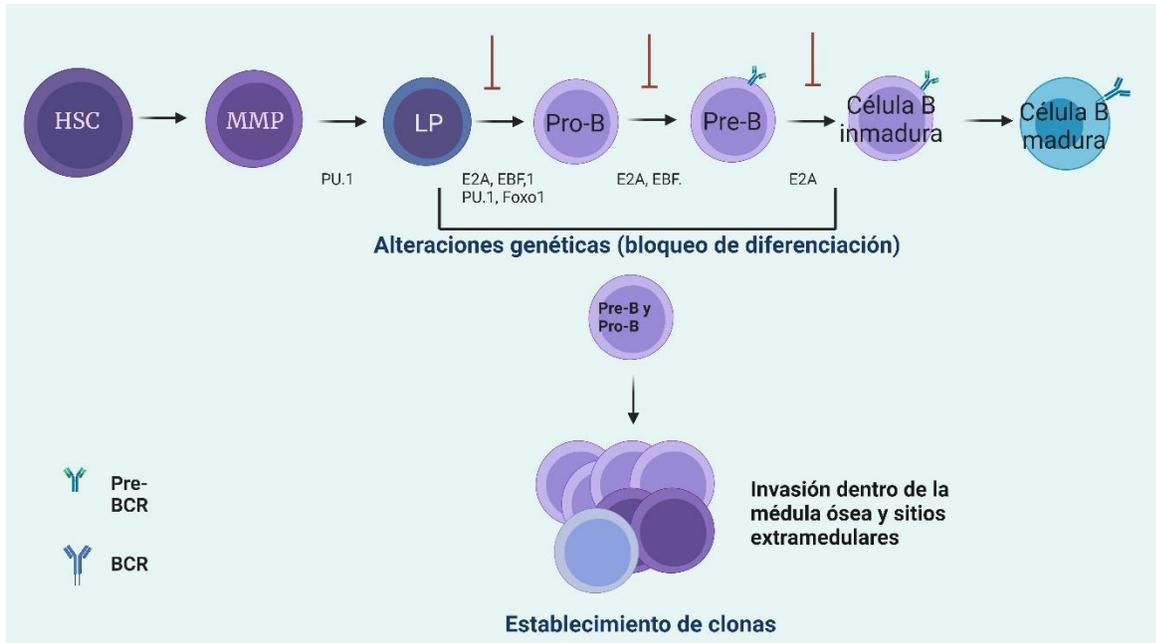


Figura 1: Maduración de las células B y el establecimiento de BCP-ALL. Imagen realizada con el software Biorender.

1.1 Maduración de las células B y biología de la BCP-ALL

La maduración de las células B requiere la coordinación de diversas señales mediadas por citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, presentes en el nicho de la BM. En la BM, las células madre hematopoyéticas (HSC) proporcionan las células progenitoras para todos los linajes sanguíneos, un proceso que implica la pérdida de su potencial multipotente y la adquisición de funciones específicas del tipo celular (**Figura 1**) (31). El factor de transcripción PU.1 desempeña un papel crucial en el desarrollo de células linfoides y mieloides. La colaboración de PU.1 con Ikaros aumenta el potencial linfoide y reduce el mieloides en la célula progenitora multipotente (MPP). La proteína E2A desempeña funciones críticas en las HSC, influyendo en la célula progenitora linfocítica (LP) para la diferenciación hacia células B. Estas proteínas activan factores de transcripción

posteriores, como EBF1 y Foxo1, formando una red clave para el compromiso del linaje de las células B (32).

La red compuesta por E2A, EBF1 y Foxo1 activa Pax5, lo que conduce a la diferenciación de la célula progenitora B (Pro-B) y reprime genes de otros linajes hematopoyéticos. Posteriormente, Pax5, EBF1 y E2A facilitan la diferenciación a un estadio de célula precursora B (Pre-B). Finalmente, las interacciones de E2A posibilitan la diferenciación a un estadio de célula B inmadura (33). Las alteraciones genéticas, como mutaciones puntuales o rearrreglos cromosómicos en las células LP, Pro-B y Pre-B, generan un bloqueo en la diferenciación de las células B. Estos eventos moleculares aumentan la proliferación, dando lugar a diversas clonas que invaden BM (34,35).

Sin embargo, los mecanismos responsables de esta detención del desarrollo de las células B en la BCP-ALL aún no se comprenden completamente, aunque se han propuesto posibles explicaciones

- Las alteraciones oncogénicas asociadas con BCP-ALL podrían interferir con las redes que controlan la diferenciación de células B.
- Las LC podrían perder la capacidad de respuesta a las señales externas que normalmente regulan la diferenciación de las células B. Alternativamente, el clon proliferante puede superar el suministro limitado de señales externas que inducen la diferenciación, sin dejar de tener la posibilidad de responder a ellas en el entorno adecuado.
- Los eventos oncogénicos asociados con la BCP-ALL podrían determinar el fenotipo de las células B al activar vías que imitan una etapa específica de la diferenciación normal de las células B (36).
- Es probable que la BCP-ALL, al igual que el cáncer en general, surja de interacciones entre exposiciones exógenas o endógenas, susceptibilidad genética (heredada) y eventos al azar (30).

Dentro de las alteraciones oncogénicas, se destacan los rearrreglos cromosómicos que incluyen las traslocaciones, como t(4;11)(q21;q23) *KMT2A*, la t(1;19)(q23;p13) *TC3-PBX1*, y la fusión de los genes *BCR-ABL1* generada por la t(9;22)(q34;q11), también conocida como cromosoma Filadelfia (Ph), que se presenta en aproximadamente el 25% de los

adultos diagnosticados BCP-ALL (17). Además, existe el fenotipo Ph-like, caracterizado por un perfil de expresión génica similar al Ph+ y asociado con la delección del gen *IKZF1* y sobreexpresión de *CLRF*, alteraciones en eventos de asociación a quinasas como *ABL1*, *PDGFRB* y *JAK2* (17,37).

Estas alteraciones genéticas se identifican en el momento del diagnóstico con el propósito de definir un tratamiento apropiado y estratificar el riesgo (17,37). a base genética de la BCP-ALL está influenciada por la edad de diagnóstico, como se mencionó previamente. La **Figura 2** ilustra los cambios en el genotipo de la enfermedad según la edad de diagnóstico, clasificando a los pacientes en adolescentes y jóvenes adultos (AYA) con edades de 15/18 a 35/40 años, adultos con edades de 35/40 a <55/60 y ancianos > 55/60 años y pacientes frágiles con edades superiores a los 70/75 años (17).

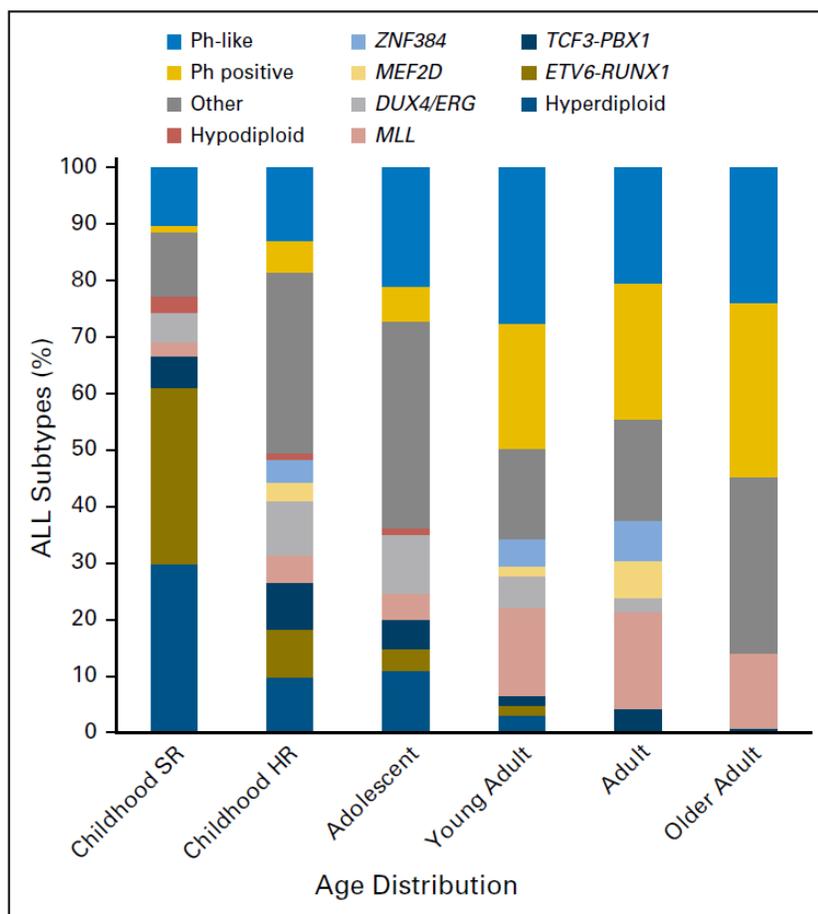


Figura 2: Distribución de edad de los subtipos de leucemia linfoblástica aguda (ALL). La prevalencia de los subtipos de LLA varía en niños con LLA de riesgo estándar (SR) (edad de 1 a 9 años), niños con LLA de alto riesgo (HR) (edad de 10 a 15 años), y adolescentes (de 16 a 20 años), adultos jóvenes (21 a 39 años), adultos (40 a 59 años) y adultos mayores (60 a 86 años) con

LLA. Otros, ALL de células B sin anomalías recurrentes; Ph, cromosoma Filadelfia. Tomada de: Ilaria Iacobucci et al., (2017)(37).

1.2 BCP-ALL en adultos

Los adultos diagnosticados con BCP-ALL presentan factores de riesgo más elevados en el momento del diagnóstico, así como comorbilidades, y debido a edades más avanzadas, a menudo requieren reducciones de dosis (19). Lamentablemente, el éxito del tratamiento observado en la BCP-ALL pediátrica no ha sido replicado en la población adulta. A pesar de las altas tasas de remisión completa (CR) en adultos, que alcanzan entre el 80% y el 90%, las tasas de curación son más bajas, oscilando entre el 40% y el 50% debido a las recaídas. No obstante, el pronóstico de la enfermedad varía según la edad del diagnóstico (19).

En AYA la OS a 5 años es del 67-78%. En adultos la supervivencia libre de enfermedad (DFS) es de 48% a los 3 años y 25% a los 5 años, con una OS del 54% a 5 años. En cambio, los ancianos tienen una media de OS de 7 meses, y el 24% experimenta una muerte temprana (17). Con el objetivo de proporcionar el tratamiento más apropiado, el diagnóstico se realiza mediante diversas técnicas de laboratorio, y en combinación con variables clínicas se realiza una clasificación del riesgo.

1.3 Diagnóstico y pronóstico en BCP-ALL

El diagnóstico de la BCP-ALL implica la evaluación de diversas características celulares, que incluyen morfología, inmunofenotipo, genética/citogenética y genómica. Estos aspectos se detallan en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2008, como se especifica en la **Tabla 1** **Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Diagnóstico de la ALL en adultos

Fase de diagnóstico	Resultados/Todos los subtipos	Recomendaciones
Morfología <ul style="list-style-type: none"> Médula ósea y sangre periférica Líquido cefalorraquídeo 	<ul style="list-style-type: none"> Blastos linfoides/indiferenciados ($\geq 20\%$ de afectación de la médula ósea). Morfología FAB L3 en la leucemia de Burkitt. Afectación del SNC. 	Obligatorio Recomendado Obligatorio
Immunofenotipo <ul style="list-style-type: none"> MPO (diagnóstico diferencial frente a LMA) Marcadores de linaje B: CD19, CD79a, cCD22 (al menos 2); otros: TdT, CD10, CD20, CD24, cIgM, sIg (kappa o lambda) Marcadores de linaje T: cCD3; otros: TdT, CD1a, CD2, CD5, CD7 CD4, CD8, TCR α/β o γ/δ Marcadores de células madre/mieloides (variables): CD34, CD13, CD33, CD117 	<ul style="list-style-type: none"> MPO negativa; marcadores B/T $>20\%$ (CD3, CD79a $>10\%$) LLA de linaje B: Pro-B/B-I (CD19/CD79a/cCD22+) Común/B-II (CD10+/cIgM-) Pre-B/B-III (cIgM+/sIg-) Madura-B/B-IV (sIg+) LLA de linaje T: Pro-T/T-I (cCD3/CD7+) Pre-T/T-II (CD2/CD5) Cortical-T/T-III (CD1a+) T/T-IV madura (CD3+/CD1a-) 	Obligatorio Obligatorio
Citogenética/genética <ul style="list-style-type: none"> Citogenética/FISH/RT-PCR CGH/SNP/GEP/NGS 	<ul style="list-style-type: none"> ALL con características clínico-biológicas adversas: ALL Ph+ (detección rápida, a terapia TKI) ALL t(4;11)+ LLA t(1;19)+ ALL otras citogenéticas de alto riesgo <ul style="list-style-type: none"> ALL con características clínico-biológicas adversas: ALL Ph-like ALL ETP ALL NOTCH1/FBW7-no mutado/RAS/ PTEN-alterado T- ALL IKZF1, CLRF2, MLL, TP53, CREBBP, alteraciones en RAS. 	Obligatorio Recomendado para nuevos ensayos clínicos
Estudio Marcador(es) de MRD: <ul style="list-style-type: none"> LAIP (inmunofenotipo)/sonda molecular (PCR) 	<ul style="list-style-type: none"> Clasificación del riesgo basada en el MRD 	Obligatorio

Almacenamiento de material de diagnóstico <ul style="list-style-type: none"> • Banco de células/almacenamiento de lisados de ADN/ARN/proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> • Estudios adicionales/futuros 	Muy recomendado
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------	-----------------

Tipificación HLA <ul style="list-style-type: none"> • Paciente/hermanos 	<ul style="list-style-type: none"> • Aplicación temprana del SCT en caso necesario 	Recomendado
----------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------

ALL: leucemia linfoblástica aguda; MPO: mieloperoxidasa; LMA: leucemia mielógena aguda; c: citoplasmática; IgM: inmunoglobulina M; s: superficie; Ig: inmunoglobulina; FISH: hibridación fluorescente in situ; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; Ph+: Filadelfia positivo; TKI: inhibidor de la tirosina cinasa; CGH: hibridación genómica comparativa; SNP: polimorfismo de nucleótido único; GEP: perfil de expresión génica; NGS: secuenciación de nueva generación; Ph: Filadelfia; ETP: precursor temprano de células T; T-ALL: ALL de células T; MRD: enfermedad residual mínima; LAIP: inmunofenotipo asociado a leucemia; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; HLA: antígeno leucocitario humano; SCT: trasplante de células madre.

Tabla 1: Criterios diagnósticos de BCP-ALL.
Tomada y modificada de Hoelzer et al., (2016) (17).

El estudio del inmunofenotipo desempeña un papel crucial en el diagnóstico, evidenciando el compromiso de la población de LC con el linaje de células B. La citometría de flujo multicolor es esencial para diferenciar la leucemia linfoblástica aguda (ALL) de linaje de células B de la de células T y para identificar marcadores de superficie celular. La BCP-ALL representa aproximadamente el 75% de los casos de ALL y se caracteriza por la expresión de CD19, CD22 y CD79a. La expresión de CD20 se observa en el 30% al 50% de los casos de BCP-ALL y se ha asociado con un peor pronóstico. La citometría permite identificar el origen de las células de linaje B atípicas y distinguir su tipo, ya sea Pro-B, común, Pre-B o maduras (17,38).

En cuanto a las pruebas de diagnóstico temprano, la detección molecular rápida mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-qPCR) o ensayos de hibridación *in situ* con fluorescencia principalmente para detectar reordenamientos del gen t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1, típico de la BCP-ALL Ph+, sensible a terapias dirigidas con inhibidores de la tirosina quinasa (17).

Factores de alto riesgo en la ALL del adulto

Factores de riesgo	Subconjuntos de riesgo (notas)	Recomendaciones
Relacionado con el paciente <ul style="list-style-type: none"> • Edad (años) • Estado funcional (puntuación ECOG) 	<ul style="list-style-type: none"> • >40/55/65 • >1 	Obligatorio Muy recomendable
Relacionado con la enfermedad <ul style="list-style-type: none"> • WBC ($\times 10^9$ /l) • Inmunofenotipo (subconjuntos B-T) • Citogenética (cariotipo) • Genética • Varios 	<ul style="list-style-type: none"> • >30 (linaje B)/>100 (linaje T) • Pro-B/t temprana y madura • Ph+/t(4;11)+/otros adversos • BCR-ABL1+/MLL+/PBX-E2A+/ <p>Ph-like/IKZF1del/ETP/ NOTCH1 no mutado</p> <ul style="list-style-type: none"> • Afectación del sistema nervioso central 	Obligatorio Obligatorio Obligatorio Obligatorio Recomendado para nuevos ensayos clínicos Obligatorio
Dinámica de respuesta <ul style="list-style-type: none"> • sensibilidad a los corticosteroides (recuento de blastos después de la pre-fase) • respuesta temprana de los blastos (morfología de la BM) • tiempo hasta la CR (número de ciclos) • MRD (molecular/LAIP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Mala respuesta a la prednisona ($\geq 1 \times 10^9$ /l) • Día 8-15 blastos $\geq 5\%$. • >1 ciclo (RC tardía) • MRD+ (post-inducción) 	Recomendado Recomendado Obligatorio Obligatorio

ALL, leucemia linfoblástica aguda; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; WBC: leucocitos; Ph+: Filadelfia positivo; Ph: Filadelfia; ETP: precursor temprano de células T; BM: médula ósea; CR: remisión completa; MRD: enfermedad mínima residual; LAIP: inmunofenotipo asociado a la leucemia.

Tabla 2: Factores de alto riesgo en adultos con BCP-ALL. Tomada y modificada de Hoelzer et al., (2016) (17).

Los resultados obtenidos en el diagnóstico permiten clasificar a los pacientes en subgrupos de alto riesgo y riesgo estándar (**Tabla 2**). Sin embargo, los grupos de alto riesgo se definen por varios factores relacionados con la enfermedad y algunos factores relacionados con el huésped. Los pacientes que no presentan factores de riesgo se definen como riesgo

estándar. Los pacientes con riesgo estándar tienen una OS de 5 años >70%. Dentro de los criterios de alto riesgo se encuentran la edad avanzada, la tolerancia reducida a los tratamientos, subtipos inmunológicos adversos, leucocitos >30.000 en el momento del diagnóstico refleja una carga tumoral más alta y se reconocen universalmente como variables de riesgo independientes que predicen una tasa de CR más baja y una duración de CR más corta (17).

La cinética de la respuesta a los primeros pasos del tratamiento también es un indicador pronóstico bien reconocido y cada vez más buscado. Esto se puede obtener a través de diferentes metodologías y en diferentes tiempos de tratamiento, que van desde la terapia de prefase (respuesta a la prednisona) hasta los días de inducción 8 a 15 (disminución de LC de la BM), al final de la inducción con el fin de evaluar CR y MRD negativa entre las 6-16 semanas después de iniciada la fase de inducción (17). La MRD negativa después de consolidación o MRD que sigue siendo positiva (17). La MRD es medible en el 95% de los pacientes con BCP-ALL, esta se evalúa mediante citometría de flujo y es comúnmente definida como el <0.01% de LC en la muestra o por RT-PCR si hay rearrreglos cromosómicos. La recaída es común en adultos de alto riesgo y su rescate resulta desafiante (17).

1.4 Tratamiento en BCP-ALL

Después de confirmar el diagnóstico, es crucial iniciar el tratamiento de manera inmediata (**Figura 3**). Con frecuencia, se opta por una terapia inicial que incluye corticosteroides, ya sea prednisona o dexametasona, de manera individual o combinada con otros medicamentos como vincristina o ciclofosfamida, durante un periodo de 5 a 7 días. Este enfoque terapéutico inicial facilita una reducción segura del tumor, previniendo en la mayoría de los casos la aparición del síndrome de lisis tumoral (17). El tiempo necesario para la terapia inicial también proporcionará la oportunidad de obtener los resultados de los estudios diagnósticos, como la citogenética y la genética molecular, especialmente cuando se requieren inhibidores de las tirosin quinasa como parte del tratamiento en algunos casos. La reacción a la terapia inicial determina la sensibilidad de la enfermedad a la quimioterapia y se incorpora en algunos estudios para evaluar el riesgo, ya que aquellos que responden bien a la prednisona pueden tener un pronóstico más favorable.

Durante la fase de inducción, el objetivo principal es lograr una CR, e idealmente, una CR molecular, cuya evaluación generalmente se realiza en un período de 6 a 16 semanas desde el inicio de la ChT (17). En adultos con BCP-ALL, se emplean dos enfoques de quimioterapia. Uno de ellos sigue los protocolos pediátricos BFM, ampliamente utilizado en ensayos clínicos europeos, con etapas de Inducción I, Inducción II, ciclos de consolidación y, ocasionalmente, re-inducción intermitente. La otra estrategia implica repetir dos ciclos de quimioterapia intensiva idénticos durante las fases de Inducción y Consolidación, sumando un total de ocho ciclos, como en el protocolo hyper-CVAD (ciflofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona), preferido en los Estados Unidos y otras regiones del mundo, como Colombia (17) con el objetivo de restablecer la hematopoyesis normal (39–42) La dexametasona suele preferirse a la prednisona, ya que penetra la barrera hematoencefálica y también actúa sobre las LC en reposo (17).

Una vez que se logra la CR, se administra la terapia de consolidación. Durante este ciclo se busca intensificar el resultado obtenido en la inducción, aumentando las posibilidades de mantener la CR (42–44) La terapia sistémica de dosis altas se utiliza principalmente para lograr concentraciones adecuadas en áreas de difícil acceso, como el sistema nervioso central. La mayoría de los protocolos constan de 6-8 ciclos que incluyen dosis altas de metotrexato o citarabina, a veces con la adición de asparaginasa (17).

Finalmente, en la fase de mantenimiento, se emplean 6-mercaptopurina o metotrexato orales, administrados semanal o mensualmente, con el propósito de eliminar las LC restantes y prevenir posibles recaídas (44) Algunos regímenes de tratamiento incorporan la repetición de vincristina, dexametasona u otros fármacos a intervalos más prolongados(17). El trasplante de células madre (HSCT) sigue siendo la opción curativa, indicado para recaídas de BCP-ALL refractarias, en casos de MDR positivas y mejora la OS en pacientes de alto riesgo que logran la primera CR (45). Las recaídas son recurrentes en adultos. Sin embargo, la incorporación de terapias dirigidas en los contextos de primera línea y de rescate ha mejorado la supervivencia en comparación con la quimioterapia convencional en adultos (41,44,46).

