

Identificación de perfiles metabólicos de células tumorales de Leucemia Linfoblástica Aguda de Precursores B (LLA-B) relacionados con variables biológicas y clínicas de la enfermedad

Karen Lizeth Pachón Meza

Trabajo de Grado para Optar al Título de Maestría en Microbiología

Director

José Arturo Gutiérrez Triana

Doctor en Ciencias Naturales

Codirectora

Sandra Milena Sanabria Barrera

Doctora en Ciencias Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

A la memoria de los invencibles, los primeros en llegar al cielo.

Soneto LXXXIX

“Cuando yo muera quiero tus manos en mis ojos:
quiero la luz y el trigo de tus manos amadas
pasar una vez más sobre mí su frescura:
sentir la suavidad que cambió mi destino.

Quiero que vivas mientras yo, dormido, te espero,
quiero que tus oídos sigan oyendo el viento,
que huelas el aroma del mar que amamos juntos
y que sigas pisando la arena que pisamos.

Quiero que lo que amo siga vivo
y a ti te amé y canté sobre todas las cosas,
por eso sigue tú floreciendo, florida,

para que alcances todo lo que mi amor te ordena,
para que se pasee mi sombra por tu pelo,
para que así conozcan la razón de mi canto”.

Pablo Neruda, 1959.

Agradecimientos

A la vida de quienes su salud se ha visto quebrantada, a sus circunstancias particulares de constante fuerza, lucha y gran esperanza. A las familias que son el soporte, la compañía y la energía cuidadora de sus seres queridos. A los que partieron, pero que son recibidos con una sonrisa en el cielo al verlos llegar temprano. A los profesionales de salud, que día a día trabajan y suman esfuerzos para mejorar la calidad de vida de los pacientes. La ciencia que se cuestiona, crea y avanza con determinación en nuevas alternativas para favorecer la salud de los pacientes.

Al Ministerio de Ciencias, Tecnología e Innovación que financió este proyecto y mi participación como Joven Investigador e Innovador. A las instituciones de prestación de servicio: Hospital Universitario de Santander (HUS), Hospital Internacional de Colombia (HIC) / Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV) y la Clínica Materno Infantil San Luis. A el laboratorio de Investigación de la FCV, y al laboratorio de Citometría de Flujo del HIC, en especial a Dayro Calderón.

Agradezco a mi casa de estudios, la Universidad Industrial de Santander, la escuela de Microbiología, a mis directores el Dr. Arturo Gutiérrez y la Dra. Sandra Sanabría, a mis compañeros, en especial a José Padilla, todos quienes han estado presentes en este proceso, y han sido generosos al compartir su conocimiento. A la Dra. Nataly Cruz y la Dra. Clara González por la primera oportunidad y la confianza recibida.

Agradezco a la Dra. Claudia Chica, quién guió en el análisis bioestadístico del presente trabajo.

Finalmente, agradezco a mi madre y a mis hermanos quienes me abrazan en el momento justo; honro su vida, porque me han enseñado a hacer camino y ser perseverante. A Emily mi miel y su amor protector.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	17
1. Planteamiento del problema.....	19
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo General.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3. Marco referencial	24
3.1 Descripción del proceso hematopoyético	24
3.2 Estructura del nicho hematopoyético y su función en el microambiente de la médula ósea ..	26
3.3 Desarrollo de las células B.....	30
3.4 Origen de las leucemias	34
3.5 Características y estratificación del riesgo de la LLA-B	35
3.6 Metabolismo del cáncer	38
3.6.1 Metabolismo del cáncer asociado con procesos glucolíticos.....	42
3.6.2 Metabolismo del cáncer asociado a la respiración mitocondrial.	43
3.6.3 Mecanismos generales de resistencia quimioterapéutica al cáncer	49
3.7 Biología de los genes <i>IDI</i> e <i>ID3</i>	51
3.8 Biología del gen <i>IGJ</i>	53
3.9 Línea celular NALM-6	53
4. Materiales y Métodos.....	54
4.1 Recolección de muestras de médula ósea	54
4.2 Aislamiento de células leucémicas a partir de muestras primarias	55