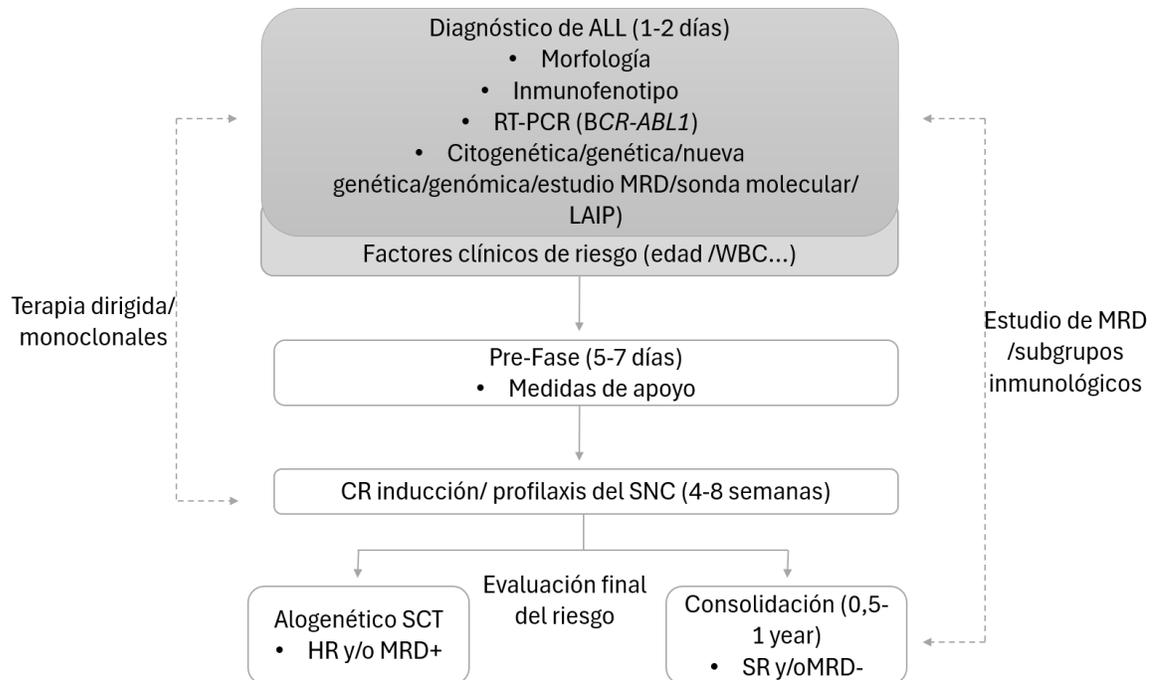


Figura 3: Diagnóstico y evaluación del riesgo en la BCP-ALL en adultos para la consecución de la CR y el tratamiento post remisión orientado al riesgo.

Los principales subconjuntos diagnósticos se identifican en 1-2 días para permitir el inicio de la terapia de pre-fase, identificar los casos elegibles para la terapia dirigida (TKI en LLA Ph+), y establecer el estudio MRD. La terapia de pre-fase permite el manejo/prevención de complicaciones metabólicas/infecciosas/hemorrágicas antes del inicio de la terapia de inducción, y comprueba la identidad HLA entre el paciente y sus hermanos. La terapia de inducción/consolidación temprana (que incorpora profilaxis del SNC) tiene como objetivo inducir la CR con una respuesta de MRD profunda, para apoyar la terapia posterior orientada al riesgo y la MRD con/sin SCT alogénico.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; MRD: enfermedad residual mínima; LAIP: inmunofenotipo asociado a la leucemia; WBC: glóbulos blancos; CR: remisión completa; SNC: sistema nervioso central; SR: riesgo estándar; RH: alto riesgo; SCT: trasplante de células madre; ITK: inhibidor de la tirosina cinasa; Ph+: Filadelfia positivo; HLA: antígeno leucocitario humano. Tomada y modificada de Hoelzer et al., (2016) (17).

La introducción de anticuerpos monoclonales cambió el paradigma del tratamiento. El rituximab, un anticuerpo Anti-CD20, se administra junto con Hyper-CVAD y ha demostrado mejorar los resultados en pacientes ancianos (45). Por otro lado, el blinatumomab, un BiTE (Bispecific T cell-engager), conecta la molécula CD3 de los linfocitos T con el CD19, un pan-antígeno de la BCP-ALL, provocando la lisis de las células leucémicas por parte de los linfocitos T. Aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para pacientes que alcanzan la CR pero aún mantienen la MRD positiva, este tratamiento les permite lograr la MRD negativa, convirtiéndolos en candidatos para el HSCT. Además,

puede administrarse como monoterapia y en la primera recaída de pacientes con alto riesgo (45). De manera similar, las células T con receptores de antígeno quimérico (CAR-T) han sido aprobadas por la FDA para el tratamiento de la BCP-ALL en casos de recaída o refractarios (45).

Con el objetivo de mejorar el pronóstico del tratamiento en pacientes colombianos diagnosticados con BCP-ALL, un estudio previo llevado a cabo en el INC se centró en la búsqueda de biomarcadores que pudieran predecir la respuesta a la ChT. Este análisis se basó en la identificación de diferencias en los perfiles de expresión génica entre pacientes que respondieron y aquellos que no respondieron a la quimioterapia de inducción. Como resultado, se encontró que la sobreexpresión de los genes *ID1* e *ID3* en los blastos de la BM de pacientes con BCP-ALL se asociaba con la falta de respuesta al tratamiento de inducción y un pronóstico desfavorable (5,47).

2. Genes ID

2.1 Función y clasificación

Las proteínas Helix-Loop-Helix básicas (bHLH) representan una clase bien conocida de reguladores transcripcionales. Se dividen en 7 clases distintas (22) muchas proteínas bHLH actúan como heterodímeros con miembros de una clase de proteínas ubicuas, las proteínas E de la clase I (**Tabla 3**) (7,8,10,23). También existe una clase ampliamente expresada de heterodímeros inhibidores asociados, las proteínas ID De la clase V (7).

las proteínas ID desempeñan diversas funciones según el tipo de célula, su transcripción está sujeta a diferentes vías de señalización que son activadas por estímulos como citoquinas, ligandos, receptores de células T y proteínas morfogénicas de la BM (6,22,48,49). Dentro de las funciones de las ID se encuentran el desarrollo y la

diferenciación, la proliferación celular y también han sido asociado a diferentes enfermedades como el desarrollo de cáncer (7). Adicionalmente, las proteínas ID desempeñan un papel crucial en la maduración de las células B, puesto que en varios estadios dentro desde proceso de diferenciación que abarca desde las HSC hasta las células B, debido a que dentro de estos estadios se requieren las proteínas E como factores de transcripción, de este modo, en cada estadio interactúan con las ID (7).

Clase	Dominio estructural	Miembros representativos	Propiedades y función
I	bHLH	Familia de proteínas E (E12, E47, E2-2/TCF-4/ITF-2, HEB)	Amplia expresión; Auto o heteroasociación con proteínas de clase II; Regulación de la neuro, mio y linfogénesis.
II	bHLH	Factores reguladores miogénicos (MyoD, miogenina, Mrf4, Myf-5,6); NeuroD/Beta2; Mash-1, d/e-HAND; Twist.	Específicos de tejido; Heteroasociación con proteínas de clase I; Regulación de la miogénesis (factores reguladores miogénicos), diferenciación de las células de los islotes (NeuroD/Beta2), neurogénesis (Mash-1), morfogénesis cardíaca (d/e-HAND) y desarrollo del mesodermo (Twist))
III	bHLH-LZ	Familia MiT (MiTF, TFE3, TFEB, TFEC); Myc	Maduración de melanocitos (MiTF), activación de células B (TFE3), vascularización placentaria (TFEB), desarrollo de osteoclastos (MiTF, TFE3, TFEC), proliferación/diferenciación celular, oncogénesis y apoptosis (Myc).
IV	bHLH-LZ	Familia Mad (Mad1/3/4, Mxi1), Max	Homodimerización o heterodimerización con Myc; Regulación de la proliferación celular
V	HLH	Proteínas Id (Id1-4)	Heterodimerización con proteínas de clase I y, en menor medida, de clase II; Regulación de la proliferación/diferenciación celular durante el desarrollo y en el cáncer.
VI	b(Pro)HLH	Familia HES (HES1-7)	Regulación de la proliferación/diferenciación celular durante la embriogénesis
VII	bHLH-PAS	AhR, HIF α , SIM, ARNT	Regulación de los genes de respuesta xenobiótica (AhR/ARNT) e hipóxica (HIF α /ARNT), y del desarrollo neural (SIM/ARNT).

Tabla 3: Factores de transcripción HLH. Tomada y modificada de Roschger et al., (2017) (6).

2.2 ID y el cáncer

Las proteínas ID han sido vinculadas a diversos aspectos característicos del cáncer, como el mantenimiento de las células madre tumorales, la tumorigénesis, la neovascularización y la formación de metástasis (10,11,22,50). Además, se han asociado con la resistencia a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la evasión de la destrucción inmunitaria y la promoción del microambiente tumoral (TME) excluyente (20,22,50–54).

La desregulación de las proteínas ID se ha vinculado con diversas neoplasias malignas, abarcando tumores en la vejiga, mama, próstata, hígado y cerebro (55). Considerando las diversas asociaciones potenciales de interacción y las funciones celulares específicas de las proteínas ID, resulta desafiante realizar predicciones uniformes y exhaustivas sobre el papel de estas proteínas en varios tipos de tumores, como los cánceres sanguíneos, incluyendo linfomas y leucemias (55).

Es fundamental comprender los factores que pueden influir en los resultados fisiológicos en comparación con los resultados tumorigénicos, los cuales son impulsados por las proteínas E e ID. Las similitudes fenotípicas observadas en los tumores derivados de linfocitos que se desarrollan en ratones con sobreexpresión de ID y en ratones mutantes nulos de la proteína E indican que las proteínas ID suelen ejercer sus funciones en estos tumores mediante la inhibición de la actividad de la proteína E. La expresión adecuada y la interacción precisa entre las proteínas E e ID desempeñan un papel crucial en la regulación de los resultados del desarrollo. La alteración de este equilibrio conlleva a la pérdida de control, a menudo predisponiendo a las células a la transformación maligna. **(Figura 4)** (55). En relación con BCP-ALL, se observó que la sobreexpresión ID1 e ID3 en células leucémicas se asociaba con un desenlace desfavorable en respuesta al tratamiento (5,47).

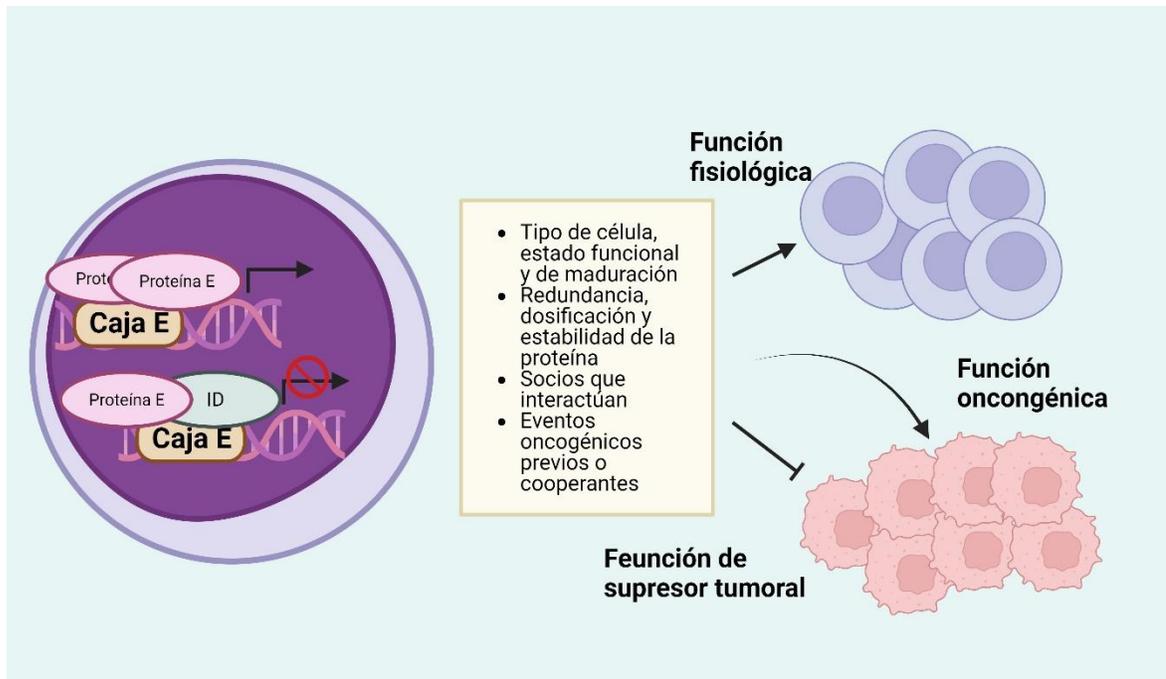


Figura 4: Factores que influyen en las funciones dependientes del contexto de las proteínas E e ID en el desarrollo y el cáncer.

Tomada y modificada de Sumedha Roy, et al., (2018)(55). Imagen realizada con el software Biorender.

En la última década, ha aumentado considerablemente el interés en las vías biológicas que contribuyen a la falta de respuesta al tratamiento, lo que ha conducido al descubrimiento de alteraciones genéticas y epigenéticas relacionadas con la resistencia. Este enfoque también ha dado lugar al modelo de evolución clonal, que se basa en la heterogeneidad tumoral (56). Se ha observado que las LC alteran el microambiente de la BM, favoreciendo su desarrollo a expensas de la hematopoyesis normal. En consecuencia, desempeñan un papel fundamental al estimular y respaldar la supervivencia y progresión de las LC, lo que incide de manera significativa en el resultado del tratamiento, ya sea con éxito o fracaso (56,57). No obstante, hasta el momento no se ha determinado si la sobreexpresión de los genes *ID1* e *ID3* tiene consecuencias en el TME de la leucemia, especialmente en las poblaciones inmunitarias (5,47).

3. Microambiente tumoral

3.1 Microambiente tumoral

La BM ha sido considerada durante mucho tiempo un órgano hematopoyético que desempeña un papel crítico en el soporte de la hematopoyesis normal a lo largo de la vida y está compuesta por múltiples tipos celulares, incluyendo HSC, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliales, perivasculares, estromales mesenquimatosas, neuronales y pericitos, así como células hematopoyéticas (58,59). Estas células rodean físicamente a las células hematopoyéticas y regulan activamente los procesos hematopoyéticos no solo a través de la secreción de citoquinas, hormonas y factores de crecimiento, sino también mediante la expresión de receptores y moléculas de adhesión (60). Además, a pesar de que la BM normal carece de áreas organizadas de células T y B, es un nido para las células inmunológicas innatas y adaptativas, que funcionan, migran y se retienen selectivamente (61–64).

3.2 Microambiente tumoral inmune (TIME)

Además de ser un órgano hematopoyético, la BM cumple las funciones de un órgano linfóide primario, donde se inician y mantienen las respuestas inmunológicas (65,66). El microambiente de la BM alberga una variedad de células inmunológicas, incluyendo células T y B, células plasmáticas, DC, neutrófilos y macrófagos. Estas células proporcionan un "nicho inmunológico" implicado en la regulación de la homeostasis de las HSC y la hematopoyesis de emergencia mediante la secreción de citoquinas, hormonas y factores de crecimiento, así como la expresión de receptores y moléculas de adhesión (60,65,66). Este nicho parece ejercer una función protectora sobre las HSC al establecer un entorno inmunosupresor o un sitio inmunológico privilegiado donde múltiples mecanismos trabajan juntos para prevenir el ataque inmunológico e incluso permitir la supervivencia prolongada de LC (4,67,68).

Con el propósito de profundizar en este tema y explorar en detalle cada una de las poblaciones que forman parte del TIME, elaboramos un artículo de revisión a lo largo del desarrollo del proyecto. Dicho artículo se encuentra adjunto como (Anexo 1) y también está disponible para su lectura en el siguiente enlace:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1325255/full>

4. Metodología

4.1 Consideraciones éticas

La realización del presente trabajo sigue las recomendaciones para investigar con seres humanos promulgadas por el código de Nüremberg, Declaración de Helsinki (Corea 2008) e Informe Belmont y por la legislación Colombiana Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, que establece las normas académicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

El estudio igualmente se realizará ajustado a otras normas científicas, técnicas y administrativas para la Investigación en Salud establecidas por en los siguientes documentos regulatorios:

- RESOLUCION NUMERO 1995 DE 1999 (Julio 8) Por la cual se establecen normas para el manejo de la Historia Clínica
- RESOLUCION 001715 DE 2005 (junio 13) por la cual se modifica la Resolución 1995 del 8 de julio de 1999.
- Pautas Internacionales para la Evaluación Ética de los Estudios Epidemiológicos. Preparado por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), 1991.
- Resolución 3492 de 1998, Resolución 2935 del 2001 del Instituto Colombiano Agropecuario, Decisión 391 de la Comunidad Andina de Naciones. Decreto 309 del 2000 del Ministerio de Medio Ambiente.)

4.2 Buenas prácticas de laboratorio

De acuerdo con la resolución 8430 de 1993, éste trabajo se considera como “investigación con riesgo mínimo”, puesto que no se harán intervenciones a los pacientes. El proyecto se realizó con muestras provenientes de pacientes que participaron de manera voluntaria en el estudio y que dejaron constancia escrita de aceptación mediante la firma de un

consentimiento informado general. Estos pacientes fueron informados sobre el propósito del estudio. La información suministrada por ellos es de carácter confidencial y los resultados obtenidos en el estudio se emplearon únicamente con fines científicos.

Después de la firma del consentimiento informado general, se tomaron muestras BM. Las muestras de BM se tomaron dentro del procedimiento de rutina para el diagnóstico en la consulta de hematología. Los procedimientos realizados con la BM no interfirieron con el diagnóstico o tratamiento médico requerido para su enfermedad. Las muestras obtenidas serán codificadas de manera que la identidad del participante permanezca anónima.

La aplicación de este consentimiento estuvo sujeta a aprobación por el Comité de Ética e Investigaciones del INC. El uso de estas muestras almacenadas solo será posible en el marco de un proyecto de Investigación aprobado por los comités de ética de las instituciones participantes que acepten el uso de estas muestras almacenadas para alcanzar los nuevos objetivos planteados.

Los procedimientos de la investigación serán efectuados por personas calificadas y competentes desde el punto de vista clínico y metodológico. La responsabilidad del estudio recae en los investigadores principales, quienes cuentan con los recursos técnicos y científicos para hacerlo competente.

4.3 Tipo de estudio, criterios de inclusión y exclusión

4.3.1 Tipo de estudio

Fue un estudio exploratorio descriptivo observacional en el cual se evaluó la asociación de ID1 e ID3 con la composición del TIME en la BM.

4.3.2 Sujetos del estudio

Universo del estudio: Pacientes adultos mayores de 18 años que asisten a la consulta de Hematología en el INC, con diagnóstico nuevo de BCP-ALL.

4.3.3 Calculo de la muestra:

Este fue un estudio exploratorio y descriptivo que no requirió cálculo del tamaño de la muestra. Sin embargo, para efectos del estudio se recolectaron muestras de pacientes con diagnóstico de BCP-ALL que cumplieron con los criterios durante febrero de 2021 y septiembre de 2022.

4.3.4. Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años diagnosticado con nuevo de BCP-ALL en el INC.
- Pacientes que no hayan iniciado ningún esquema de tratamiento quimioterapéutico previo al diagnóstico.
- Pacientes candidatos a recibir esquema de quimioterapia combinada de acuerdo con el protocolo institucional.
- Pacientes de los cuales se pueda obtener una muestra de BM antes del tratamiento de inducción.
- Pacientes a los que se pueda acceder a la historia clínica

4.3.5 Criterios de exclusión

- Pacientes que hayan abandonado el tratamiento
- Pacientes que hayan tenido una enfermedad neoplásica previa al diagnóstico de BCP-ALL.
- Quimioterapia previa para cualquier tipo de cáncer.
- Pacientes de los que no sea posible obtener muestra de BM.

4.4 Obtención de médula ósea y metodología por objetivo

Una vez fue manifestado el deseo de participación en el estudio por parte de los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, se firmaron los consentimientos informados (previamente aprobado por el Comité de Ética e Investigaciones del INC). Posteriormente, se tomó una parte de la muestra de BM obtenida para el diagnóstico clínico, con el fin de realizar los análisis del presente estudio.

Cabe resaltar que las muestras de BM fueron obtenidas antes de conocer el diagnóstico de los participantes en el estudio. Dicho lo anterior, se recolectaron 13 BM de las cuales dos tuvieron que ser excluidas del estudio porque los participantes fueron diagnosticados con HIV. De las 11 muestras restantes un participante fue usado como control debido a que fue un individuo sano (**Figura 5**).

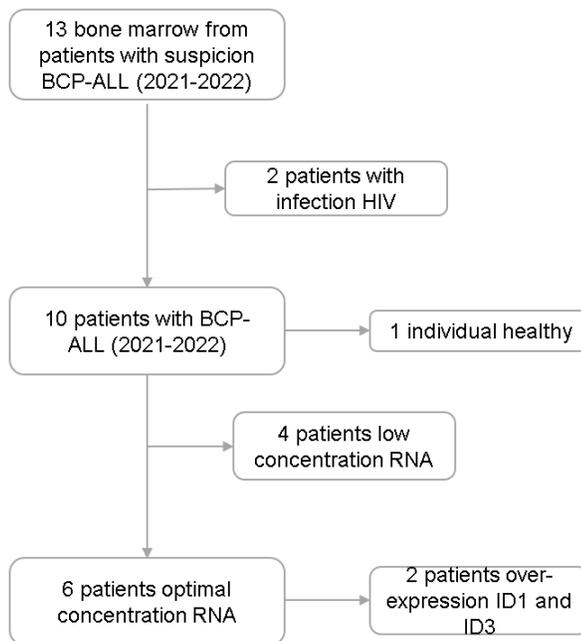


Figura 5: Participantes del estudio de investigación.

Se obtuvieron inicialmente 13 muestras de pacientes con sospecha de BCP-ALL. Sin embargo, dos de estos pacientes fueron diagnosticados con HIV y fueron excluidos del estudio. Además, un individuo no presentó neoplasia alguna, por lo que su muestra se utilizó como control. De los 10 pacientes restantes con diagnóstico de BCP-ALL, se llevaron a cabo los ensayos correspondientes a los objetivos 1 y 2. No obstante, al realizar los ensayos de RNA-seq, se encontró que todas las muestras no cumplían con los requisitos de cantidad de RNA, lo que llevó a la realización de este ensayo en solo 6 muestras.

Posterior a la obtención de la muestra de BM esta fue centrifugada a 2.500 rpm durante 15 minutos con una aceleración de 9 y desaceleración de 5. Esto, con el fin de obtener un concentrado de glóbulos rojos, plasma y buffy coat. Después de obtener el Buffy coat se usó buffer de lisis de glóbulos rojos, cabe resaltar que, para realizar los tres objetivos planteados en este proyecto, el buffy coat fue fraccionado en tres partes para dar cabalidad a cada objetivo de este proyecto como se muestra en la **Figura 6**.

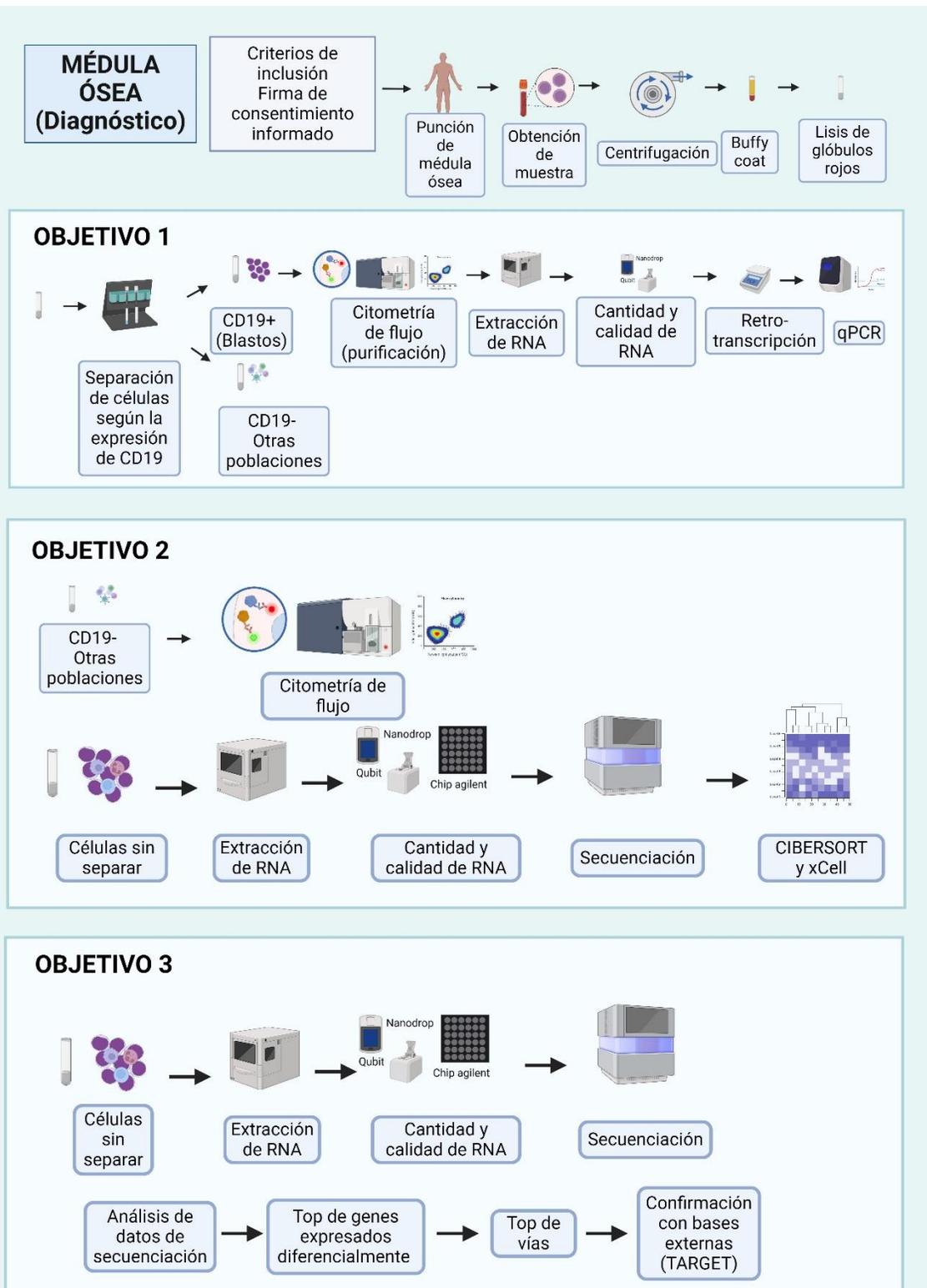


Figura 6: Metodología.
Resumen de la metodología por objetivo.

4.4.1 Lisis de glóbulos rojos

Posterior a la centrifugación con ayuda de pipeta pasteur se separó la fracción de buffy coat en un tubo nuevo al cual se le agregó Buffer ACK (Lonza) y se dejó incubar durante 10 minutos, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Este proceso se realizó dos veces y posteriormente hacer dos lavados con PBS 1X en centrifuga. El pellet celular obtenido de este proceso fueron las células listas para su uso posterior.

4.3.6.1 Metodología objetivo 1

Evaluar la expresión de ID1 e ID3 en LC a partir de BM de pacientes adultos con BCP-ALL

4.3.2.1 Separación de células CD19+: Con el fin de obtener las LC se usó el panmarcador de células de origen B CD19, la separación de estas células se realizó mediante la selección positiva de células que presentaran CD19 a través de microperlas.

- Al pellet generado se le agregó buffer Miltenyi y microperlas de selección positiva para CD19 y se mezcló muy bien.
- Posteriormente se hizo una incubación de 15 minutos a 4°C. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con buffer Miltenyi y centrifugadas posteriormente.
- El pellet se resuspendió nuevamente en buffer Miltenyi y fue colocado sobre la columna de separación previamente lavada con el mismo buffer. Esta columna se puso sobre un soporte de imán.
- Se uso un tubo de recolección mientras la muestra pasaba a través de la columna y posteriormente, la columna fue lavada dos veces con buffer Miltenyi con el fin de eliminar las células no específicas (negativas para CD19).
- Finalmente, se cambió de tubo de recolección y la columna fue separada del imán y las células CD19+ fueron recuperadas al lavar la columna con Buffer Miltenyi. Las células recuperadas fueron centrifugadas y resuspendidas en Buffer Miltenyi.

- Para evaluar la purificación de las células obtenidas, se hicieron citometrías de flujo midiendo los marcadores de expresión clásicos de las LC tales como CD10, CD34, CD45 y CD19. No obstante la pureza solo correspondía al valor de las células positivas para CD19.

4.4.2 Extracción de RNA:

Posterior a la obtención de las LC definidas como positivas para CD19 se realizó extracción de RNA por medio del kit de extracción AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen).

- Al pellet se le agregó buffer RLT plus y se homogenizó, posteriormente se centrifugó y descartó el sobrenadante.
- Posteriormente se transfirió el lisado homogenizado a una columna de DNA AllPrep en un tubo recolector y se centrifugó.
- Se agregó etanol (96-100%) y luego se transfirió la muestra a la columna RNeasy colocada en un tubo de recolección.
- Después se agregó buffer RW1 en una columna de RNeasy para centrifugar y descartar el sobrenadante.
- Se agregó buffer RPE a la columna de RNeasy, se cerró y centrifugó (lavado de columna), se desechó el flujo continuo y luego se agregó nuevamente buffer RPE y se centrifugó.
- Luego se colocó la columna RNeasy en un nuevo tubo de recolección de 1,5 ml. Se agregó agua libre de RNasas directamente a la membrana de la columna y centrifugó. (elución de RNA).

4.3.2.3 Cuantificación de RNA.

El ARN total se cuantificó mediante el kit de Qubit RNA HS assay el cual es una prueba fluorométrica.

- Se preparó la solución de trabajo agregando el buffer y el reactivo Qubit (fluorometro).

- En un tubo eppendorf de 500µL se mezcló la solución de trabajo con los estándares usados para calibrar el equipo y las muestras a las que se les cuantificó el RNA.
- Las muestras fueron homogenizadas mediante vortex e incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos.
- Finalmente, las muestras fueron leídas en el equipo Qubit, obteniendo así la concentración de RNA en ng/mL de cada muestra.

Para evaluar la calidad de RNA se utilizó equipo de nanodrop el cual permite obtener la relación 260/230.

4.3.2.4 Análisis de la expresión de ID1 e ID3. La expresión de los genes ID1 e ID3 se realizó mediante q-PCR. Esta consistió en dos etapas:

Retrotranscripción: para este proceso se utilizó el kit Superscript III reverse transcriptase de invitrogen

- A las muestras se les agregó dNTPs y random primers y posteriormente se incubaron a 65 °C y luego congelar.
- Luego se agregó buffer máster mix, DTT, RNasa out y superscript III, se incubó por 5 minutos a 25°C y posteriormente a 50°C por 45 minutos nuevamente y después se inactivó la reacción a 70°C por 15 minutos.

Reacción q-PCR

Se utilizaron sondas TaqMan específicas de los genes de interés en este caso ID1 (Hs036766575_s1), ID3 (HS00955037) y GAPDH (Hs03929097_g1) como gen constitutivo y el TaqMan fast advanced como master mix.

- Se realizaron ensayos por triplicado en placas de 96 pozos.
- Se mezclaron las sondas Taqman, master mix y agua libre RNAsas y se depositaron los pozos correspondientes.

- Se depositó la muestra y luego fueron llevadas al equipo Quant Studio 3 para su posterior amplificación y cuantificación.
- Posteriormente en el software Quantstudio se calculó el valor de los Ct.

4.3.3 Metodología objetivo 2

Caracterizar la población de células inmunitarias que están presentes en el TME de la BM en pacientes adultos con diagnóstico de BCP-ALL.

Para el análisis del inmunofenotipo de las poblaciones del TIME de la BM se realizó citometría de flujo

- Las células negativas para CD19, las cuales fueron las células restantes a los blastos obtenidos mediante columnas de separación como se mencionó en la metodología del objetivo número uno, fueron lavadas con PBS y centrifugadas.
- Después de centrifugadas se resuspendieron en PBS y se agregaron los anticuerpos extracelulares con el fin de marcar las células T CD4+ y CD8+, macrófagos M1 y M2, MDSC, NK y T reg con los anticuerpos descritos en la (**Tabla 4**), por un periodo de 20 minutos.
- Con el fin de marcar FOXP3 el cual es un factor de transcripción y por lo tanto una proteína intracelular, se usó el kit de intrasure de BD el cual requirió agregar el reactivo A incubar y lavar con PBS.
- Posteriormente se agregó el reactivo B y se pusieron los anticuerpos de proteínas intracelulares, posteriormente, se agregó el anticuerpo de FOXP3 y se dejó incubando por 20 minutos.
- Finalmente, las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas.
- Una vez la muestra estaba lista, las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo FACS_Aria III de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia.
- Posteriormente, se obtuvieron los archivos fcs y fueron leídos en el software Infinicity de cytognos.

Ubicación de la proteína	Célula	Proteína	Anicuerpo conjugado	
Extracelular	Células T	CD3	Anti CD3 PE	
	Células T CD4+	CD4	Anti CD4 FITC	
	Células T CD8+	CD8	Anti CD8 APC	
	Macrófagos	CD68	Anti CD68 Brilliant Violet 785	
	Macrófagos M2	CD163	Anti CD163 Brilliant Violet 510	
	Natural killer		CD16	Anti CD16 Alex Fluor 700
			CD56	Anti CD56 Pacific Blue
	MDSC		HLA-DR	Anti HLA-DR Alexa fluor 647
			CD11b	Anti CD11b PE/Cyanine7
			CD33	Anti CD33 APC/Fire 750
Intracelular	Células T reguladoras	CD25	Anti CD25 Percp/cyanine5.5	
		FOXP3	Anti FOXP3 PE/Dazzle 594	

Tabla 4: Poblaciones evaluadas y anticuerpos usados en la citometría de flujo.

4.3.4 Metodología objetivo 2 y 3

Establecer si hay diferencias en la expresión de genes asociados a la respuesta inmune en BM de pacientes con BCP-ALL según la expresión de ID1 e ID3 en blastos.

Este objetivo se realizó mediante secuenciación de nueva generación del transcriptoma completo (RNA-seq) en el Stanley S. Scott Cancer Center LSU, por lo tanto, mientras las muestras fueron incluidas y procesadas para la extracción de RNA como se indica en la (figura 4) las muestras fueron almacenadas a temperatura de -80°C hasta su procesamiento en el INC, una vez finalizó la recolección de las muestras, estas fueron enviadas a Louisiana en condiciones de temperatura óptimas.

Las bibliotecas se generaron utilizando la preparación de RNA monocatenario total de Illumina con el kit de preparación de bibliotecas Ribo-Zero Plus siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, primero se eliminó el RNA ribosómico del RNA total (100 ng). Tras la purificación, se fragmentó el RNA y se sintetizó DNAC de primera y segunda cadena. Se crearon bibliotecas a partir del DNAC adenilando primero el extremo 3' y ligando anclajes a los extremos. A continuación, se realizó un paso de amplificación de 13 ciclos de PCR para añadir índices únicos a los productos ligados. Las bibliotecas resultantes se cuantificaron con el kit de ensayo de alta sensibilidad Qubit dsDNA y el tamaño y la pureza se evaluaron con el bioanalizador Agilent 2100. La secuenciación se realizó en el instrumento NextSeq 2000 de Illumina utilizando un kit NextSeq 2000 P2 de 200 ciclos con lecturas de 76 pb en el extremo del par. Los archivos FASTQ se cargaron en Partek Flow para su análisis, del siguiente modo: los contaminantes (ADNr, ARNt, ADNmtr) se eliminaron con Bowtie 2 (v2.2.5) y las lecturas se alinearon con hg38 con STAR v2.7.8a y se cuantificaron con RefSeq Transcripts 93. Funciones (genes) con ≤ 5 lecturas por muestra. La normalización se realizó con la media recortada de los valores M seguida de la transformación \log_2 (TMM, $=0,0001 / \text{TMM} / \log_2$). Se utilizó DESEQ2 para identificar los genes expresados diferencialmente entre las muestras que sobreexpresaban *ID1*, *ID3* o ambos ($n=2$) frente a las que tenían una expresión basal de dichos genes ($n=4$). Para seleccionar los genes expresados diferencialmente se utilizó una tasa de falsos descubrimientos (FDR) $\leq 0,05$ y un fold change $\geq 2,0$. Mapas de calor y vías y GO term (KEGG).

4.4 Análisis de información

4.4.1 Objetivo 1

Se utilizó en programa R con el paquete “R Commander” para establecer el punto de corte en la expresión de los genes ID1 e ID3. Se evaluó la expresión de los genes ID1 e ID3 y se utilizó como gen consecutivo GAPDH y las pruebas se hicieron por triplicado. La cuantificación se realizó por medio de Ct comparativos mediante el método de $\Delta\Delta Ct$ y posteriormente fold change. Se halló la mediana del fold change y de acuerdo con esta, se dividieron los resultados por cuartiles. Las muestras que tuvieron un resultado mayor al cuartil 75 fueron consideradas como el grupo de sobreexpresión, los valores menores al cuartil 75 fueron considerados como el grupo de expresión basal.

4.4.2 Objetivo 2

Para los datos obtenidos de la citometría de flujo se realizaron los análisis estadísticos y gráficos utilizando el Software GraphPad Prism. Los datos tuvieron una distribución normal y fueron analizados mediante prueba t Student no pareada. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con valores de p menores a 0.05. Adicionalmente se usó el programa OMIQ para hacer las gráficas de incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t (t-SNE).

Para los datos obtenidos de secuenciación se realizaron los siguientes análisis:

Obtención de Datos de Expresión por RNA-seq:

Se recopilaron los datos de expresión por RNA-seq para las muestras de BM. Estos datos representan los niveles de expresión de los genes en cada muestra.

Selección de Herramientas de Deconvolución (estimación del infiltrado inmune):

Se seleccionaron las herramientas adecuadas para realizar la deconvolución de los datos de RNA-seq. En este caso, se utilizó el método CIBERSORT y el paquete xCELL en R para estimar la composición celular en las muestras.

Preprocesamiento de los Datos:

Antes de realizar la deconvolución, los datos de expresión de RNA-seq se preprocesaron y normalizaron para corregir efectos técnicos y asegurar la comparabilidad entre las muestras.

Aplicación de CiberSort y Paquete xCELL:

Se utilizó la herramienta CiberSort para estimar la proporción de diferentes tipos de células inmunes en las muestras. Además, se empleó el paquete xCELL en R, que utiliza un enfoque similar para la estimación de la composición celular a partir de los datos de expresión génica.

Interpretación de los Resultados:

Los resultados de la deconvolución proporcionan estimaciones de la proporción de diferentes tipos de células inmunes en cada muestra. Estas estimaciones permiten entender la composición celular de las muestras y cómo difieren entre grupos de interés.

4.2.3 Objetivo 3

Metodología para el Análisis de Expresión Diferencial entre Grupos de Pacientes con Alta y Baja Expresión del Gen de Interés

Obtención de Datos de Expresión Génica:

Se seleccionaron muestras de tejido biológico de los pacientes de los grupos de interés (alta y baja expresión del gen de ID1 e ID3) se realizó extracción de ARN y posteriormente la secuenciación de ARN (RNA-seq) utilizando una plataforma Illumina, para obtener los perfiles de expresión génica. Seguidamente los archivos crudos de datos de RNA-seq (Raw data) fueron sometidos a un proceso inicial de calidad para eliminar lecturas de baja calidad y posibles artefactos. Se llevaron a cabo procedimientos de alineación de secuencias, utilizando la herramienta HISAT2, para mapear las lecturas de ARN al genoma de referencia.

Para la normalización de datos se aplicó el método de normalización TMM (Trimmed Mean of M-values), para compensar las diferencias en la profundidad de la secuenciación y otros sesgos técnicos entre las muestras.

Preparación de los Datos de Expresión:

Se obtuvieron datos de expresión génica mediante RNA-seq para cada paciente en los grupos de interés (alta y baja expresión del gen de ID1 e ID3). Estos datos se preprocesaron para realizar la normalización, filtrado y corrección de posibles efectos no deseados, garantizando la calidad de los datos de expresión.

Análisis de Expresión Diferencial con DESeq2:

Se utilizó el paquete DESeq2 en R para realizar el análisis de expresión diferencial. DESeq2 utiliza un modelo estadístico basado en la distribución de Poisson negativa para identificar genes cuya expresión varía significativamente entre grupos. Se calcularon estadísticas y puntuaciones ajustadas para controlar la tasa de falsos positivos.

Selección de Genes Diferencialmente Expresados:

Con el análisis de DESeq2, se obtuvieron listas de genes diferencialmente expresados entre los grupos de pacientes con alta y baja expresión del gen de interés. Se aplicaron criterios de significación estadística (por ejemplo, p-valor ajustado), el índice de falsos descubrimientos (FDR) y de fold change para identificar los genes más relevantes.

En la fase de análisis de expresión diferencial mediante DESeq2, se configuró un entorno reproducible en R, especificando las versiones de paquetes y software empleados. Se cargaron los datos preprocesados, asegurando la correcta formación de la matriz de conteos de genes. Utilizando DESeq2, se aplicó un modelo basado en la distribución de Poisson negativa para identificar genes cuya expresión variaba significativamente entre grupos de alta y baja expresión de los genes ID1 e ID3. Durante este proceso, se calcularon valores de \log_2 fold change para evaluar la magnitud de los cambios de expresión. Los resultados se ajustaron mediante el método de Benjamini-Hochberg para controlar el FDR, con un punto de corte estándar de 0.05 para los valores de p ajustados. Se estableció un umbral de \log_2 FC absoluto mayor a 1.5 como criterio para definir la significancia biológica de los cambios en la expresión génica. La elección de estos valores de corte se respaldó

por su amplia aceptación en la literatura y su capacidad para identificar de manera confiable genes diferencialmente expresados.

Visualización de Resultados:

Se generaron gráficos como el gráfico de volcano y el gráfico de calor para visualizar los resultados del análisis de expresión diferencial. Estos gráficos permiten identificar los genes con las mayores diferencias de expresión y explorar patrones de agrupación en los datos.

4.2.4 Definición de variables

Variable	Definición operativa	Tipo de variable	Categorías de la variable
Edad	Diferencia entre la fecha de nacimiento y la fecha de ingreso al estudio	Variable independiente, nominal, discreta.	
Sexo	Sexo expresado por el paciente y registrado en la historia clínica	Variable independiente, nominal dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> • Femenino • Masculino
Infiltración de células leucémicas	Número de LC en BM en el momento del diagnóstico	Variable independiente, nominal, continua	
Recaída	Reaparición de LC	Variable independiente, nominal, dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> • Sí • No
Expresión de <i>ID1</i>	Expresión relative de ID1 en RT-qPCR	Variable independiente, nominal, dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> • Sobreexpresión de ID1 • -Expresión basal ID1
Expresión de <i>ID3</i>	Expresión relative de ID3 en RT-qPCR	Variable independiente, nominal, dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> • Sobreexpresión de ID3 • -Expresión basal ID3
Remisión completa	Desaparación de todos los dignos del cancer en respuesta al tratamiento	Variable independiente, nominal, dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> • Sí • No

Enfermedad mínima residual	Presencia de un número muy pequeño de LC (>0.01 % de células) que permanecen durante el tratamiento o después de este.	Variable independiente, nominal, dicotómica	<ul style="list-style-type: none"> • Positiva • Negativa
Supervivencia global	Tiempo que pasa desde la fecha del diagnóstico o el comienzo del tratamiento durante el cual los pacientes siguen vivos	Variable independiente, nominal, discreta.	
Supervivencia libre de enfermedad	El tiempo que se medido después del tratamiento durante el que no se detecta ningún signo de BCP-ALL	Variable independiente, nominal, discreta	
Número de células T	Número de células positivas para CD3+	Variable independiente, nominal, continua.	
Número de células T CD4+	Número de células positivas para CD4+	Variable independiente, nominal, continua.	
Número de células T CD8+	Número de células positivas para CD8+	Variable independiente, nominal, continua.	
Número de células MDSC	Número de células positivas para CD11b+, CD33+ y HLA-DR-	Variable independiente, nominal, continua.	
Número de células Macrófagos M1	Número de células positivas para CD68+	Variable independiente, nominal, continua.	
Número de células Macrófagos M2	Número de células positivas para CD68+ y CD163+	Variable independiente, nominal, continua.	

Tabla 5: Variables del estudio.

5. Resultados

5.1 Caracterización de la población de estudio

Para este estudio, se seleccionaron 13 muestras de BM, de las cuales el 76,9% (n=10) correspondieron a pacientes con BCP-ALL, y el 7,7% (n=1) representó a un individuo sano designado como control. Se excluyeron dos pacientes con sospecha de BCP-ALL debido a su diagnóstico concurrente con HIV, lo que constituyó el 15,3% de los casos iniciales. En la tabla 6, se proporcionan detalles exhaustivos sobre las características demográficas y clínicas de la población de estudio. Dentro de los sujetos incluidos, el 80% (n=8) eran de sexo masculino, mientras que el único individuo en el grupo de control era masculino, constituyendo el 100%. En relación con la edad al momento del diagnóstico de BCP-ALL, se observó un rango de 20 a 75 años, con una mediana de 26,5 años y un rango intercuartílico (IQR) de 21,1 (**Tabla 6**). A cada uno de los pacientes se les confirmó el diagnóstico de BCP-ALL por medio de citometría de flujo y recibieron ChT. Dentro de los valores reportados en el cuadro hemático de diagnóstico, el rango de leucocitos varió entre 1.390 y 168.100 (mediana=5.990, IQR=21.892,5), se observó un conteo de plaquetas entre 2.000 y 189.000 (mediana = 18.500 IQR= 37.500) y niveles hemoglobina entre 5.2 y 12.2 (mediana = 9.4 IQR=1.825). De los 10 pacientes, se encontró que 7 lograron la CR posterior a la fase de inducción de la ChT, estos pacientes lograron MRD negativa durante los primero 4 meses posteriores al inicio del tratamiento de ChT. Dos pacientes no respondieron al tratamiento de inducción y presentaron MRD positiva. Un paciente falleció antes de que fuera posible evaluar la CR y la MRD. El 90% de los pacientes presentó recaída, el 10% presentó DFS y otro 10% presentó enfermedad refractaria después de 18

meses de seguimiento, periodo durante el cual el 50% de los pacientes falleció debido a la progresión de la enfermedad.

Variable	Mediana (rango)	n(%)
n=10		
<i>Sexo</i>		
Femenino		2 (20)
Masculino		8(80)
Leucocitos (Diagnóstico)	5.990 (1.390-168.100)	
Neutrófilos	9.010(30-6.720)	
Plaquetas	18.500 (2.000-189.000)	
Hemoglobina	9.4 (5.2-12.2)	
<i>Remisión completa</i>		
Si		7(70)
No		2(20)
No evaluable		1(10)
<i>Enfermedad mínima residual</i>		
Positiva		2(20)
Negativa		7(70)
No evaluable		1(10)
<i>Supervivencia libre de enfermedad</i>		
Si		1(10)
No		8(80)
No evaluable		1(10)
<i>Supervivencia global</i>		
Muerto		5(50)
Vivo		5(50)

Tabla 6: Características de la población de estudio.