4.3	Mantenimiento de la línea celular NALM-6.....	55
4.4	Evaluación de la función mitocondrial de los linfoblastos tumorales de pacientes con LLA-B y de la línea celular NALM-6.....	56
4.5	Evaluación de la función glucolítica de los linfoblastos tumorales de pacientes con LLA-B y de la línea celular NALM-6.....	64
4.6	Determinación de la expresión del perfil genético <i>ID1/ID3/IGJ</i> en muestras primarias.....	68
4.7	Construcción de bases de datos.....	69
4.8	Análisis de los datos.....	70
5.	Resultados.....	71
5.1	Reclutamiento de los pacientes.....	71
5.2	Descripción demográfica de la población reclutada.....	71
5.3	Evaluación del metabolismo de los linfoblastos tumorales.....	72
5.4	Comparación de las características metabólicas en relación con las variables clínicas y biológicas de la enfermedad.....	85
5.5	Comparación de la expresión génica de <i>ID1</i> , <i>ID3</i> e <i>IDJ</i> en relación con variables clínicas de la LLA-B.....	113
6.	Discusión.....	120
7.	Limitaciones.....	142
8.	Conclusiones.....	143
9.	Recomendaciones y perspectivas.....	146
10.	Consideraciones éticas.....	147
11.	Tratamiento de datos.....	148
	Referencias Bibliográficas.....	151

Apéndices..... 182

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Clasificación inmunofenotípica de la LLA-B.....	36
Tabla 2. Acción de los moduladores de la cadena transportadora de electrones.	57
Tabla 3. Concentraciones finales de los moduladores para el ensayo de Mito Stress Test.	57
Tabla 4. Tabla de descripción de las variables a medir para Mito Stress Test	58
Tabla 5. Conceptos relacionados con el fenotipo energético celular.	64
Tabla 6. Concentraciones finales de los moduladores del ensayo de Glycolytic Rate.	65
Tabla 7. Tabla de descripción de las variables a medir para Glycolytic Rate Assay.....	66
Tabla 8. Primers utilizados para la amplificación génica.	69
Tabla 9. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio.	72
Tabla 10. Valores de OCR de la línea celular NALM-6 y los linfoblastos de los pacientes en condiciones basales y de estrés.	75
Tabla 11. Valores de ECAR de la línea celular NALM-6 y los linfoblastos de los pacientes en condiciones basales y de estrés.	76
Tabla 12. Ratio OCR/ECAR de los linfoblastos tumorales de los pacientes con LLA-B evaluados.	82
Tabla 13. Características demográficas de la población en relación con el grupo metabólico... ..	85
Tabla 14. Interpretación del Coeficiente de Correlación de Spearman.	89
Tabla 15. Coeficiente de variación de Spearman de los potenciales metabólicos OCR y ECAR en relación con las variables clínicas cualitativas.....	91
Tabla 16. Coeficiente de variación de Spearman de los potenciales metabólicos OCR y ECAR en relación con las variables clínicas cuantitativas.....	95

Tabla 17. Resultados modelo multivariado para el potencial OCR.	97
Tabla 18. Resultados modelo multivariado para el potencial ECAR.	98
Tabla 19. Correlación de Spearman entre las variables cualitativas y las variables metabólicas relacionadas con el estrés mitocondrial.	100
Tabla 20. Correlación de Spearman entre las variables cualitativas y las variables metabólicas relacionadas con la glucólisis.....	102
Tabla 21. Correlación de Spearman entre las variables cuantitativas y las variables metabólicas relacionadas con el estrés mitocondrial.	106
Tabla 22. Correlación de Spearman entre las variables cuantitativas y las variables metabólicas relacionadas con la glucólisis.....	110
Tabla 23. Correlación de Spearman entre la expresión génica de ID1, ID3 e IGJ y variables clínicas de la LLA-B.....	115
Tabla 24. Resultados modelo multivariado con regresión lineal para la SLE.	119
Tabla 25. Resultados modelo multivariado con regresión lineal para la SG.	120