5.2 Evaluación de la expresión de ID1 e ID3 en células leucémicas en pacientes con BCP-ALL

Con el fin de definir la sobreexpresión del gen ID1 e ID3, inicialmente se definió el punto de corte para cada gen basados en la metodología del estudio previo, el cual fue determinado por el valor superior al percentil 75 del fold change $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, el cual correspondió un valor de 15.31 para ID1 y de 5.6 para ID3. De las 10 muestras analizadas para la detección de ID1, tres no presentaron amplificación del gen. Los valores de la expresión del ID1 e ID3 de las muestras analizadas se muestran en las (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. y **Tabla 7**). Comparado con la expresión del control se observó un aumento en la expresión de gen ID1 en 2 de 7 casos analizados con un valor promedio de expresión de 26.360. No obstante, al comparar ambos grupos no se encontraron diferencias significativas ($p=0.1049$) (**Figura 7a**), mientras que, una sobreexpresión del gen ID3 fue observada en 4/10 casos analizados (con un nivel de expresión promedio de 32.623 y al comparar ambos grupos se encontraron diferencias significativas ($p= 0.0242$) (**Figura 7b**). Ningún paciente sobreexpresó los dos genes al mismo tiempo. De los 10 casos que sobreexpresaron ID3 dos fallecieron por progresión de la enfermedad.

Paciente	ID1 Ct Mean	GAPDH Ct Mean	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
Control	30.792	20.986	9.806		
OJO001	33.411	20.878	12.533	2.727	0.151
JCP002		36.094			
SAC003		35.897			
B-R004	34.216	25.612	8.604	-1.202	2.301
D-G005	33.220	28.028	5.192	-4.614	24.484
FUM006	31.839	21.046	10.793	0.987	0.504
MSR007		39.405			DOS
MKH008	29.762	27.381	2.381	-7.425	171.847
AMM009	31.585	24.615	6.969	-2.837	7.144
D-B010	33.652	26.198	7.454	-2.352	5.105

Paciente	ID3 Ct Mean	GAPDH Ct Mean	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
Control	27.099	20.986	6.113		
OJO001	28.017	20.878	7.139	1.026	0.491
JCP002	37.825	36.094	1.731	-4.382	20.844
SAC003	39.264	35.897	3.366	-2.747	6.711
B-R004	31.796	25.612	6.184	0.071	0.952
D-G005	33.232	28.028	5.204	-0.909	1.877
FUM006	26.921	21.046	5.875	-0.238	1.180
MSR007	37.359	39.405	-2.046	-8.159	285.785
MKH008	31.411	27.381	4.030	-2.083	4.236
AMM009	31.678	24.615	7.062	0.949	0.518
D-B010	29.825	26.198	3.627	-2.486	5.603

Tabla 7: Expresión de *ID3* en muestras evaluadas.

En la columna correspondiente al fold change ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$) en negrilla se encuentran los pacientes con sobreexpresión de *ID3*.

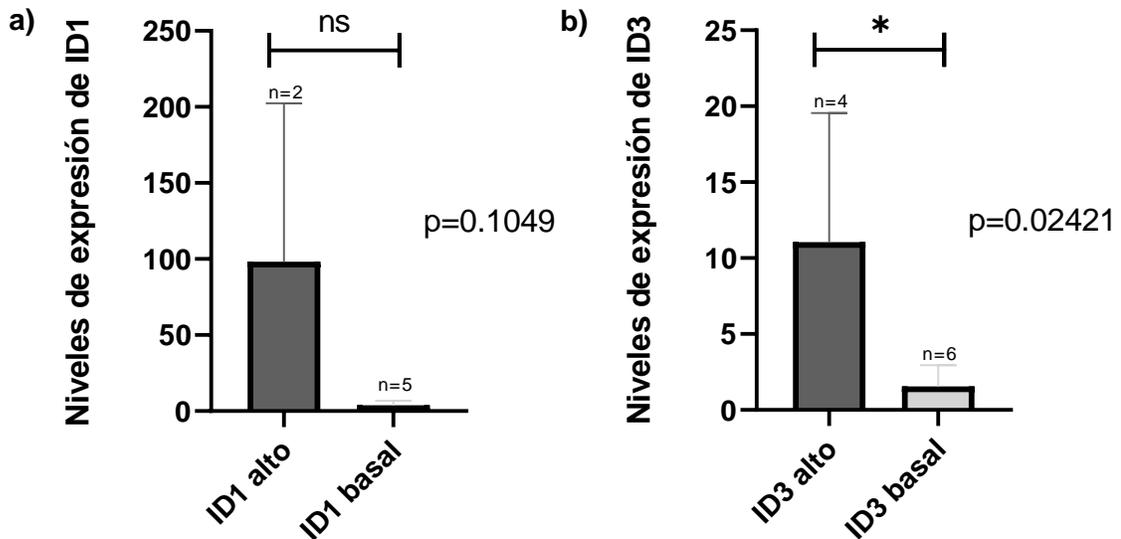


Figura 7: Clasificación de los pacientes según niveles de expresión de *ID1* e *ID3*

Comparación de los niveles de expresión de los pacientes que sobreexpresaron vs aquellos que tuvieron una expresión basal. **a)** Prueba t pareada entre dos pacientes que sobreexpresaron vs 5 con expresión basal de *ID1*. **b)** Prueba t pareada entre 4 pacientes que sobreexpresaron vs 6 con expresión basal de *ID3*. (* $p < 0.05$).

5.3 Evaluación de las poblaciones inmunes en el microambiente tumoral (TIME) según la expresión de ID1 e ID3

Para determinar la relación de la expresión de ID1 e ID3 y el TIME, inicialmente se caracterizaron las poblaciones del TIME (linfocitos T totales, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T ayudadores, linfocitos T reguladores, Macrófagos tipo M1 y M2, Células NK y MDSC de la BM por citometría de flujo. En la (**Figura 8**), se presentan las estrategias definidas para los "gates" o "puertas", utilizados para identificar y analizar las subpoblaciones celulares según sus propiedades, como tamaño, forma o expresión de marcadores celulares.

En la (**Tabla 8**) se presenta la frecuencia de las poblaciones analizadas de 9 de los 10 casos incluidos. Como era de esperarse en la gran mayoría presento una infiltración de células B inmaduras, con un rango de frecuencia de 22.27% a 96.8%. Esto limita el estudio de las otras poblaciones. No obstante, en la tabla 9 se detalla el porcentaje encontrado de cada población y los niveles de expresión de ID1 o ID3. Para determinar la diferencia entre las poblaciones celulares del TIME según la expresión de ID1 e ID3, se llevaron a cabo incrustaciones de vecinos estocásticos distribuidos en t (t-SNE) con el fin de reducir la dimensionalidad y lograr una mejor visualización. Se observó que las poblaciones negativas para CD3 (azules) (**Figura 9 a,d y g**) cambiaban según la expresión de ID1 o ID3. No hubo cambios en las poblaciones positivas para CD4 (**Figura 9 b, e y h**) ni en las poblaciones positivas para CD8 (**Figura 9 c, f y l**). En la (**Figura 10a**) se observa que en los pacientes con mayor expresión de ID1 no hubo diferencias significativas entre las células evaluadas. Sin embargo, al comparar ambos grupos (ID1 basa vs ID1 alto) mediante una prueba de Wilcoxon hubo una diferencia significativa con un valor $p:0.0083$. No obstante, se observó que en los neutrófilos hubo tendencia al aumento en el grupo de ID1 alto. Al comparar el porcentaje de células según la expresión de ID3 se obtuvieron resultados similares, pero al comparar los grupos según la expresión de ID3 hubo una diferencia significativa con valor $p:0.0292$ (**Figura 10b**).

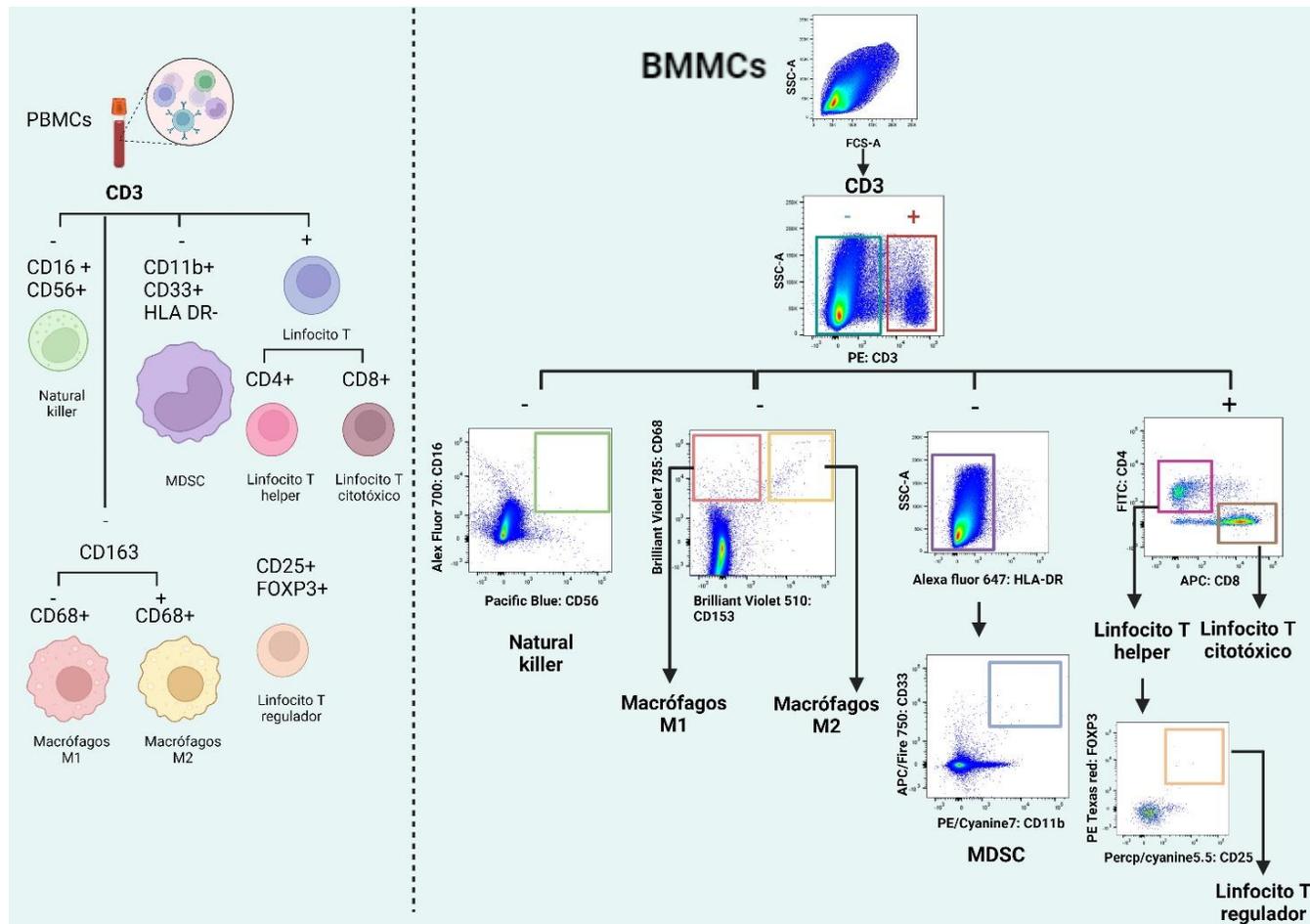


Figura 8: Estrategia de gating

Las poblaciones inmunes se identificaron a través de la dispersión lateral (SSC-A) y la dispersión frontal (FSC-A). Para discernir los linfocitos T, se utilizaron los marcadores CD3+, dividiendo luego las poblaciones citotóxicas y de ayudadores mediante los marcadores CD4 y CD8. En cuanto a los linfocitos T reguladores, se emplearon los marcadores CD25 y FOXP3, junto con la expresión de CD3 y CD4. Las células que resultaron negativas para CD3, pero con expresión de CD56 y CD16, fueron clasificadas como células NK. Para la identificación de macrófagos, se utilizaron los marcadores CD68y específicamente para los de tipo M2, se utilizó CD163. Por último, las MDSC se definieron como aquellas que eran negativas para HLA-DR y positivas para CD33 y CD11b.

Paciente	Niveles de ID1/ID3	Población linfoide B		Población linfoide T madura CD45						Otras poblaciones								
		Linfocitos B inmaduros CD45 débil	Linfocitos B maduros CD45	Linfocitos T totales	Linfocitos T CD4+	Linfocitos T CD8+	Linfocitos T CD4+, CD8+	Linfocitos T CD4-, CD8-	Linfocitos T reguladores	Neutrófilos	Monocitos	Línea eritroide	Natural killer	Eosinófilos	Plasmocitos	MDSC	M1	M2
D-G005	↑ ID1	50.6	1.5	15.2	7.16	6.84	0.3	0.9	0%	23	0.9	3.1	1.7	2.8	0%	0%	0.3	0%
MKH008	↑ ID1	23.7	1.7	15.4	7	7.7	0.3	0.4	0%	38.2	0.7	17.7	1.5	0.9	0.05	0%	0.4	0%
JCP002	↑ ID3	85.00	3.5	7.8	3.5	3.6	0.3	0.4	0%	2..	0	0.3	1.1	0.3	0%	0%	0%	0%
SAC003	↑ ID3	75.9	1.52	19.26	15.56	2.9	0.4	0.4	0%	0.03	0.14	2.36	0.79	0	0%	0%	0%	0%
MSR007	↑ ID3	92.8	0.5	3.6	1.62	1.4	0.18	0.4	0%	1	0.2	0.7	0.7	0%	0%	0%	0%	0%
D-B010	↑ ID3	22.27	3.78	37.57	19.16	17.36	0.75	0.3	0%	25.41	0.58	5.25	3.97	0.86	0.31	0%	0%	0%
B-R004	Basal	50	1.64	21.16	3.2	17.16	0.2	0.6	CD4+ 0.06 CD8+ 0.084	15.9	0.46	8.75	1.57	0.45	0.07	0%	0%	0%
FUM006	Basal	96.4	0.4	1	0.35	0.4	0.1	0.07	0%	1.2	0.3	0.2	0.5	0%	0%	0%	0%	0%
AMM009	Basal	44.28	1.55	16.54	8.4	7.04	0.6	0.5	0%	16.29	0.34	17.75	2.65	0.21	0.01	0%	0%	0%

Tabla 8: Porcentajes de células del TIME evaluadas mediante citometría de flujo.

En las columnas se pueden observar: los pacientes, los niveles de expresión de ID1 e ID3 y el porcentaje de células evaluadas mediante citometria de flujo según su linaje. En las filas se pueden ver los valores correspondientes a cada paciente.

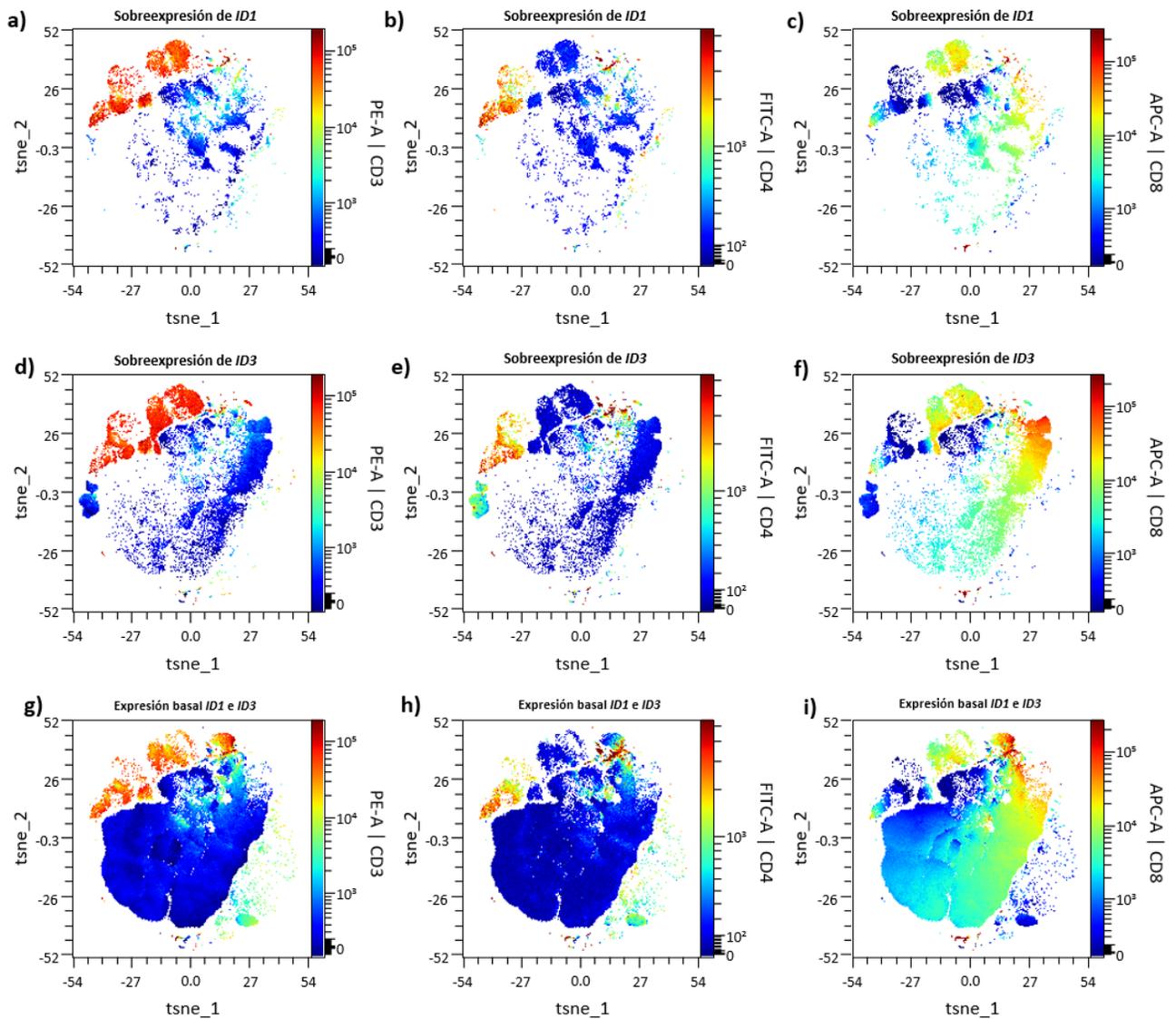


Figura 9: Citometría de flujo representativa de la BM.

a) visualización mediante t-SNE de poblaciones positivas para CD3 (rojo y amarillo) de paciente que sobreexpresa ID1. **b)** poblaciones positivas para CD4 de paciente que sobreexpresa ID1. **c)** poblaciones positivas para CD8 de paciente que sobreexpresa ID1. **d)** poblaciones positivas para CD3 de paciente que sobreexpresa ID3. **e)** poblaciones positivas para CD4 de paciente que sobreexpresa ID3. **f)** poblaciones positivas para CD8 de paciente que tuvo expresión basal de ID3. **g)** poblaciones positivas para CD3 de paciente que tuvo expresión basal de ID1 e ID3. **h)** poblaciones positivas para CD4 de paciente que tuvo expresión basal de ID1 e ID3. **i)** poblaciones positivas para CD8 de paciente que tuvo expresión basal de ID1 e ID3.

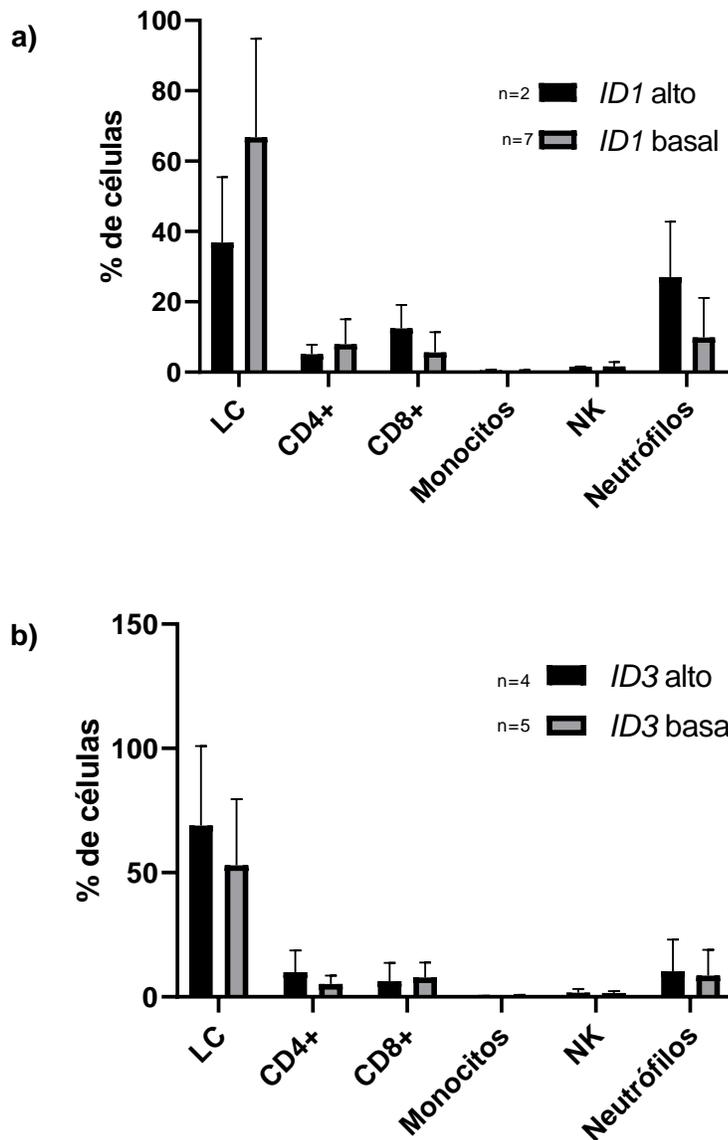


Figura 10: Diferencias entre poblaciones inmunes según expresión de ID1 e ID3. **a)** Diferencias entre los porcentajes de LC, linfocito T CD4, CD8, monocitos, NK y neutrófilos según expresión de ID1. **b)** Diferencias según expresión de ID3. Test de Mann-Whitney.