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Sellos distintivos del cáncer.	18
Figura 2. La firma de expresión ID1/ID3/IGJ está asociada con menor supervivencia global y libre de eventos en pacientes colombianos.	21
Figura 3. La expresión de la firma génica ID1/ID3/IGJ está asociada con menor actividad glucolítica.....	22
Figura 4. Fases de la hematopoyesis.....	26
Figura 5. Arquitectura del nicho hematopoyético.	28
Figura 6. Desarrollo de los linfocitos B.....	31
Figura 7. Mecanismo de recombinación V(D)J. Reparación no homóloga del ADN.	33
Figura 8. Efecto Warburg.	39
Figura 9. Principales rutas metabólicas involucradas en las leucemogénesis.	40
Figura 10. Cadena Transportadora de Electrones (CTE).....	46
Figura 11. Metabolismo energético celular.	48
Figura 12. Ensayo de Estrés Mitocondrial.....	63
Figura 13. Ensayo de la Tasa Glucolítica.	68
Figura 14. Las células tumorales de los pacientes con LLA-B tienden a la quiescencia en comparación con las NALM-6.....	77
Figura 15. Las células tumorales de pacientes con LLA-B a pesar de la quiescencia presentan un potencial metabólico diferencial.	80
Figura 16. El aumento de la actividad glucolítica basal se encuentra relacionada con el grupo con potencial metabólico OCR.....	83

Figura 17. El aumento de la actividad mitocondrial basal se encuentra relacionada con el grupo con potencial metabólico ECAR.	84
Figura 18. El sexo de los pacientes no representa un sesgo entre los dos grupos metabólicos evaluados.....	86
Figura 19. Los grupos con potencial metabólico diferencial no tienen correlación con variables clínicas de la LLA-B.	87
Figura 20. El grupo con potencial metabólico ECAR tiene mayor expresión del gen IGJ.	88
Figura 21. El potencial metabólico OCR se encuentra positivamente relacionado con la EMR.	92
Figura 22. La EMR se encuentra relacionada significativamente con la disminución del potencial metabólico OCR.....	93
Figura 23. El potencial metabólico ECAR se encuentra relacionado con la presencia de EMR y la expresión del gen IGJ.....	96
Figura 24. La EMR se relaciona con la máxima respiración y la capacidad respiratoria de reserva.	99
Figura 25. La EMR se relaciona con la acidificación post 2-DG.....	101
Figura 26. La enfermedad mínima residual (EMR) está relacionada con variables metabólicas.	103
Figura 27. Correlación de Spearman entre las variables cuantitativas y las variables metabólicas relacionadas con el estrés mitocondrial.	105
Figura 28. Variables metabólicas de la respiración mitocondrial se encuentran relacionadas con variables clínicas y biológicas de diagnóstico de la LLA-B.....	108

Figura 29. Correlación de Spearman entre las variables cuantitativas y las variables metabólicas relacionadas con la tasa glucolítica.....	109
Figura 30. Variables metabólicas de la glucólisis se encuentran relacionadas con variables clínicas y biológicas de diagnóstico de la LLA-B.	112
Figura 31. La expresión génica de IGJ es un factor pronóstico determinante en la LLA-B. ...	114
Figura 32. Expresión génica de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ID1 > 1 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.....	116
Figura 33. Expresión génica de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ID3 > 1 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.....	117
Figura 34. El aumento de la expresión génica de IGJ se relaciona directamente con la disminución de la SLE y la SG en la LLA-B.	118
Figura 35 . Características metabólicas de los grupos con potencial metabólico diferencial identificados en el presente estudio.	129
Figura 36. Variables clínicas y biológicas de la LLA-B relacionadas con el metabolismo de OXPHOS.....	133
Figura 37. Variables clínicas y biológicas de la LLA-B relacionadas con el metabolismo glucolítico.	134
Figura 38. Descripción del perfil metabólico y clínico relacionado con la expresión del gen IGJ.	140
Figura 39. Conclusiones.	146