Con el fin de complementar los datos encontrados por citometría, se llevó a cabo la secuenciación de las BM con mejor calidad de RNA (n=6) mediante RNA-seq. Posteriormente, se analizaron las poblaciones inmunes del TIME. Para la estimación de estas poblaciones a partir de los datos expresión génica se utilizó CIBERSORT, los análisis se realizaron basados en la expresión alta o baja de ID1 e ID3. En las dos muestras que sobreexpresaron ID1 e ID3 (MKH008 y D-B010), demarcadas por un cuadro rojo (

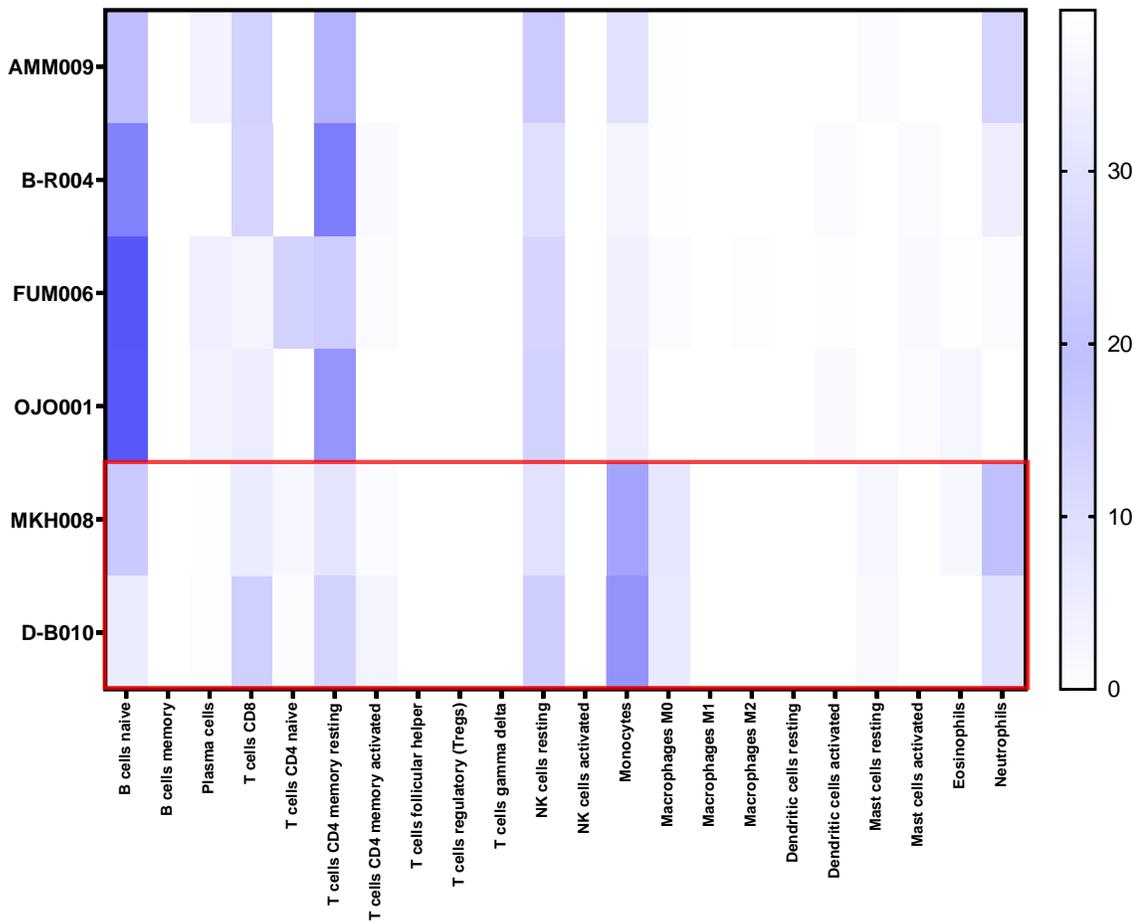


Figura 11), se puede observar que hay diferencias en las poblaciones de monocitos, macrófagos M0 y neutrófilos. Posteriormente, con el fin de profundizar estos resultados, se empleó la herramienta xCell, que permite inferir 64 poblaciones inmunes presentes en la BM. Adicionalmente, esta herramienta brinda resultados como el MicroenvironmentScore e InmunoScore. Este análisis permitió confirmar las diferencias encontradas en las poblaciones de monocitos y neutrófilos encontradas por CIBERSORT (**Figura 12**). Para determinar la significancia estadística de los datos obtenidos, visibles en el mapa de calor, se evaluó el supuesto de normalidad y se utilizaron pruebas de no paramétricas (**Figura 13**). Se observaron diferencias estadísticamente diferentes en las poblaciones de los basófilos ($p= 0.0148$), linfocitos T inexperto (0.0249), eosinófilos ($p=0.0192$), monocitos ($p=<0.0001$) y neutrófilos ($p=0.0008$). Interesantemente, tanto el InmunoScore como el MicroenvironmentScore muestran diferencias estadísticas con valores de p de 0.0017 y 0.0016 respectivamente. Estos resultados sugieren que la expresión de ID1 e ID3 podría estar asociada con diferencias en la composición del TIME

entre los dos pacientes con alta expresión de ID1 e ID3 vs los demás pacientes, especialmente en las poblaciones de monocitos y neutrófilos.

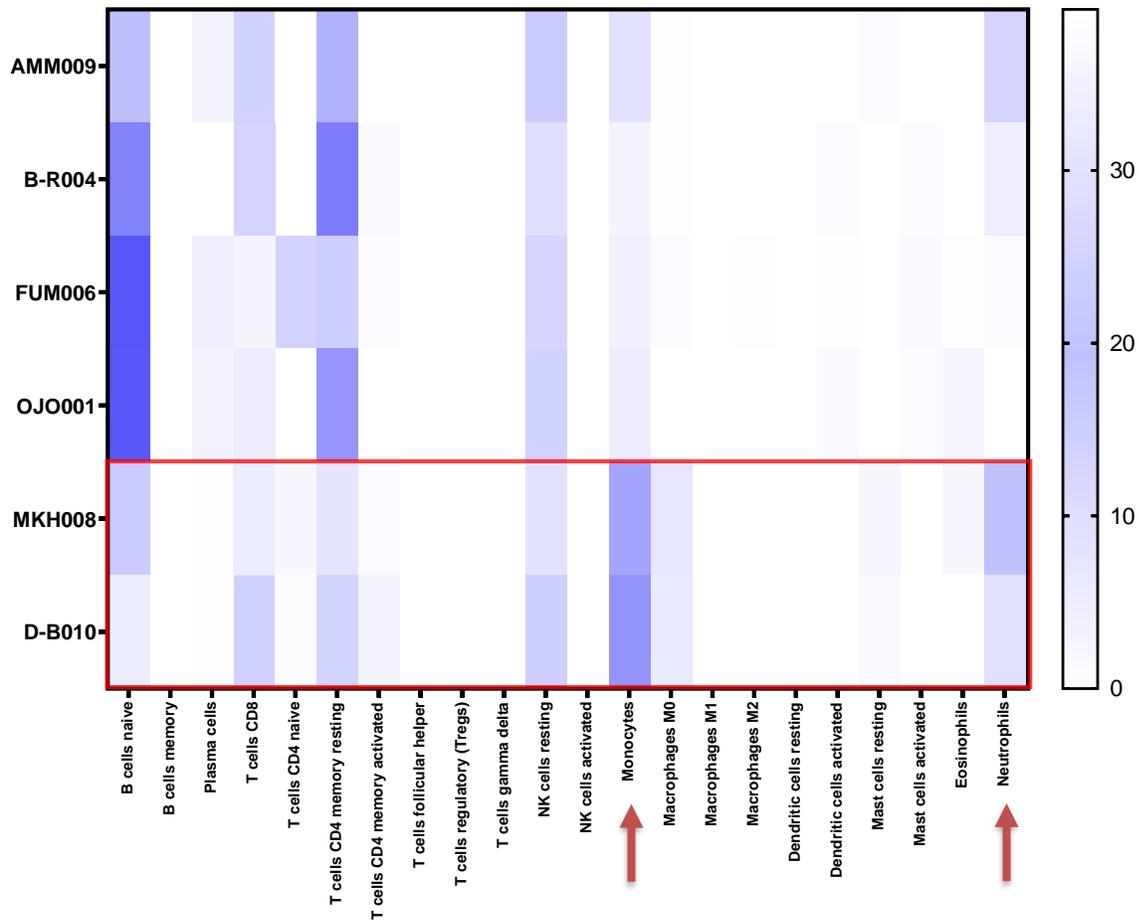


Figura 11:CIBERSORT.

Comparación mediante citometría digital entre pacientes que sobreexpresaron ID1 o ID3 versus pacientes con expresión basal de ID1 e ID3. En el eje y se muestran los pacientes, mientras que en el eje x se muestran las poblaciones celulares. En el recuadro rojo se resaltan los pacientes que sobreexpresaron ID1 o ID3. Las flechas rojas señalan las poblaciones en las que se observaron diferencias.

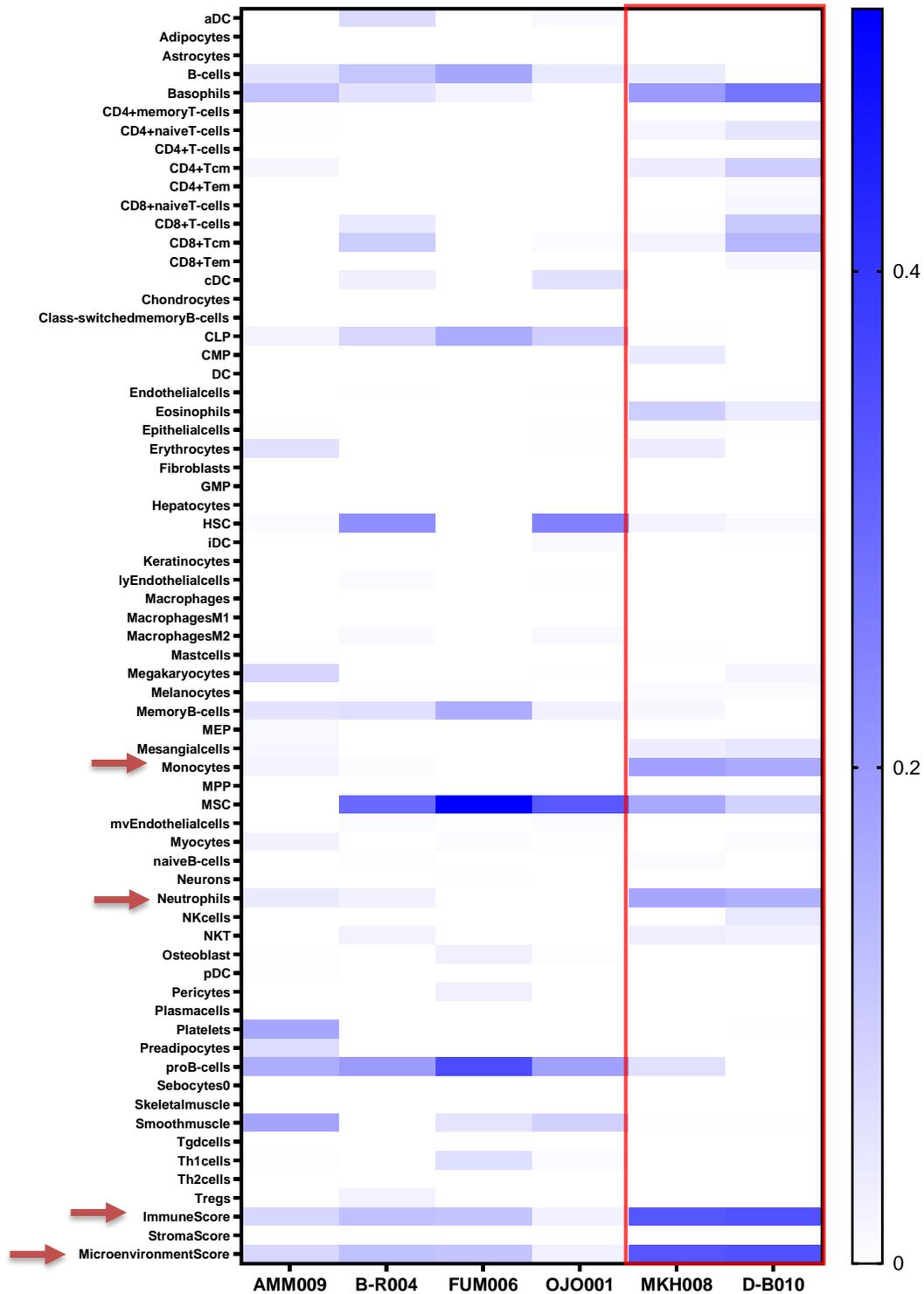


Figura 12: Comparación de poblaciones celulares inmunes entre pacientes que sobreexpresaron ID1 o ID3 versus pacientes con expresión basal de ID1 e ID3. En el eje x se muestran los pacientes, mientras que en el eje y se muestran las poblaciones celulares. El recuadro rojo identifica a los pacientes que sobreexpresaron ID1 o ID3. Las flechas rojas señalan las poblaciones en las que se observaron diferencias.

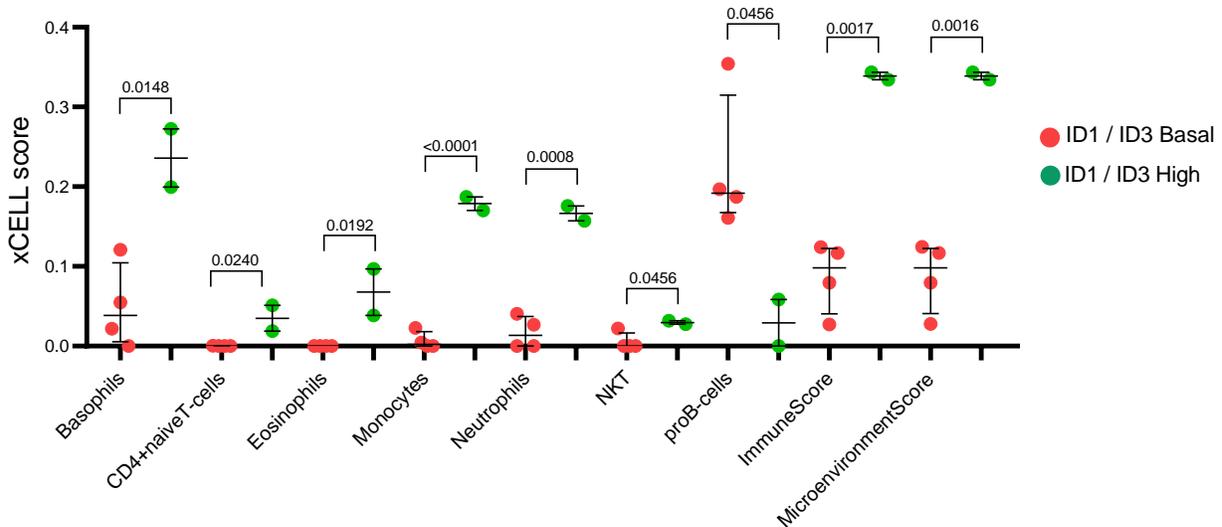


Figura 13: Estimación de la infiltración de las poblaciones inmunes utilizando el método de deconvolución xCell según la expresión de ID1 e ID3. Poblaciones que mostraron significancia mediante pruebas t no paramétricas evaluadas en xCell.

5.4 La expresión de ID1 e ID3 induce el aumento en las vías de degranulación y activación de los neutrófilos

En consecuencia con los resultados obtenidos mediante las herramientas de CIBERSORT y xCell, se procedió a evaluar los principales genes diferencialmente expresados entre los dos grupos definidos según la expresión de ID1 e ID3. Se analizaron dos muestras para el grupo de sobreexpresión de ID1 e ID3 y cuatro muestras para el grupo de expresión basal de ID1 e ID3. Se identificaron un total de 96 genes expresados diferencialmente entre ambos grupos (p ajustado $<0,05$). En la **Figura 14**, se muestra que los pacientes con sobreexpresión de ID1 o ID3 (representados por la barra roja etiquetada como “overexpression”) exhiben un aumento en la expresión de genes asociados con la activación y degranulación de los neutrófilos. Para corroborar este hallazgo, se realizó un análisis de expresión diferencial comparando ambos grupos, como se ilustra en la **Figura 15** se observó un aumento significativo en la expresión de genes clave como *TCN1*, *HP* y *ORL1* en los pacientes con sobreexpresión de ID1 e ID3, los cuales están asociados a la degranulación y activación de los neutrófilos.

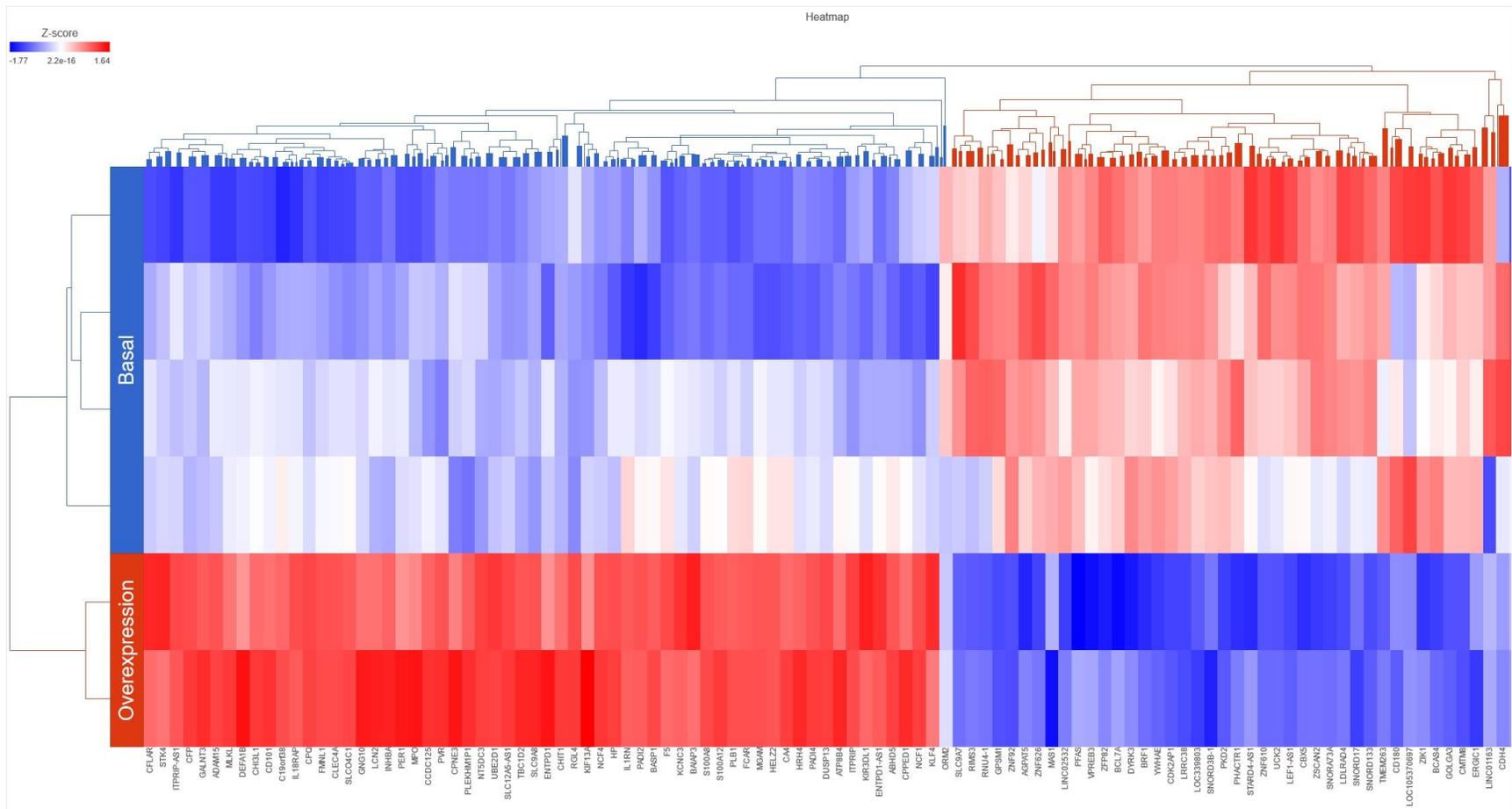


Figura 14: Genes diferencialmente expresados según niveles de expresión de ID1 e ID3. Mapa de calor del top de genes con mayores diferencias según la expresión de ID1 o ID3. En el eje y se encuentran los pacientes con sobreexpresión ID1 o ID3 (Overexpression = rojo) y expresión basal de ID1 e ID3 en azul, en el eje x se encuentran los genes diferencialmente expresados.

En consecuencia, a lo anterior, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de vías, donde se confirmó que la sobreexpresión de ID1 o ID3 está con un incremento en las vías de degranulación de los neutrófilos, la respuesta inmune involucrada en la activación de los neutrófilos y la inmunidad mediada por los neutrófilos (**Figura 16**). Posteriormente, se exploró el interactoma proteína a proteína mediante la herramienta STRING (**Figura 17a**) donde se seleccionaron 96 genes con expresión diferencial que cumplieran con el criterio de $FDR < 0.05$. y FC mayor a 1.5. En este análisis, se observó que una de las redes principales estaba asociada con procesos biológicos como la degranulación de los neutrófilos, la inmunidad mediada por leucocitos. En cuanto a los componentes celulares se destacaron los gránulos específicos y terciarios (**Figura 17b**). En conjunto, estos resultados sugieren que tanto la sobreexpresión de ID1 como ID3 por parte de las LC podría modular el TIME, siendo los neutrófilos las células más influenciadas por la expresión de estos genes.

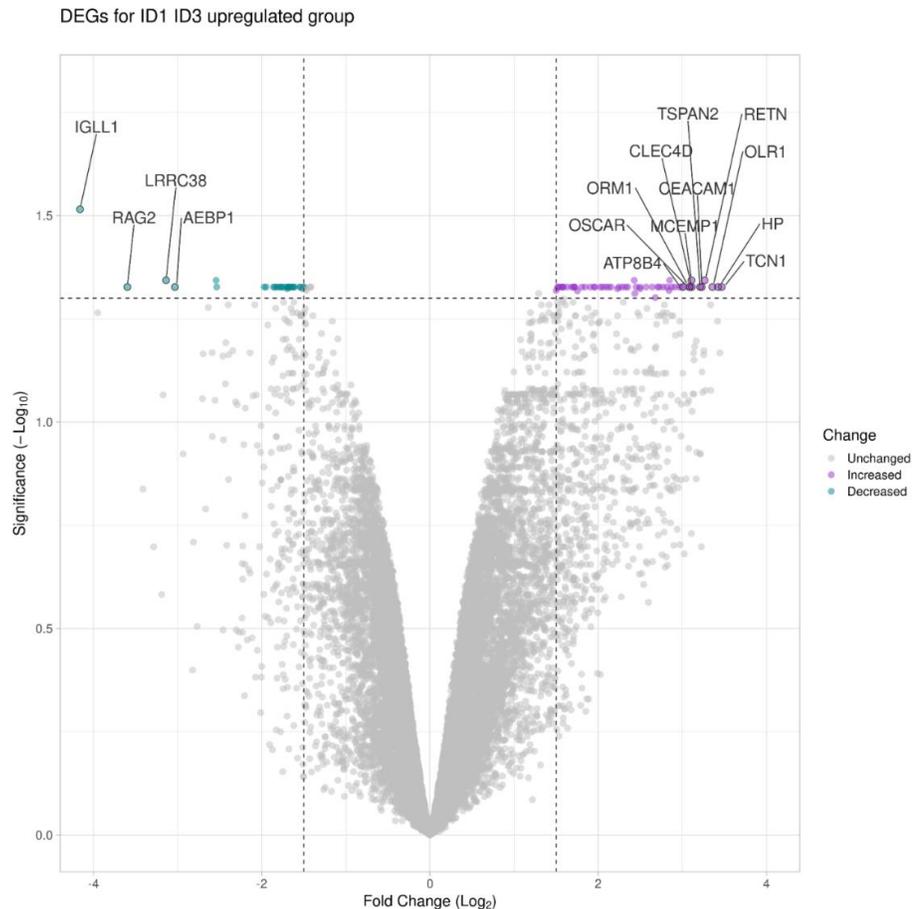


Figura 15: Genes diferencialmente expresados en pacientes con sobreexpresión de ID1 e ID3. Volcano plot de los genes diferencialmente expresados entre grupo con sobreexpresión de ID1 o ID3 versus grupo con expresión basal de ID1 o ID3. Eje y representa la significancia estadística, eje x logaritmo del fold change. Gris: genes sin cambio, verde: genes disminuidos y morado: genes aumentados.

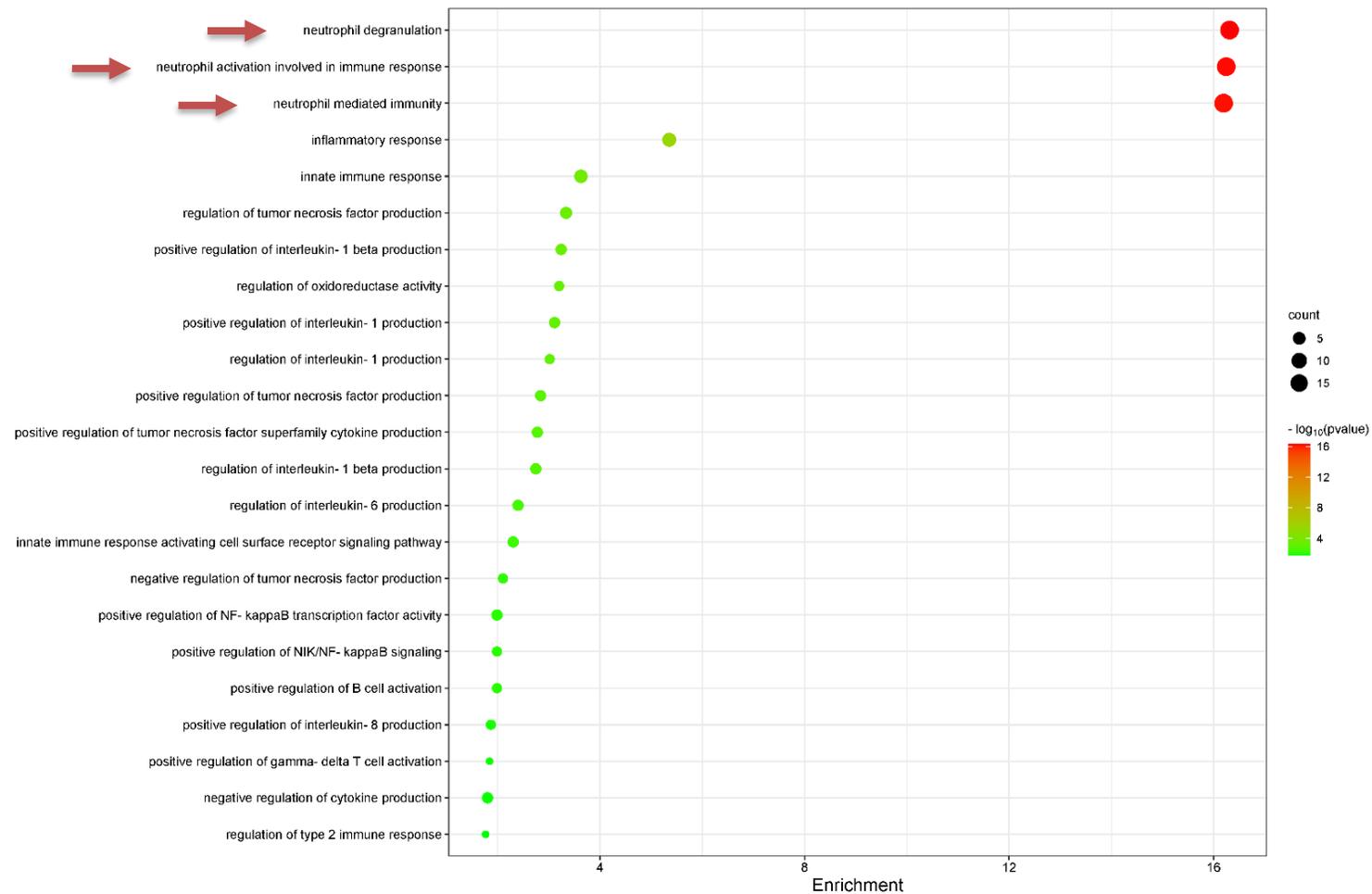
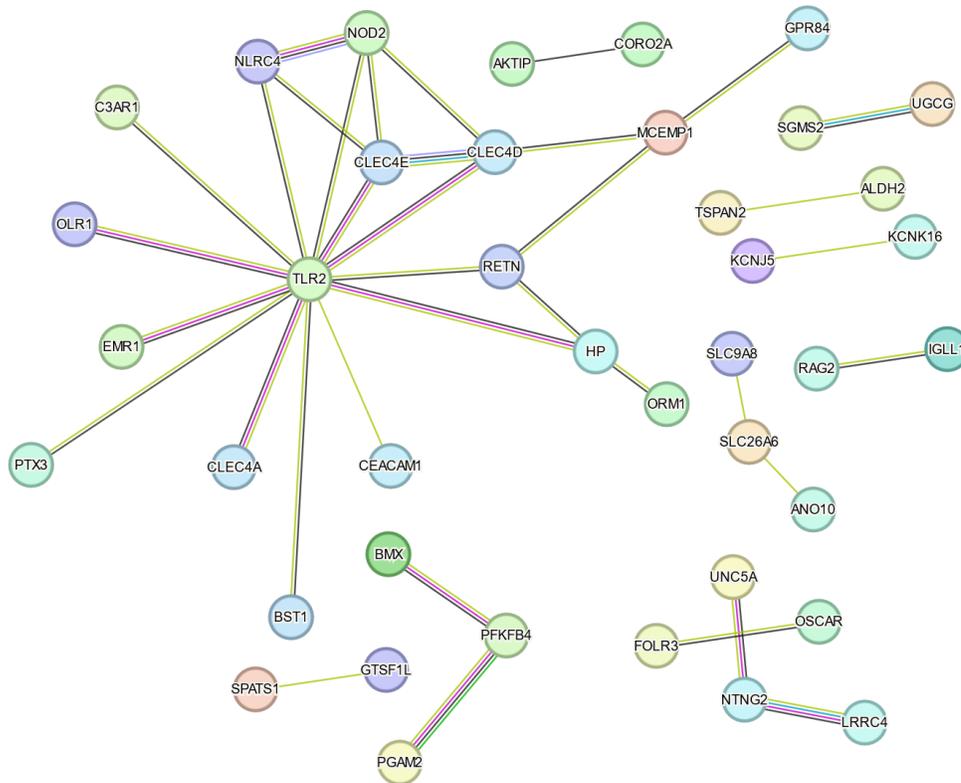


Figura 16: Análisis de enriquecimiento funcional mediante la ontología KEGG de vías.

El Dotplot ilustra el enriquecimiento funcional de las vías que presentaron un aumento en la expresión génica diferencial entre pacientes con niveles altos y bajos de ID1 o ID3, utilizando el conjunto de genes expresados diferencialmente. Este análisis se llevó a cabo utilizando la categoría de Biological Process de Gene Ontology (GO). Se muestran las vías que exhibieron un enriquecimiento significativo en el grupo con alta expresión de ID1 o ID3 ($p < 0.05$), destacando las asociaciones relevantes que sugieren la influencia funcional de ID1 e ID3 en las vías biológicas identificadas.

a)



b)

Functional enrichments in your network [explain columns](#)

Biological Process (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0016045	Detection of bacterium	3 of 16	1.67	0.0244
GO:0043312	Neutrophil degranulation	19 of 484	0.99	8.73e-10
GO:0071805	Potassium ion transmembrane transport	6 of 165	0.96	0.0253
GO:0002366	Leukocyte activation involved in immune response	20 of 626	0.9	8.73e-10
GO:0002443	Leukocyte mediated immunity	20 of 641	0.89	9.69e-10
(more ...)				
Cellular Component (Gene Ontology)				
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate
GO:0035580	Specific granule lumen	7 of 62	1.45	3.56e-06
GO:1904724	Tertiary granule lumen	6 of 55	1.44	2.84e-05
GO:0042581	Specific granule	15 of 159	1.37	4.02e-13
GO:0035579	Specific granule membrane	8 of 90	1.35	2.14e-06
GO:0070821	Tertiary granule membrane	6 of 73	1.31	0.00011

Figura 17: Análisis de Interacción Proteína-Proteína con la Herramienta STRING en el Grupo de Pacientes con Sobreexpresión de ID1 e ID3.

La figura presenta la visualización del análisis de interacción proteína-proteína mediante la herramienta STRING, utilizando el conjunto de 96 genes expresados de manera diferencial en el grupo de pacientes con sobreexpresión de los genes ID1 e ID3. Las interacciones se establecieron considerando la evidencia experimental disponible, proporcionando una visión detallada de las conexiones proteínicas relevantes en el contexto de la sobreexpresión de ID1 e ID3 en este grupo de pacientes.

5.5 Evaluación *in silico*: confirmación de datos obtenidos en bases de datos públicas

Con el propósito de validar los resultados obtenidos en la población de estudio, se llevó a cabo una exploración de diversas bases de datos públicas que contienen información de transcriptoma a través de RNA-seq. Los criterios de selección considerados incluyeron que los pacientes en la cohorte tuvieran diagnóstico de BCP-ALL, se incluyeron todas las alteraciones cromosómicas dentro del espectro del BCP-ALL, adicionalmente que la edad fuera igual o superior a 18 años. Se eligió la base de datos TARGET del tumor cancer genome atlas (TCGA) en la cual inicialmente se realizaron análisis de expresión con el gen ID1 y posteriormente con el gen ID3.

Para la expresión del gen ID1 se usó la mediana como punto de corte y se establecieron dos grupos de comparación equilibrados así: para ID1 alto se incluyeron 104 pacientes y para ID1 bajo se incluyeron 103 pacientes. Posteriormente, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías, confirmando que el aumento en la expresión de ID1 se correlaciona con un incremento en la respuesta inmune vinculada a la activación de los neutrófilos y la inmunidad mediada por neutrófilos también aumenta (**Figura 18a**). De manera interesante, al examinar las vías asociadas con la respuesta a cáncer, se observó un aumento en la vía de señalización de los puntos de control PD-1 y PD-L1 asociado con inhibición de la respuesta antitumoral. Adicionalmente, se identificó un aumento en la vía de la Interleucina 17 (IL-17) y la diferenciación de Th17 asociada al reclutamiento de neutrófilos (**Figura 18b**).

De manera similar, en el caso del análisis de la expresión del gen ID3, se utilizó la mediana como punto de corte para establecer dos grupos de comparación equilibrados. Para el grupo de ID3 alto se incluyeron 104 pacientes, mientras que para el grupo de ID3 bajo se incorporaron 103 pacientes. Una vez definidos estos grupos, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de vías, revelando un incremento significativo en la vía de la IL-17 cuando se presenta sobreexpresión de ID3 (**Figura 19**). Este hallazgo coincide con la observación realizada previamente en el caso de ID1. En conjunto, estos datos demuestran que tanto la expresión de ID1 como ID3 están asociados a la modulación de respuesta inmune a través de los neutrófilos y las vías asociadas a este tipo de células.

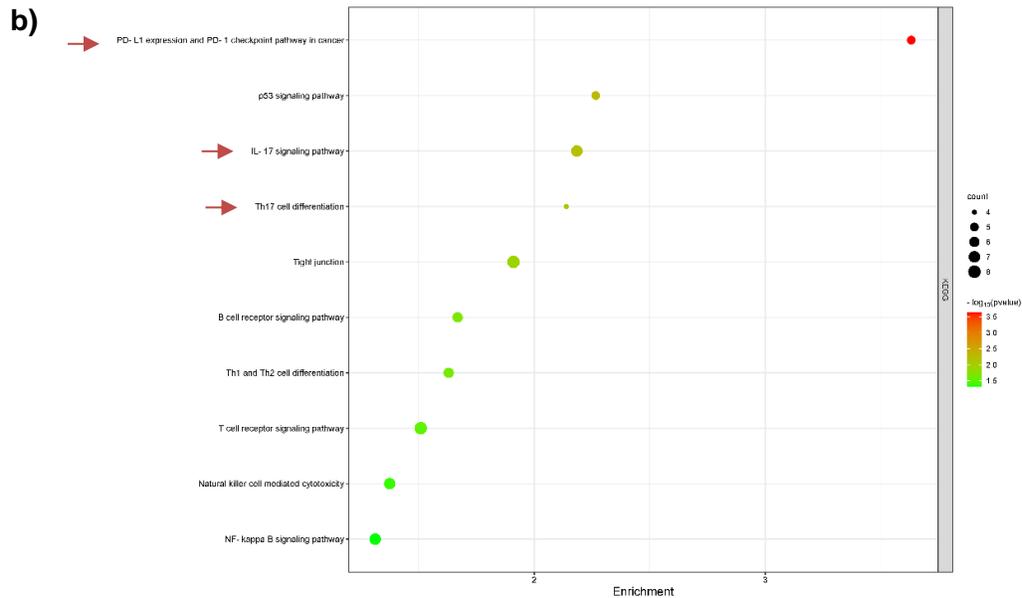
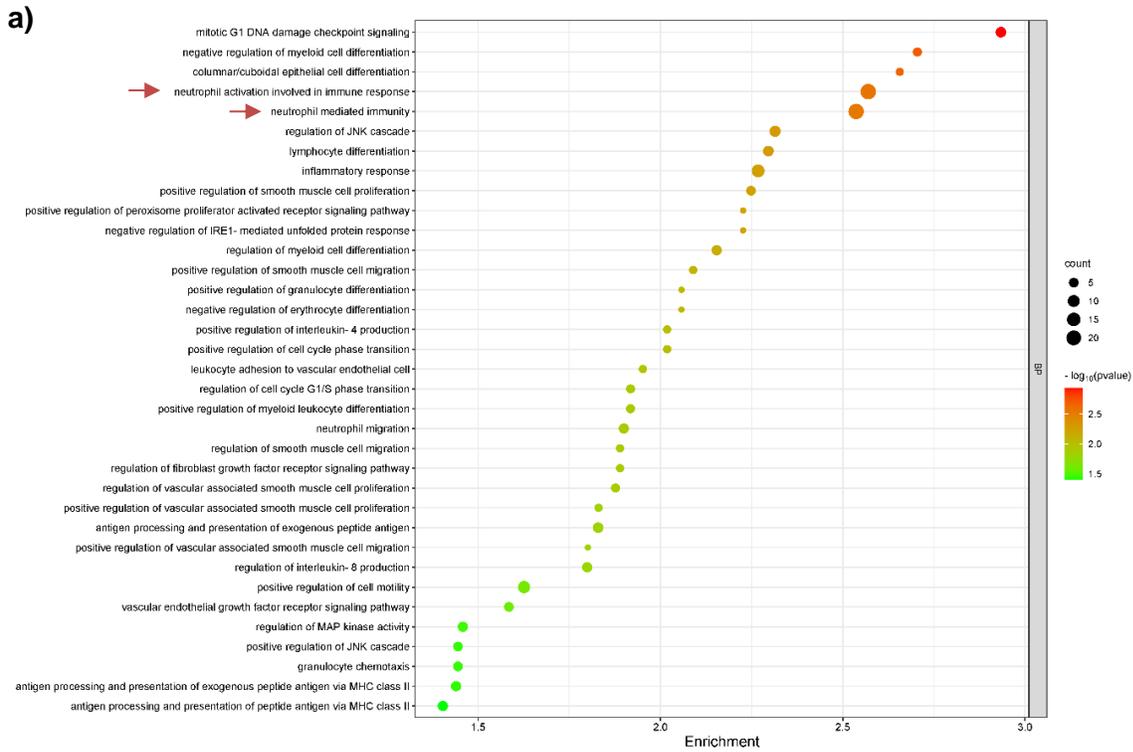


Figura 18: Análisis de Enriquecimiento Funcional de Vías KEGG en Pacientes con Alta Expresión de ID1.

a) Representación visual del análisis de enriquecimiento funcional realizado mediante la ontología KEGG. Se utilizó el conjunto de genes expresados diferencialmente obtenido al comparar pacientes con alta y baja expresión del gen ID1. **b)** vías asociadas con respuesta inmune a cáncer. Las vías significativamente enriquecidas en el grupo con alta expresión de ID1 ($p < 0.05$) se destacan en la imagen, revelando asociaciones relevantes que sugieren la influencia funcional de ID1 en las vías biológicas identificadas.

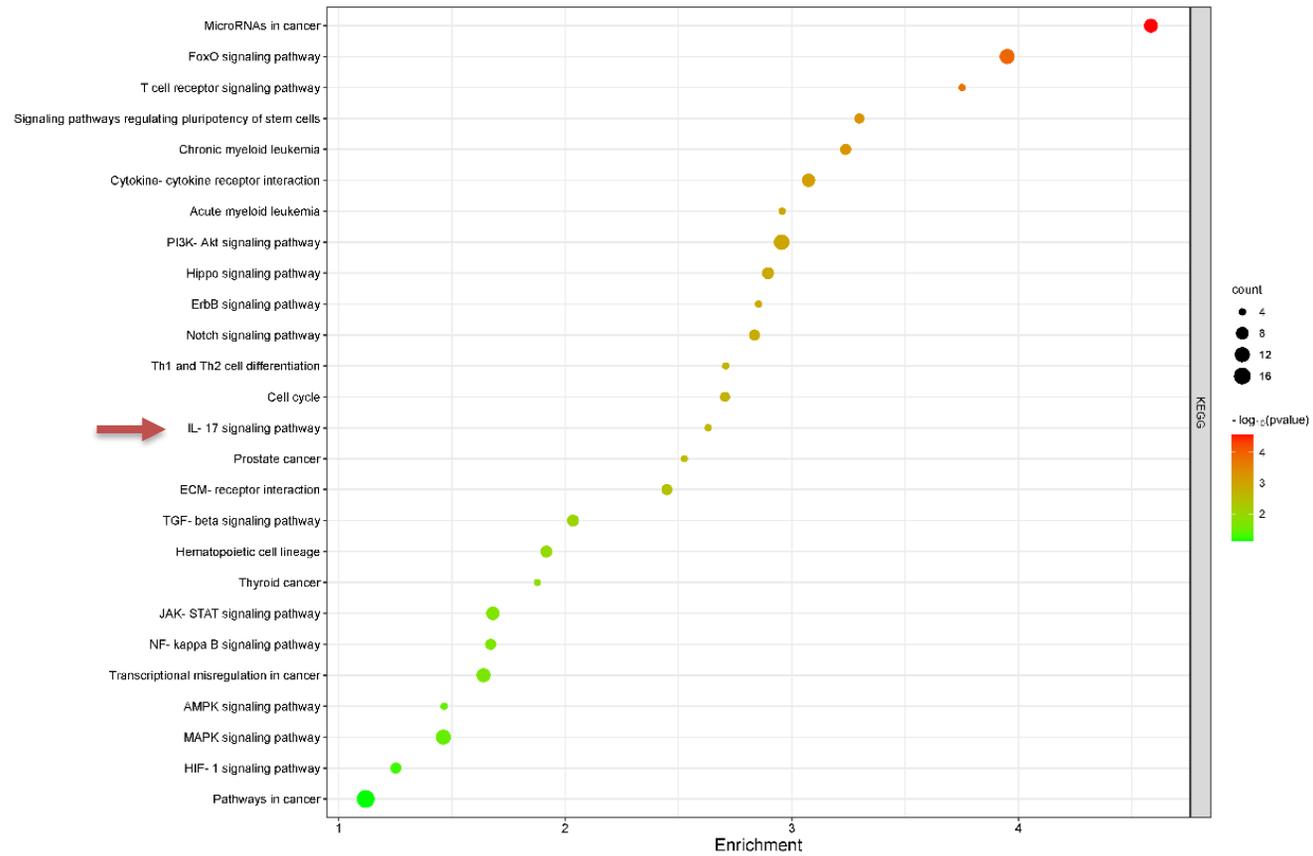


Figura 19: Análisis de Enriquecimiento Funcional de Vías KEGG en Pacientes con Alta Expresión de ID3. Representación visual del análisis de enriquecimiento funcional realizado mediante la ontología KEGG. Se utilizó el conjunto de genes expresados diferencialmente obtenido al comparar pacientes con alta y baja expresión del gen ID3.

Con la finalidad de evaluar una posible correlación entre las expresiones de ID1 e ID3, se llevaron a cabo análisis exhaustivos de los datos recopilados de la cohorte MILE, que abarcó un total de 2096 casos de leucemia. Sin embargo, se implementó un filtrado específico con el objetivo de obtener únicamente los resultados relacionados con BCP-ALL. Se observó una correlación positiva con un $R^2:0.347$, lo que sugiere que la expresión de ID1 y ID3 tiende a estar relacionada, indicando que cuando ID1 se expresa también lo hace ID3 (**Figura 20**). Interesantemente también se observó una correlación positiva entre la expresión de ID3 y PD-1 con un $R^2: 0.391$ (**Figura 21**).