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Protocolo de inclusión de pacientes al estudio.....	182
Apéndice B. Asentimiento informado en su última versión.	184
Apéndice C. Consentimiento informado para padres en su última versión.	187
Apéndice D. Consentimiento informado para mayores de edad en su última versión.....	191
Apéndice E. Tabla de descripción de las variables clínicas, moleculares y de laboratorio a evaluar.	195
Apéndice F. Fenotipo energético de los pacientes con potencial metabólico OCR vs el fenotipo energético de la línea celular NALM-6.	199
Apéndice G. Fenotipo energético de los pacientes con potencial metabólico ECAR vs el fenotipo energético de la línea celular NALM-6.	200
Apéndice H. Variables clínicas en relación con las variables metabólicas.	201
A. Sexo versus variables metabólicas.....	201
B. Edad versus variables metabólicas.....	203
C. Número de leucocitos versus variables metabólicas.....	205
D. Niveles de hemoglobina versus variables metabólicas.	207
E. Número de plaquetas versus variables metabólicas.....	209
F. Lactato deshidrogenasa (LDH) versus variables metabólicas.	211
G. Enfermedad Mínima Residual (EMR) día 30 versus variables metabólicas.	213
H. Infiltración del SNC versus variables metabólicas.	215
I. Alteraciones en el cariotipo versus variables metabólicas.....	217
J. Tipo de cariotipo versus variables metabólicas.	219

K.	<i>BCR/ABL</i> versus variables metabólicas.....	221
L.	<i>ETV6 RUNX 1</i> versus variables metabólicas.....	223
M.	Expresión del gen <i>ID1</i> (Percentil 25) versus variables metabólicas.....	225
N.	Expresión del gen <i>ID1</i> (Percentil 50) versus variables metabólicas.....	227
O.	Expresión del gen <i>ID1</i> ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.....	229
P.	Expresión del gen <i>ID3</i> (Percentil 25) versus variables metabólicas.....	231
Q.	Expresión del gen <i>ID3</i> (Percentil 50) versus variables metabólicas.....	233
R.	Expresión del gen <i>ID3</i> ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.....	235
S.	Expresión del gen <i>IGJ</i> (Percentil 25) versus variables metabólicas.....	237
T.	Expresión del gen <i>IGJ</i> (Percentil 50) versus variables metabólicas.....	239
U.	Expresión del gen <i>IGJ</i> ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.....	241
V.	Expresión del gen <i>ID1</i> e <i>ID3</i> ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.....	243
W.	Expresión del gen <i>ID1</i> e <i>IGJ</i> ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.....	245
X.	Expresión del gen <i>ID3</i> e <i>IGJ</i> ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.....	247
Y.	Expresión del gen <i>ID1</i> , <i>ID3</i> e <i>IGJ</i> ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.....	249
Apéndice I. Evaluación de la expresión génica con variables clínicas de la LLA-B		251
A.	Expresión génica de <i>ID1</i> percentil 25 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.....	251
B.	Expresión génica de <i>ID1</i> percentil 50 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.....	252
C.	Expresión génica de <i>ID3</i> percentil 25 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.....	253

D.	Expresión génica de <i>ID3</i> percentil 50 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.....	254
E.	Expresión génica de <i>IGJ</i> percentil 25 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.....	255
F.	Expresión génica de <i>IGJ</i> percentil 50 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.....	256
	Apéndice J. Consideraciones éticas y normatividad.....	257
	Apéndice K. Protocolo para el procesamiento de muestras de médula ósea de pacientes con LLA-B.....	267

Resumen

Título: Identificación de perfiles metabólicos de células tumorales de Leucemia Linfoblástica Aguda de Precursores B (LLA-B) relacionados con variables biológicas y clínicas de la enfermedad*

Autor: Karen Lizeth Pachón Meza, José Arturo Gutiérrez Triana, Sandra Milena Sanabria Barrera**

Palabras Clave: LLA-B; Cáncer; Fosforilación Oxidativa; Glucólisis; Potencial Metabólico; Expresión génica.