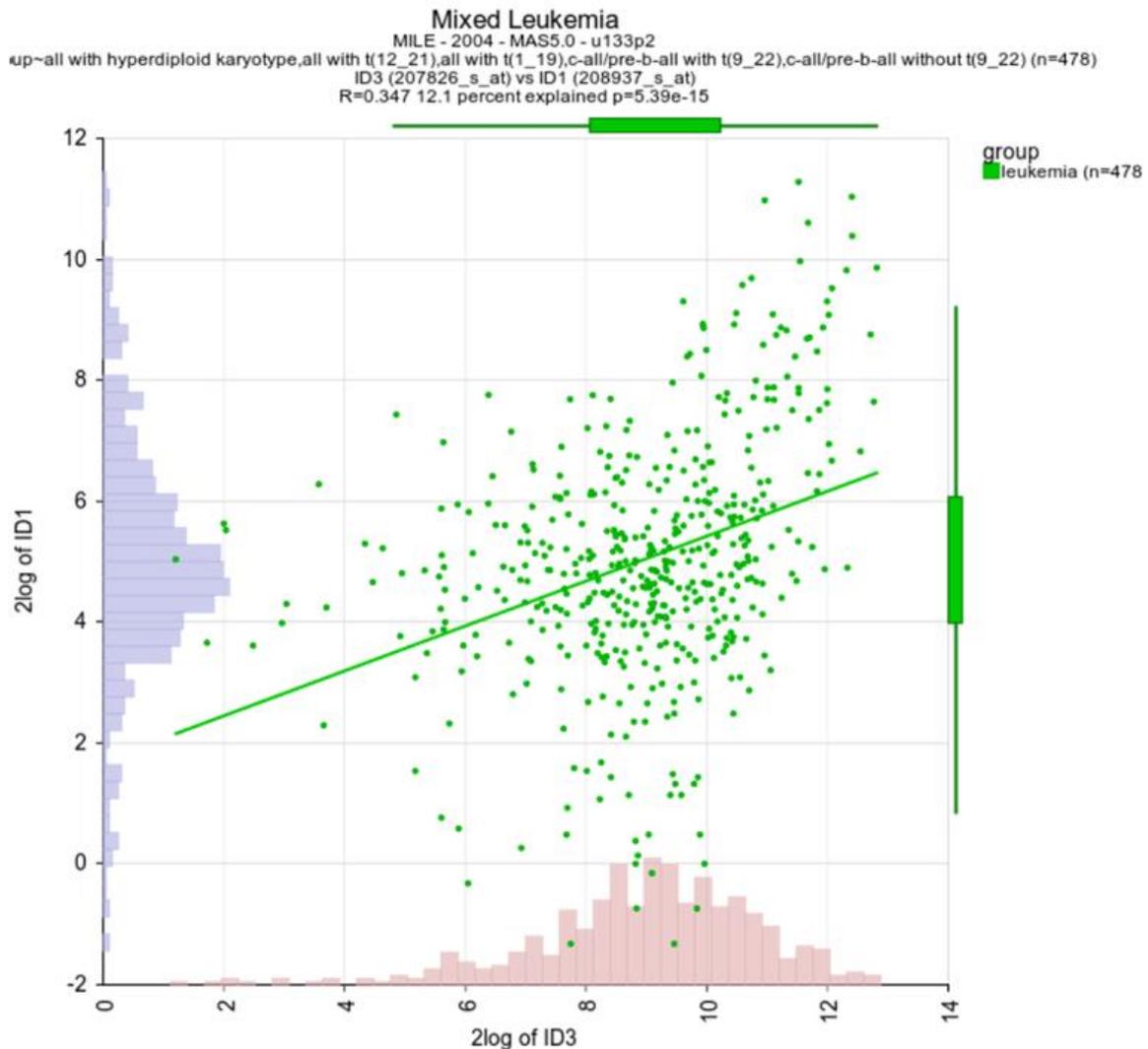


Figura 20: Correlación entre la expresión de ID1 e ID3. Correlación de Spearman entre los datos de expresión de los genes ID1 e ID3 en la cohorte de pacientes del estudio MILE se muestra una correlación positiva $R^2=0.347$

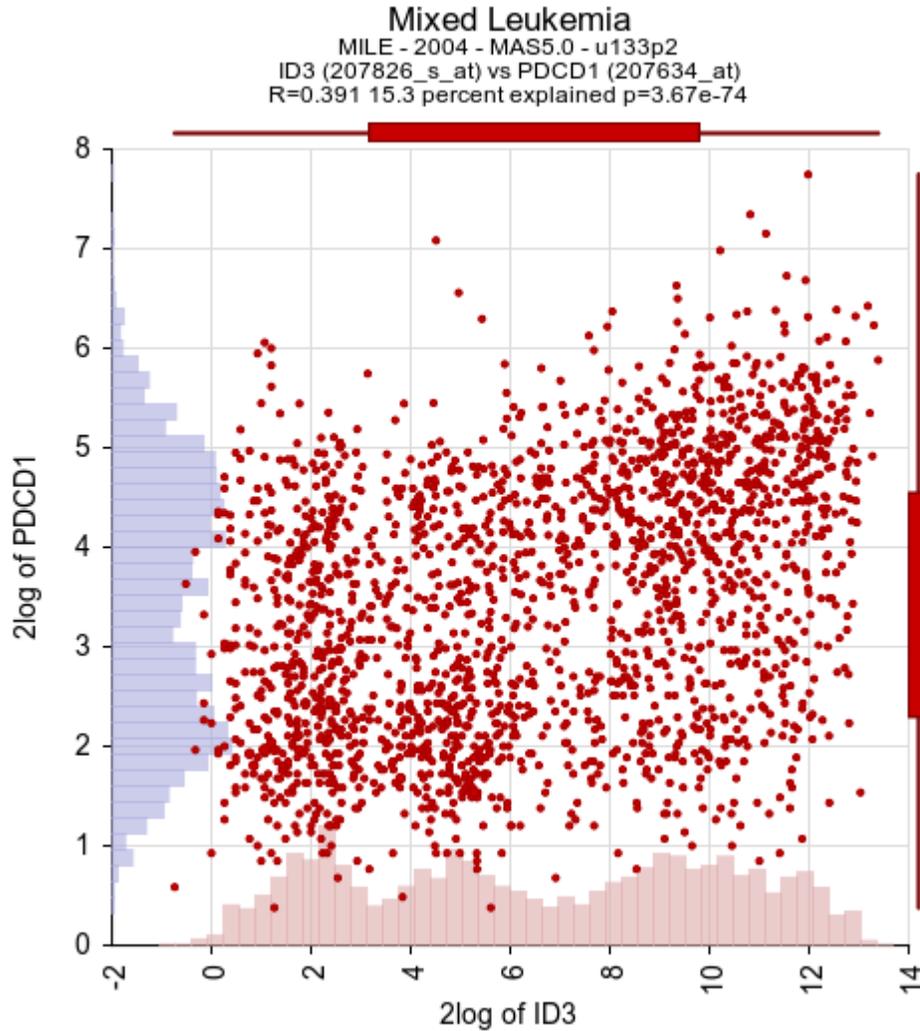


Figura 21: Correlación entre la expresión de PD-1 e ID3. Correlación de Spearman entre los datos de expresión de los genes PD-1 e ID3 en la cohorte de pacientes del estudio MILE se muestra una correlación positiva $R^2=0.391$.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de exploración del interactoma proteína a proteína mediante la herramienta STRING (**Figura 22a**), comparando pacientes diagnosticados con BCP-ALL con individuos sanos. Se seleccionaron 300 genes con expresión diferencial que cumplieran con el criterio de $FDR < 0.05$. Este análisis destacó una interacción central que involucraba la IL-17 (**Figura 22b**), estableciendo así una conexión coherente con los datos obtenidos en las muestras del estudio.

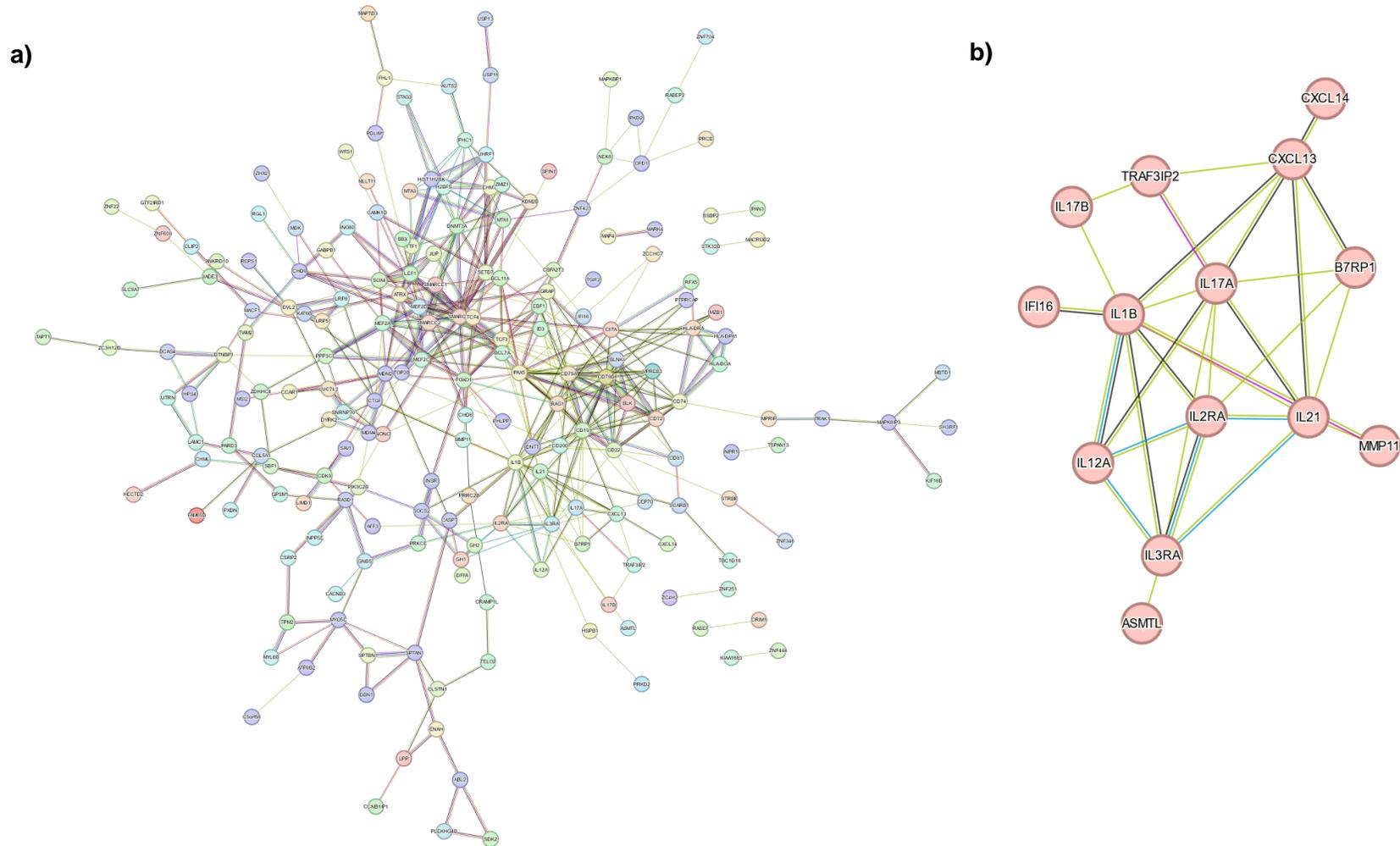


Figura 22: Análisis de Interacción Proteína-Proteína en BCP-ALL vs. Individuos Sanos.

a) Visualización de las interacciones proteína-proteína utilizando la herramienta STRING, basada en el conjunto de 300 genes expresados de manera diferencial entre pacientes con diagnóstico de BCP-ALL e individuos sanos. Las interacciones se establecieron considerando la evidencia experimental disponible, proporcionando una perspectiva detallada de las conexiones proteínicas. **b)** interacciones proteína a proteína de IL-17A.

6. Discusión

Durante la leucemia, las LC modifican el microambiente medular para favorecer el desarrollo y la progresión de la enfermedad, y aunque muchos estudios se centran en comprender las interacciones entre las LC y el microambiente de la médula, la recaída de la enfermedad sigue siendo un desafío clínico. Uno de los mecanismos centrales en la progresión tumoral y la metástasis implica la generación de un "macroambiente" inmunosupresor, mediado en parte a través de factores generados por el tumor. En este trabajo, proponemos la sobreexpresión de ID1 e ID3 como factores que podrían modular algunas poblaciones inmunes en el microambiente tumoral, favoreciendo así la inmunosupresión. Se analizaron las poblaciones inmunes de BM de pacientes BCP-ALL mediante citometría de flujo y la expresión génica a través de RNA-seq, según la expresión de los genes ID1 e ID3. Interesantemente, observamos que la sobreexpresión de ID1 o ID3 se asoció con un aumento de las poblaciones de neutrófilos y monocitos. Además, se destacó que las vías relacionadas con la desgranulación y activación de los neutrófilos mostraban alteraciones similares, sugiriendo posibles conexiones entre la sobreexpresión de estos genes y la respuesta inmunológica en BCP-ALL en adultos.

Previamente, en nuestro grupo se observó que alta expresión de los genes ID1 e ID3 se asocia con la falta de respuesta al tratamiento de inducción y un mal pronóstico en pacientes adultos con la BCP-ALL (5,47), con el propósito de determinar posible papel como regulador en el TIME de la médula ósea, inicialmente, en este estudio se evaluaron los niveles de expresión ID1 e ID3 de las LC en la cohorte de estudio mediante RT-qPCR. En línea con este estudio, los datos obtenidos fueron reproducibles. Los puntos de corte para definir la sobre expresión fueron equivalentes, a pesar del número limitado de muestras (5).

Actualmente, se reconoce que la expresión elevada de ID1 se asocia con una mayor resistencia a la quimioterapia, una angiogénesis acelerada, una mayor propensión a la metástasis y la manifestación de propiedades vinculadas a las células madre cancerosas, lo que coincide con un pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer (69). Específicamente, ID1 ejerce su efecto promotor del tumor al inhibir la función transcripcional de varios supresores tumorales bHLH, como la inhibición del eje E2A-p21, que regula la actividad de autorrenovación celular y desencadena el cáncer de colon (69). Es importante destacar que E2A es un factor de transcripción crucial en la diferenciación de los progenitores linfoides comunes y en el desarrollo de las células B (70).

Por otro lado, se reconoce que la interacción entre las proteínas ID3 y bHLH es fundamental para la diferenciación celular: esta interacción ha sido propuesta como un evento regulador crucial que promueve la proliferación celular en lugar de la diferenciación (71). Además, la expresión de ID3 tiene función pro-supervivencia en LC de leucemia linfoide crónica y se ha identificado como un factor de riesgo independiente que incide en la OS y DFS en pacientes con leucemia mieloide aguda (52,72).

Si bien los datos generados en este estudio muestran un aumento en la expresión de ID1 e ID3, no se observó un aumento simultáneo en la expresión de ambos genes en los pacientes analizados, a diferencia de lo observado en el estudio anterior. Las razones de estas diferencias en estos resultados no son claras; sin embargo, es relevante destacar que la cohorte utilizada en este estudio fue más extensa (5). Para explorar la relación entre la expresión de ID1 y la de ID3, analizamos la base de datos MILE (73), donde hay un valor de correlación (R) entre los dos transcritos de 0.347, indicando una correlación positiva. Similarmente, en otros modelos tumorales, Castañón et al., observaron que la expresión de ID1 estuvo presente en el 82,4% de los tumores de pulmón de célula no pequeña, mientras que la expresión de ID3 se detectó en el 41,2% de las muestras con una correlación significativa entre las expresiones de ID1 e ID3, con un valor R 0,579 y un valor de p de 0,015 (74). Se ha demostrado, en el cáncer de colon, que la expresión de ID1 e ID3 colaboran para regular la autorrenovación de las células iniciadoras del cáncer a través de la restricción del ciclo celular mediada por el inhibidor del ciclo celular p21. Adicionalmente, se encontró que el silenciamiento de ambos genes aumentó la sensibilidad al quimioterapéutico oxaliplatino, estableciendo así una conexión entre la función de iniciación del tumor y la resistencia a la quimioterapia (75).

Además de controlar las propiedades intrínsecas del tumor, cada vez hay más pruebas que indican que ID1 participa en la formación de un microambiente inmunosupresor. Los estudios realizados por Papaspiridonos, M. et al en melanoma reportan que la sobreexpresión de ID1 conduce a una inmunosupresión sistémica mediante la regulación negativa de moléculas clave implicadas en la diferenciación de DC y la supresión de la proliferación de células T CD8, promoviendo así el crecimiento del tumor primario y la progresión metastásica (20).

Hasta la fecha, los mecanismos que regulan el TIME en el desarrollo de la BCP-ALL sigue siendo un área desconocida. Este estudio se centró en la hipótesis de que la expresión de los genes ID1 e ID3 podrían alterar algunas poblaciones del TIME conduciendo a un microambiente inmunosupresivo y por tanto a la progresión y no respuesta al tratamiento de los pacientes con BCP-ALL.

Con respecto a la población de MDSC, a diferencia de lo reportado, en nuestro estudio, no observamos ningún incremento en esta población. Esta diferencia podría explicarse en parte por las diferencias en los marcadores utilizados para la detección de MDSC (CD33, CD11b y HLA-DR), dentro del panel de citometría de flujo. En un estudio realizado por Liu y col., la población de MDSC, incluyendo las subpoblaciones monocíticas y granulocíticas se evaluó mediante marcadores como CD45, CD19, HLA-DR, CD11b, CD33, CD15 y CD14. La estrategia de “gating” incluyó la separación de las HLA-DR^{low} CD11b⁺ CD33 intermedias/altas de las PBMC vivas. Este estudio encontró un aumento significativo en la población granulocítica de MDSC, tanto en la sangre periférica como en la BM, en pacientes con BCP-ALL en comparación con controles sanos de la misma edad (76). Lo que sugiere que la evaluación precisa de esta población específica requiere la inclusión de más marcadores y una mayor cantidad de muestra disponible para realizar los ensayos de citometría. Desafortunadamente, tanto CIBERSORT como xCell no permiten evaluar la presencia o ausencia de estas células inmunosupresoras en el TME.

Con respecto a la población de macrófagos, se ha establecido que los macrófagos asociados a tumores (TAM) constituyen la población prominente de células inmunes en los tejidos tumorales, contribuyendo a la formación de nichos de células madre cancerosas (CSC) y a un microambiente inmunológico supresor. Recientemente, se correlacionó una alta expresión de ID1 en los TAM con un mal resultado en pacientes con cáncer colorrectal (CCR) [63]. En este estudio, se observó que los macrófagos que expresan ID1 mantienen

el fenotipo pro-tumoral de los TAM e impiden la infiltración de células T CD8 en el microambiente tumoral mediante la inhibición del transductor de señal y el activador de la transcripción 1 (STAT1) mediado por SerpinB2 y la transcripción CCL4 [63]. Contrario a lo reportado, en nuestro estudio, los análisis de citometría de flujo no mostraron un aumento de la población de macrófagos, posiblemente debido al reducido número de esta población en la médula ósea debido a la carga de células leucémicas y la cantidad limitada de muestra disponible. No obstante, a través de los análisis de citometría digital utilizando la herramienta CIBERSORT, se observó un incremento en la población de macrófagos de tipo M0 en pacientes que sobreexpresaron ID1 o ID3. En un estudio realizado por Song JX a partir de muestras de médula ósea evaluó la población de macrófagos M1 o M2 mediante inmunohistoquímica. En este estudio, se observó un aumento en el recuento de macrófagos M2 (marcados con CD68+, CD163+ y CD206+) en las muestras de médula ósea de pacientes con leucemia aguda ($P < 0,01$). Asimismo, se registró una disminución en los niveles de expresión de los marcadores CD68+, CD163+ y CD206+ en pacientes que lograron alcanzar la remisión completa (77). Similarmente, en un estudio realizado por Dander E y colaboradores en pacientes con BCP-ALL, se reportó un aumento de macrófagos que expresaban CD68 en las biopsias leucémicas de médula ósea en comparación con los controles. Estos macrófagos expresaban predominantemente marcadores similares a M2, como CD163 y CD206 [72].

Con respecto a la población de NK, hasta ahora no hay estudios que establezcan relación entre la presencia o ausencia de estas y la expresión de ID1 o ID3. A pesar de esto, hay que resaltar que la presencia de células NK en la médula ósea al momento del diagnóstico se correlaciona positivamente con un pronóstico favorable frente a pacientes que carecen de ellas [86]. En nuestro estudio, aunque identificó la presencia de células NK en las poblaciones del TIME, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de NK según la expresión de ID1 o ID3.

Muchos estudios han demostrado que las células T CD8 disfuncionales en el cáncer se caracterizan por altos niveles de expresión de receptores inhibidores, incluidos PD-1, TIM-3, LAG-3 y el dominio de motivo inhibidor basado en tirosina (TIGIT), que se asocian positivamente con Agotamiento de las células T. Por tanto, la elucidación de los mecanismos moleculares a través de los cuales los factores derivados de TME median los factores de disfunción de las células T es de gran interés, ya que esto puede promover la exploración de nuevas estrategias para restaurar la función de las células T intratumorales

(TIL) (78). En este contexto, el estudio realizado por Jin Y et al. encontró que la expresión forzada de ID3 en células T CD8 en el cáncer hepático conduce a un desarrollo atenuado del agotamiento de los linfocitos T citotóxicos (CTL) antitumorales, lo que resultó en un mejor control del tumor. Estos hallazgos sugieren que ID3 desempeña funciones protectoras en las células T CD8 contra el cáncer de hígado (79). Sin embargo, contrario a este reporte, un estudio reciente realizado por Lipp J et al con el propósito de caracterizar linfocitos infiltrantes de tumor de pacientes con cáncer de pulmón, se evaluó la co-expresión de PD1 e ID3 en TILs. Los resultados de este estudio mostraron que la eliminación ID3 en las células T CD8+ mejora la capacidad citotóxica (80). En nuestro estudio, los resultados del análisis de citometría no revelaron ninguna asociación entre la expresión de ID1 o ID3 y diferencias en las poblaciones de células T CD4+ o CD8+. Sin embargo, al analizar los datos recopilados de la base de TARGET, interesantemente se observó que la expresión de ID3 mostró una asociación directamente proporcional con la expresión de PD-1. Este hallazgo respalda que la expresión de ID3 podría estar vinculada a la actividad exhausta de los CTL. Por otra parte, se ha reportado un aumento de ID3 en los TIL CD4, la cual también estaría desempeñando un papel crucial en el mantenimiento de la expresión de FOXP3 y en la función supresora de CD4 Treg (81). Además, se ha reportado que la pérdida de ID3 conduce a un aumento en el fenotipo CD4 Th9 que exhibe una potente inmunidad antitumoral y la terapia adoptiva TIL que utiliza células CD4 TH9 específicas del tumor demuestra una potente actividad antitumoral (12,82).

Numerosos estudios han demostrado un aumento en la frecuencia de células Treg en la sangre periférica y la BM de pacientes con BCP-ALL en comparación con los controles (83–89). Interesantemente, estudios previos han reportado que ID3 tiene la capacidad de inducir el aumento de células T reguladoras al bloquear factores de transcripción necesarios para la diferenciación hacia fenotipos T helper en células CD4+ (12,81). Infortunadamente, los resultados de los análisis de las poblaciones inmunes mediante citometría de flujo no permitieron la detección esta población específica. Esta limitación podría atribuirse a la escasez de la muestra y como consecuencia, al reducido número de eventos que pudieron ser registrados y analizados.

Como se mencionó anteriormente en el contexto de melanoma, la sobreexpresión de ID1 conduce a una inmunosupresión sistémica al regular negativa moléculas clave implicadas

en la diferenciación de DC (13). En este estudio, la sobreexpresión de ID1 se asoció con la expresión de marcadores fenotípicos e inmunosupresores de MDSC monocíticas, mientras que la regulación a la baja se vinculó con un fenotipo mielóide más inmunogénico. Estos hallazgos sugieren que la expresión de ID1 podría considerarse como un marcador fenotípico adicional de las MDSC monocíticas (13). En nuestro estudio los análisis realizados por CIBERSORT como por xCell en la base de datos TARGET indicaron que las poblaciones con mayores diferencias, según la expresión de ID1 o ID3, podrían estar relacionado con las MDSC monocíticas. Sin embargo, hay que señalar que se requieren ensayos adicionales para confirmar la existencia de una relación entre estas poblaciones y la expresión de ID1 e ID3.

Con relación a la población de neutrófilos, estas son los componentes principales de la inmunidad innata, ejercen sus funciones antimicrobianas a través de diversos mecanismos que incluyen fagocitosis, desgranulación y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) (90). Particularmente, en pacientes pediátricos con BCP-ALL, en un estudio realizado por Oliveira et al, a través de citometría de flujo caracterizó el fenotipo de los neutrófilos a partir de muestras de BM y la sangre periférica. Este estudio reportó una alteración del fenotipo de neutrófilos en la mayoría (77%) de los casos de BCP-ALL, donde se detectó de forma recurrente niveles de expresión anormalmente bajos a negativos de CD10, CD33, CD13 y CD15/CD65, junto con una sobreexpresión de CD123 (91). En un estudio reciente, utilizando un modelo de diferenciación de granulocitos humano ex vivo demostró que tanto ID1 como ID2 desempeñan un papel importante en la regulación de la proliferación durante la diferenciación de granulocitos. Particularmente se observó que la expresión constitutiva de ID1 en las células mieloides bloqueó la diferenciación de eosinófilos e indujo el desarrollo de neutrófilos (92). En línea con este reporte, en nuestro estudio se observó una tendencia al aumento de neutrófilos en las muestras con una sobreexpresión de ID1 e ID3. Interesantemente, estos hallazgos fueron también corroborados en el análisis realizado con las herramientas CIBERSORT y xCell, donde se encontró que la expresión de ID1 e ID3 se correlacionó significativamente con un incremento en la infiltración de esta población en las muestras de BM.