Descripción: La Leucemia Linfoblástica Aguda de Precursores B (LLA-B) es un tipo de cáncer originado en la médula ósea, que se caracteriza por la proliferación descontrolada de precursores de células B como consecuencia de las alteraciones genéticas, metabólicas y funcionales (Brunner, 2003). En Colombia, los datos epidemiológicos sobre esta enfermedad son preocupantes, ya que ocupa el tercer lugar en incidencia anual y presenta menores tasas de supervivencia en comparación con otros países de la región. (Miranda-Filho et al., 2018). Sin embargo, faltan estudios que relacionen el mal pronóstico en Colombia con la biología de la enfermedad.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue identificar y describir los perfiles metabólicos relacionados con variables biológicas y clínicas en pacientes con LLA-B del área metropolitana de Bucaramanga. El estudio incluyó la realización de pruebas de metabolismo oxidativo y glucolítico en linfoblastos tumorales aislados utilizando el analizador *Seahorse XFe24*, la evaluación de la expresión de la firma génica de mal pronóstico *ID1/ID3/IGJ* y la revisión de la historia clínica de 33 pacientes incluidos en el estudio.

Los resultados encontrados sugieren que los linfoblastos tumorales tienen una actividad energética baja con respecto a la línea celular LLA-B de referencia NALM-6. Adicionalmente, dichas células malignas estarían representadas en dos grupos de pacientes, aquellos con potencial metabólico *OCR* y aquellos con potencial metabólico *ECAR*. Además, se identificó que el aumento de la expresión del gen *IGJ* se encuentra relacionado significativamente con un aumento del potencial *ECAR*, y una menor Supervivencia Libre de Evento (SLE) en los pacientes diagnosticados con LLA-B.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología. Director: José Arturo Gutiérrez Triana. Doctor en Ciencias Naturales. Codirectora: Sandra Milena Sanabria Barrera. Doctora en Ciencias Biomédicas.

Abstract

Title: Identification of metabolic profiles of tumor B-Cells Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) related to biological and clinical variables of the disease**

Author(s): Karen Lizeth Pachón Meza, José Arturo Gutiérrez Triana, Sandra Milena Sanabria Barrera

Key Words: B-ALL; Cancer; Phosphorylative oxidation; Glycolysis; Metabolic Potential; GeneExpression.

Description: B-Cell Acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is a cancer originating in the bone marrow characterized by uncontrolled growth of B-cell precursors due to genetic, metabolic, and functional changes. In Colombia, the epidemiological data on this disease is concerning, as it has the third highest annual incidence rate and lower survival rates compared to other countries in the region. However, there is a lack of studies linking the poor prognosis in Colombia to the biology of the disease.

With this in mind, the objective of this study was to identify and describe metabolic profiles associated with biological and clinical variables in B-ALL patients in the metropolitan area of Bucaramanga. The study involved conducting oxidative and glycolytic metabolism tests on isolated tumor lymphoblasts using the Seahorse XFe24 Analyzer, evaluating the expression of the poor prognostic gene signature *ID1/ID3/IGJ*, and reviewing the clinical history of 33 patients included in the study.

The findings indicate that tumor lymphoblasts exhibit lower energy activity compared to the reference B-ALL cell line NALM-6. Additionally, the malignant cells can be categorized into two groups: those with potential for oxidative metabolism (*OCR*) and those with potential for glycolytic metabolism (*ECAR*). Furthermore, increased expression of the *IGJ* gene is significantly associated with higher *ECAR* potential and reduced Event Free Survival (*EFS*) in B-ALL patients.

*Degree work

** Faculty of Health. School of Microbiology. Master in Microbiology. Director: José Arturo Gutiérrez Triana. Doctor in Natural Sciences. Co-director: Sandra Milena Sanabria Barrera. Doctor in Biomedical Sciences.

Introducción

La LLA-B es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación e inmortalización de las células B inmaduras que afecta tanto a niños como a adultos (Brunner, 2003). Colombia es uno de los países con mayor reporte de nuevos casos anuales de leucemia en el mundo, y los datos epidemiológicos de morbilidad y mortalidad son mayores con respecto no solo a países de muy alto desarrollo, sino también con respecto a países con el mismo índice de desarrollo humano (*HDI*, por sus siglas en inglés *Human Development Index*) (Miranda-Filho et al., 2018).

La reprogramación metabólica de las células tumorales se considera hoy en día como uno de los 14 marcadores distintivos del cáncer (Figura 1) (Hanahan & Weinberg, 2011). Diversos estudios han identificado alteraciones significativas del metabolismo durante la tumorigénesis y la metástasis, que pueden ser consecuencia de cambios a nivel genético (mutación) y/o por la perturbación de mecanismo regulatorios particulares de la fisiología celular. Los efectos de estas alteraciones se pueden revelar en sitios específicos de la célula, como por ejemplo la mitocondria, en la cual se presentan procesos bioquímicos relacionados al metabolismo bioenergético, la proliferación celular y la apoptosis (Andersen & Kornbluth, 2013; Solit & Mellinghoff, 2010).

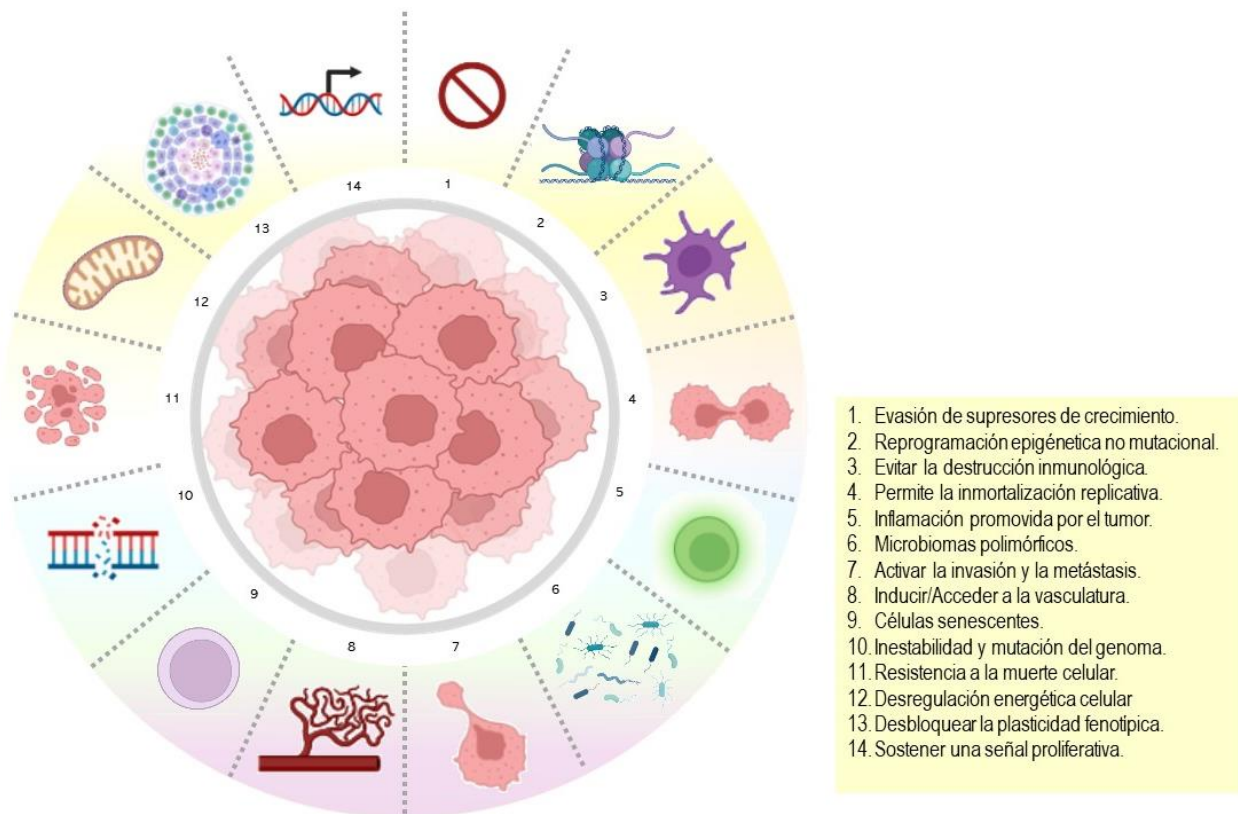
De manera interesante, en estudios realizados en nuestra línea de investigación se identificó la firma de expresión génica *ID1/ID3/IGJ* asociada a mal pronóstico en la población adulta colombiana (Cruz-Rodríguez et al., 2016). Adicionalmente, estudios preliminares que evaluaron la función glucolítica en un modelo celular de LLA-B cuya firma génica de mal pronóstico *ID1/ID3/IGJ* fue artificialmente sobreexpresada, mostraron una disminución significativa de la capacidad y reserva glucolítica con respecto a las células control. Estos