Por otro lado, los resultados de este estudio se observó un enriquecimiento de las vías de degranulación y activación de los neutrófilos cuando hay un aumento de ID1 e ID3. Como se indicó anteriormente, dentro de los mecanismos efectores de los neutrófilos incluyen las NETs. En particular, la formación aberrante de NET puede ser parte responsable de los

defectos inmunológicos observados en la leucemia aguda, aún se sabe poco sobre la liberación de NET durante la leucemia (92). Recientemente, un estudio realizado en 2021 reveló que la liberación de NETs estaba significativamente alterada en niños con leucemias agudas, tanto en el momento del diagnóstico como durante el tratamiento (93). Llamativamente, en nuestra cohorte se observó también un incremento en la expresión de los genes TCN1, HP y ORL1. Se ha reportado que TCN1 forma parte de los gránulos secundarios de los neutrófilos y se ha asociado como un biomarcador de mal pronóstico en el cáncer de colon (94). Con relación a la haptoglobina humana (HP), se ha reportado que esta es secretada en la activación de los neutrófilos, contribuye a la oncogénesis del cáncer de mama mediante la modulación de la actividad glucolítica (95). Asimismo, ORL1, promueve la metástasis y ha sido implicado en el cáncer de páncreas (96). Estos hallazgos sugieren posiblemente una vinculación entre la sobreexpresión de ID1 e ID3 y la función de los neutrófilos, destacando posibles conexiones con procesos oncogénicos específicos.

El manejo de la BCP-ALL sigue siendo un desafío clínico en la última década, la inmunoterapia ha surgido como una estrategia que ha demostrado mejoras significativas en los resultados, especialmente en pacientes con recurrencias o enfermedad refractaria (97). Es crucial destacar que tanto ID1 como ID3 desempeñan funciones centrales en la biología del cáncer, actuando como reguladores transcripcionales que ejercen su influencia en la maquinaria transcripcional intracelular de las células tumorales (98). Este impacto directo en los procesos biológicos subyacentes resalta la importancia de obtener un entendimiento molecular preciso de la función de estos biomarcadores. Tal comprensión puede ofrecer valiosa información sobre nuevas vías terapéuticas y estrategias personalizadas destinadas a mejorar la eficacia del tratamiento en pacientes con BCP-ALL. La identificación y caracterización detallada de estos biomarcadores en el contexto de la leucemia BCP-ALL proporciona una base sólida para futuras investigaciones clínicas y ofrece oportunidades prometedoras para el desarrollo de enfoques terapéuticos más precisos y efectivos (5,99).

Es fundamental señalar que, a pesar de las limitaciones inherentes a la cantidad de datos disponibles y el tamaño relativamente reducido de la cohorte, los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una perspectiva valiosa sobre la posible influencia de ID1 e ID3 en el TIME en BCP-ALL. La observación de correlaciones entre la expresión de estos

genes y diversas poblaciones celulares, especialmente los neutrófilos y monocitos, sugiere una posible modulación en la infiltración inmunológica. Sin embargo, para una comprensión más completa y detallada de estos hallazgos, será crucial validar y expandir estos resultados en cohortes más extensas y explorar mecanismos moleculares subyacentes en estudios futuros.

En conclusión, los datos generados de este sugieren una asociación entre la sobreexpresión de los genes ID1 e ID3 y la composición del TIME en la BCP-ALL. Específicamente, se observó una correlación con el aumento de poblaciones celulares, como los neutrófilos y monocitos, indicando una posible modulación de estas células por parte de los genes estudiados.

Perspectivas

- Necesidad de validación y exploración molecular: Se destaca la importancia de validar estos hallazgos en cohortes más extensas para confirmar la asociación entre la sobreexpresión de ID1 e ID3 y las poblaciones celulares mencionadas. Además, se resalta la necesidad de futuras investigaciones que exploren los mecanismos moleculares subyacentes a esta interacción, lo que proporcionaría una comprensión más completa de la influencia de estos genes en la BCP-ALL.
- Base para Investigaciones futuras: Los resultados obtenidos ofrecen una base sólida para investigaciones futuras, enfocadas en comprender mejor los aspectos moleculares y clínicos de la relación entre ID1 e ID3 y el TME en la BCP-ALL en adultos. Estos hallazgos abren la puerta a nuevas preguntas y posibles estrategias terapéuticas basadas en la comprensión de la interacción entre estos genes y el sistema inmunológico en el contexto de la BCP-ALL.

Divulgación del conocimiento

En el marco del desarrollo de este trabajo de grado, se realizaron distintas actividades de divulgación referentes a los resultados en este proyecto como a búsqueda de biomarcadores en leucemias que se consideran importantes resaltar en este documento:

1. **Artículos:** Artículo de revisión publicado en la revista *frontiers* como autora principal (Anexo 1). Resumen de ponencia publicado en *Revista Colombiana de Cancerología* Mayo/2023, suplemento 2, volumen 27 páginas 176 y 177 (Anexo 2)
2. **Eventos de difusión del conocimiento:** Se realizaron participaciones en distintas plataformas que tuvieron como objetivo principal socializar los resultados de este trabajo. Primero, se realizó una presentación oral en el I Encuentro virtual estudiantes de posgrado con enfoque en investigación en cáncer (Anexo 3), posteriormente se presentó un póster en Encuentro académico científico de la Red Nacional de Investigación en Cáncer 2023 (Anexo 4), luego se realizó una presentación en modalidad oral para el XVIII Encuentro Científico del INS “La investigación en Salud Pública con enfoque integral impactando los territorios” (Anexo 5) y finalmente la European Association for Cancer Research (EARC) aceptó un poster para la “EACR-AACR-IACR 2024 Conference: How to Bring Basic Science Discoveries to the Clinic” que se llevará a cabo del 27 al 29 en Irlanda y donde se expondrán los resultados del proyecto (Anexo 6).
3. **Distinciones:** Dentro del transcurso de la maestría se participó en otros proyectos, incluyendo un proyecto en BCP-ALL en niños, el cual recibió el premio nacional de medicina como mejor trabajo de investigación concluido e inédito (Anexo 7).

Referencias

1. Richard-Carpentier G, Kantarjian H, Jabbour E. Recent Advances in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;
2. Roberts KG, Mullighan CG. The Biology of B-Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Jan 1];10(7):1–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31653664/>
3. Felipe Combariza J, Casas CP, Rodriguez M. *Rev Colomb CanCeRol* 2007;11(2):92-100 93.
4. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* [Internet]. 2016;1863(3):449–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.015>
5. Cruz-Rodriguez N, Combata AL, Enciso LJ, Raney LF, Pinzon PL, Lozano OC, et al. Prognostic stratification improvement by integrating ID1/ID3/IGJ gene expression signature and immunophenotypic profile in adult patients with B-ALL. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2017;36(1):1–12.
6. Roschger C, Cabrele C. The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways Fritz Aberger. *Cell Communication and Signaling*. 2017;15(1):1–26.
7. Wang LH, Baker NE. E-proteins and ID-proteins: Helix-loop-helix partners in development and disease. *Dev Cell* [Internet]. 2015 Nov 11 [cited 2023 Dec 12];35(3):269. Available from: </pmc/articles/PMC4684411/>
8. Perk J, Iavarone A, Benezra R. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(8):603–14.
9. Roberts EC, Deed RW, Inoue T, Norton JD, Sharrocks AD. Id Helix-Loop-Helix Proteins Antagonize Pax Transcription Factor Activity by Inhibiting DNA Binding. *Mol Cell Biol*. 2001 Jan 15;21(2):524–33.

10. Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development , cell cycle and cancer. 2003;13(8):410–8.
11. Ling MT, Wang X, Zhang X, Wong YC. The multiple roles of Id-1 in cancer progression. *Differentiation*. 2006;74(9–10):481–7.
12. Nakatsukasa H, Zhang D, Maruyama T, Chen H, Cui K, Ishikawa M, et al. The DNA-binding inhibitor Id3 regulates IL-9 production in CD4 + T cells. *Nat Immunol*. 2015;16(10):1077–84.
13. Melief J, Pico de Coaña Y, Maas R, Fennemann FL, Wolodarski M, Hansson J, et al. High expression of ID1 in monocytes is strongly associated with phenotypic and functional MDSC markers in advanced melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2020;69(4):513–22.
14. Ma C, Witkowski MT, Harris J, Dolgalev I, Sreeram S, Qian W, et al. Leukemia-on-a-chip: Dissecting the chemoresistance mechanisms in B cell acute lymphoblastic leukemia bone marrow niche. *Sci Adv*. 2020 Oct 28;6(44).
15. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394–424.
16. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1941–53.
17. Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, Fielding A, Ribera JM, Buske C. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2016;27:v69–82.
18. Schwab C, Harrison CJ. Advances in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Genomics. *Hemasphere*. 2018;1.
19. Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Vol. 91, *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier Ltd; 2016. p. 1645–66.
20. Papaspyridonos M, Matei I, Huang Y, Andre R, Brazier-mitouart H, Waite JC, et al. Id1 suppresses anti-tumour immune responses and promotes tumour progression by impairing myeloid cell maturation. 2015;
21. Gloury R, Zotos D, Zuidschewoude M, Masson F, Liao Y, Hasbold J, et al. Dynamic changes in Id3 and E-protein activity orchestrate germinal center and plasma cell development. *Journal of Experimental Medicine*. 2016;213(6):1095–111.
22. Lasorella A, Benezra R, Iavarone A. The ID proteins: Master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(2):77–91.

23. Stankovic T, Marston E. MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN CHEMORESISTANCE IN PAEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA. 2008;136:187–92.
24. Passaro D, Quang CT, Ghysdael J. Microenvironmental cues for T-cell acute lymphoblastic leukemia development. *Immunol Rev.* 2016;271(1):156–72.
25. Höpken UE, Rehm A. Targeting the Tumor Microenvironment of Leukemia and Lymphoma. *Trends Cancer.* 2019;5(6):351–64.
26. Houshmand M, Blanco TM, Circosta P, Yazdi N, Kazemi A, Saglio G, et al. Bone marrow microenvironment: The guardian of leukemia stem cells. Vol. 11, *World Journal of Stem Cells.* Baishideng Publishing Group Co; 2019. p. 476–90.
27. Rabe JL, Gardner L, Hunter R, Fonseca JA, Dougan J, Gearheart CM, et al. IL12 abrogates calcineurin-dependent immune evasion during leukemia progression. *Cancer Res.* 2019;79(14):3702–13.
28. Hunter R, Imbach KJ, Zhou C, Dougan J, Hamilton JAG, Chen KZ, et al. B-cell acute lymphoblastic leukemia promotes an immune suppressive microenvironment that can be overcome by IL-12. *Scientific Reports* 2022 12:1. 2022 Jul 13;12(1):1–13.
29. Malard F, Mohty M. Seminar Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet.* 2020;395(10230):1146–62.
30. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet.* 2013;381(9881):1943–55.
31. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* 2014;505(7483):327–34.
32. Hagman J. Transcriptional Regulation of Early B Cell Development. Second Edi. *Molecular Biology of B Cells: Second Edition.* Elsevier Ltd; 2015. 35–53 p.
33. Engel I, Murre C. The function of E- and ID proteins in lymphocyte development. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(3):193–9.
34. Loghavi S, Kutok JL, Jorgensen JL. B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2015;144(3):393–410.
35. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e577.
36. Cobaleda C, Sánchez-García I. B-cell acute lymphoblastic leukaemia: Towards understanding its cellular origin. *BioEssays.* 2009;31(6):600–9.
37. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(9):975–83.

38. Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: Concepts and strategies. *Cancer*. 2010;116(5):1165–76.
39. Sas V, Moisoiu V, Teodorescu P, Tranca S, Pop L, Iluta S, et al. Approach to the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Patient. *J Clin Med*. 2019;8(8):1175.
40. Bassan R, Bourquin JP, DeAngelo DJ, Chiaretti S. New approaches to the management of adult acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(35):3504–19.
41. Muffly LS, Reizine N, Stock W. Management of acute lymphoblastic leukemia in young adults. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*. 2018;16(2):138–46.
42. Narayanan S, Shami PJ. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;81(1):94–102.
43. Malouf C, Ottersbach K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018;75(3):417–46.
44. Rafei H, Kantarjian HM, Jabbour EJ. Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(11):2606–21.
45. Hoelzer D, Bassan R, Boissel N, Roddie C, Ribera JM, Jerkeman M. ESMO Clinical Practice Guideline interim update on the use of targeted therapy in acute lymphoblastic leukaemia. *Annals of Oncology [Internet]*. 2023 Oct [cited 2023 Dec 4];0(0). Available from: <http://www.annalsofncology.org/article/S0923753423040097/fulltext>
46. Kantarjian H, Stein A, Gökbüget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2017 Mar 2;376(9):836–47.
47. Cruz-Rodriguez N, Combita AL, Enciso LJ, Quijano SM, Pinzon PL, Lozano OC, et al. High expression of ID family and IGJ genes signature as predictor of low induction treatment response and worst survival in adult Hispanic patients with B-Acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2016;35(1):1–14.
48. Mami N Ben, Mohty M, Chambost H, Gaugler B, Olive D. Blood dendritic cells in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004 Jul;126(1):77–80.
49. Liu C, Wang HC, Yu S, Jin R, Tang H, Liu YF, et al. Id1 Expression Promotes T Regulatory Cell Differentiation by Facilitating TCR Costimulation. *The Journal of Immunology*. 2014;193(2):663–72.

50. Yuen HF, Chan YP, Chan KK, Chu YY, Wong MLY, Law SYK, et al. Id-1 and Id-2 are markers for metastasis and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2007;97(10):1409–15.
51. Nair R, Teo WS, Mittal V, Swarbrick A. ID Proteins Regulate Diverse Aspects of Cancer Progression and Provide Novel Therapeutic Opportunities. 2014;22(8):1407–15.
52. Weiler S, Ademokun JA, Norton JD. ID helix-loop-helix proteins as determinants of cell survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. 2015;1–20.
53. Zebedee Z, Hara E. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene*. 2001;20(58 REV. ISS. 8):8317–25.
54. Mellman I, Chen DS, Powles T, Turley SJ. The cancer-immunity cycle: Indication, genotype, and immunotype. *Immunity*. 2023 Oct 10;56(10):2188–205.
55. Roy S, Zhuang Y. Paradoxical role of Id proteins in regulating tumorigenic potential of lymphoid cells. Vol. 12, *Frontiers of Medicine*. Higher Education Press; 2018. p. 374–86.
56. Witkowski MT, Dolgalev I, Evensen NA, Tsirigos A, Carroll WL. Article Extensive Remodeling of the Immune Microenvironment in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Extensive Remodeling of the Immune Microenvironment in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2020;37(6):867-882.e12.
57. Anderson D, Skut P, Hughes AM, Ferrari E, Tickner J, Xu J, et al. The bone marrow microenvironment of pre - B acute lymphoblastic leukemia at single - cell resolution. *Sci Rep*. 2020;1–14.
58. Méndez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2020;
59. Forte D, Krause DS, Andreeff M, Bonnet D, Méndez-Ferrer S. Updates on the hematologic tumor microenvironment and its therapeutic targeting. *Haematologica*. 2019;104(10):1928–34.
60. Man Y, Yao X, Yang T, Wang Y. Hematopoietic Stem Cell Niche During Homeostasis, Malignancy, and Bone Marrow Transplantation. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(January):1–11.
61. Meyer LK, Hermiston ML. The bone marrow microenvironment as a mediator of chemoresistance in acute lymphoblastic leukemia. 2019;1–14.
62. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(2):93–106.

63. Reagan MR, Rosen CJ. Navigating the bone marrow niche: Translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(3):154–68.
64. Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, et al. Bone marrow and the control of immunity. 2012;(July 2011):11–9.
65. Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(1):49–60.
66. Riether C, Schürch CM, Ochsenbein AF. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death Differ*. 2015;22(2):187–98.
67. Autio M, Leivonen S katri, Brück O, Mustjoki S. Immune cell constitution in the tumor microenvironment predicts the outcome in diffuse large B-cell lymphoma. 2021;106(3).
68. Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, Silberstein L, Putheti P, Larocca R, et al. In vivo imaging of T reg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature*. 2011;474(7350):216–20.
69. Shang S, Yang C, Chen F, Xiang R shen, Zhang H, Dai S yuan, et al. ID1 expressing macrophages support cancer cell stemness and limit CD8+ T cell infiltration in colorectal cancer. *Nat Commun*. 2023;14(1).
70. Prabhu S, Ignatova A, Park ST, Sun XH. Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol Cell Biol*. 1997 Oct 1;17(10):5888.
71. Pan L, Sato S, Frederick JP, Sun XH, Zhuang Y. Impaired Immune Responses and B-Cell Proliferation in Mice Lacking the Id3 Gene. *Mol Cell Biol*. 1999;19(9):5969–80.
72. Zhao Q, Wang Y, Yu D, Leng JY, Zhao Y, Chu M, et al. Comprehensive analysis of ID genes reveals the clinical and prognostic value of ID3 expression in acute myeloid leukemia using bioinformatics identification and experimental validation. *BMC Cancer*. 2022;22(1):1–12.
73. Labaj W, Papiez A, Polanski A, Polanska J. Comprehensive Analysis of MILE Gene Expression Data Set Advances Discovery of Leukaemia Type and Subtype Biomarkers. *Interdiscip Sci*. 2017 Mar 1;9(1):24.
74. Castañón E, Bosch-Barrera J, López I, Collado V, Moreno M, López-Picazo JM, et al. Id1 and Id3 co-expression correlates with clinical outcome in stage III-N2 non-small cell lung cancer patients treated with definitive chemoradiotherapy. *J Transl Med*. 2013 Jan 11;11(1):1–8.

75. O'Brien CA, Kreso A, Ryan P, Hermans KG, Gibson L, Wang Y, et al. ID1 and ID3 Regulate the Self-Renewal Capacity of Human Colon Cancer-Initiating Cells through p21. *Cancer Cell*. 2012 Jun 12;21(6):777–92.
76. Liu Y feng, Chen Y ying, He Y yi, Wang J yi, Yang J ping, Zhong S ling, et al. Expansion and activation of granulocytic, myeloid-derived suppressor cells in childhood precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Leukoc Biol*. 2017;102(2):449–58.
77. Song JX, Wen Y, Li RW, Dong T, Tang YF, Zhang JJ, et al. Phenotypic characterization of macrophages in the BMB sample of human acute leukemia. *Ann Hematol*. 2020;99(3):539–47.
78. Zhang Z, Liu S, Zhang B, Qiao L, Zhang Y, Zhang Y. T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. 2020;8(February).
79. Jin Y, Hu P, Sun H, Yang C, Zhai J, Wang Y, et al. Expression of Id3 represses exhaustion of anti-tumor CD8 T cells in liver cancer. *Mol Immunol*. 2022 Apr 1;144:117–26.
80. Lipp JJ, Wang L, Yang H, Yao F, Harrer N, Müller S, et al. Functional and molecular characterization of PD1+ tumor-infiltrating lymphocytes from lung cancer patients. *Oncoimmunology*. 2022 Dec 31;11(1).
81. Rauch KS, Hils M, Lupar E, Minguet S, Sigvardsson M, Rottenberg ME, et al. Id3 Maintains Foxp3 Expression in Regulatory T Cells by Controlling a Transcriptional Network of E47, Spi-B, and SOCS3. *Cell Rep*. 2016;17(11):2827–36.
82. Xue G, Zheng N, Fang J, Jin G, Li X, Dotti G, et al. Adoptive cell therapy with tumor-specific Th9 cells induces viral mimicry to eliminate antigen-loss-variant tumor cells. *Cancer Cell*. 2021 Dec 13;39(12):1610-1622.e9.
83. Lustfeld I, Ahlmann M. High Proportions of CD4 + T Cells among Residual Bone Marrow T Cells in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Are Associated with Favorable Early Responses. 2014;28–36.
84. Salem ML, El-Shanshory MR, Abdou SH, Attia MS, Sobhy SM, Zidan MF, et al. Chemotherapy alters the increased numbers of myeloid-derived suppressor and regulatory T cells in children with acute lymphoblastic leukemia. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2018;40(2):158–67.
85. El-maadawy EA, Elshal MF, Bakry RM, Moussa MM, El-Naby SH, Talaat RM. Regulation of CD4+CD25+FOXP3+ cells in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Implication of cytokines and miRNAs. *Mol Immunol*. 2020;124(March):1–8.
86. Niedźwiecki M, Budziło O, Zieliński M, Adamkiewicz-Drożyńska E, Maciejka-Kembłowska L, Szczepański T, et al. CD4+CD25highCD127low/–FoxP3+

Regulatory T Cell Subpopulations in the Bone Marrow and Peripheral Blood of Children with ALL: Brief Report. *J Immunol Res.* 2018;2018.

87. Wu CP, Qing X, Wu CY, Zhu H, Zhou HY. Immunophenotype and increased presence of CD4 +CD25 + regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett.* 2012;3(2):421–4.
88. Liu SX, Xiao HR, Wang GB, Chen XW, Li CG, Mai HR, et al. Preliminary investigation on the abnormal mechanism of cd4+foxp3+cd25high regulatory t cells in pediatric b-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Ther Med.* 2018;16(2):1433–41.
89. Idris SZ, Hassan N, Lee LJ, Md Noor S, Osman R, Abdul-Jalil M, et al. Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukemia patients. *Hematology.* 2015;20(9):523–9.
90. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
91. Oliveira E, Bacelar TS, Ciudad J, Ribeiro MCM, Garcia DRN, Sedek L, et al. Altered neutrophil immunophenotypes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2016 Apr 4;7(17):24664.
92. Buitenhuis M, Van Deutekom HWM, Verhagen LP, Castor A, Jacobsen SEW, Lammers JWJ, et al. Differential regulation of granulopoiesis by the basic helix-loop-helix transcriptional inhibitors Id1 and Id2. *Blood.* 2005 Jun 1;105(11):4272–81.
93. Ostafin M, Ciepiela O, Pruchniak M, Wachowska M, Ulińska E, Mrówka P, et al. Dynamic Changes in the Ability to Release Neutrophil ExtraCellular Traps in the Course of Childhood Acute Leukemias. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 2;22(2):1–11.
94. Liu G jie, Wang Y jie, Yue M, Zhao L mei, Guo YD, Liu Y ping, et al. High expression of TCN1 is a negative prognostic biomarker and can predict neoadjuvant chemosensitivity of colon cancer. *Scientific Reports* 2020 10:1. 2020 Jul 20;10(1):1–11.
95. Chen J, Cheuk IWY, Siu MT, Yang W, Cheng AS, Shin VY, et al. Human haptoglobin contributes to breast cancer oncogenesis through glycolytic activity modulation. *Am J Cancer Res.* 2020;10(9):2865.
96. Yang G, Xiong G, Feng M, Zhao F, Qiu J, Liu Y, et al. OLR1 promotes pancreatic cancer metastasis via increased c-Myc expression and transcription of HMGA2. *Molecular Cancer Research.* 2020 May 1;18(5):685–97.
97. Lussana F, Cavallaro G, De Simone P, Rambaldi A. Optimal Use of Novel Immunotherapeutics in B-Cell Precursor ALL. *Cancers (Basel).* 2023;15(4):1–23.

98. Zhang H, Rosdahl I. Expression profiles of Id1 and p16 proteins in all-trans-retinoic acid-induced apoptosis and cell cycle re-distribution in melanoma. *Cancer Lett.* 2005 Jan 10;217(1):33–41.
99. Álvarez-Zúñiga CD, Garza-Veloz I, Martínez-Rendón J, Ureño-Segura M, Delgado-Enciso I, Martínez-Fierro ML. Circulating Biomarkers Associated with the Diagnosis and Prognosis of B-Cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2023 Aug 1;15(16):4186.