resultados sugieren que la reprogramación metabólica subyace al fenotipo de resistencia al tratamiento y el desenlace de los pacientes con LLA-B.

Lo anterior, nos ha llevado a plantearnos si los linfoblastos tumorales de los pacientes con LLA-B presentan perfiles metabólicos distintivos que puedan relacionarse con variables clínicas y biológicas particulares. Estos resultados permitirán a su vez explicar los determinantes biológicos del mal comportamiento de la enfermedad en la población colombiana al identificar y describir las características clínicas, metabólicas y genéticas de los linfoblastos tumorales que puedan estar involucrados en el origen patológico, la evolución y el pronóstico de la LLA-B.

Figura 1.

Sellos distintivos del cáncer.



Nota. Adaptado de (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

1. Planteamiento del problema

El cáncer es una enfermedad que persiste sin distinciones económicas, sociales y culturales (Ferlay et al., 2015). Un tipo importante de cáncer son las leucemias, que comprenden un grupo heterogéneo de desórdenes hematopoyéticos y se encuentran entre los tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en el mundo (Brunning, 2003). En el caso particular de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), se reporta que Colombia junto a Ecuador y Costa Rica tienen las tasas de incidencia más altas de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) a nivel mundial (Fidler et al., 2017; Miranda-Filho et al., 2018).

La LLA es la neoplasia más común en menores de 14 años (Nguyen et al., 2008), y en este grupo de edad presenta una tasa de Supervivencia Global (SG) mayor al 90% a cinco años (Pui et al., 2018); sin embargo, la SG en Colombia es del 53,8% en niños (Pui et al., 2018). En adultos, la frecuencia de la enfermedad es menor; no obstante, las ocurrentes recaídas hacen que las tasas de recuperación sean menores que en población pediátrica (Paul et al., 2016). Además, se ha descrito que los subtipos de neoplasias hematológicas como la LLA-B tienen una baja tasa de supervivencia en adultos jóvenes que han presentado recaídas y se les ha suministrado terapia de rescate, los cuales presentan una mediana de SG de 5,8 meses (Gokbuget et al., 2016).

Por lo anterior, podemos decir que el estudio de LLA en Colombia es foco de interés en salud pública, ya que la población colombiana muestra mayor susceptibilidad a la enfermedad (Miranda-Filho et al., 2018), lo que implica muertes tempranas y conlleva a la disminución de la productividad socioeconómica en adultos jóvenes (Vera et al., 2012).

Sin embargo, a pesar de la preocupación que genera la incidencia de la enfermedad en Colombia, no se cuenta con estudios suficientes que relacionen las altas tasas de morbilidad y

mortalidad con las características genéticas, metabólicas, celulares y clínicas propias de los pacientes colombianos, lo que impacta negativamente en la toma de decisiones para elegir el tratamiento quimioterapéutico adecuado por parte del personal médico.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación identificaron un perfil génico de mal pronóstico constituido por tres genes: *ID1/ID3/IGJ*. El nivel de expresión de estos genes es significativamente mayor en los pacientes no respondedores al tratamiento quimioterapéutico de inducción comparado con los respondedores (Figura 2) (Cruz-Rodríguez et al., 2016). Diferentes reportes revelan que estos genes están involucrados en la regulación de procesos celulares como la diferenciación, la supervivencia y la autorrenovación de células tumorales (Ying et al., 2003).

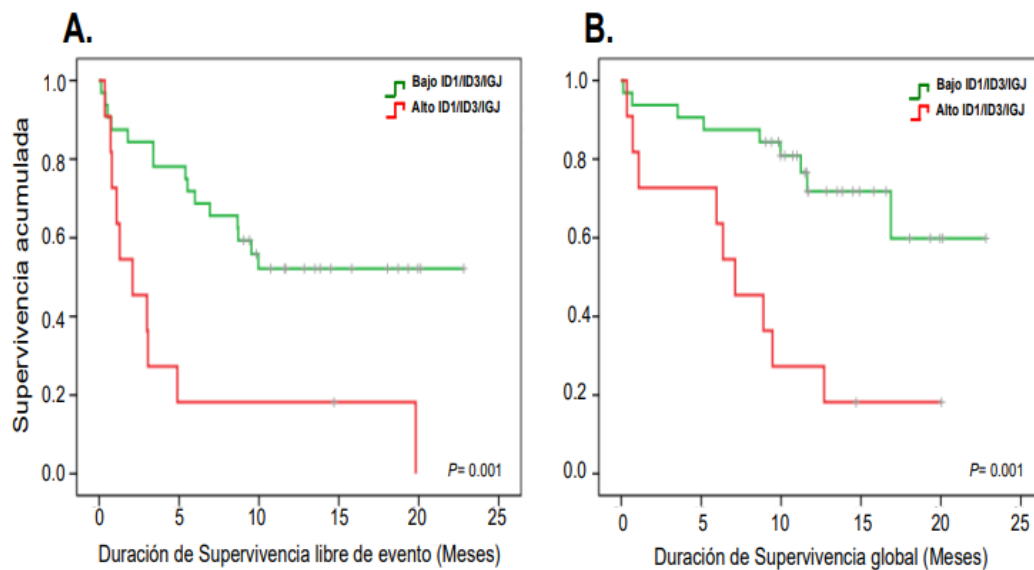
Adicionalmente, se evidenció que la firma de expresión génica *ID1/ID3/IGJ* tiene mejor impacto pronóstico independiente con respecto a otros parámetros clínicos y moleculares utilizados actualmente en la clínica como la edad, el recuento de leucocitos o la translocación *BCR-ABL* (Cruz-Rodríguez et al., 2016, 2017).

Del mismo modo, se realizó un ensayo de enriquecimiento de redes para identificar las actividades celulares que podrían estar alteradas por la sobreexpresión transitoria de *ID1/ID3/IGJ* en la línea celular NALM-6. De este estudio, se observó que los genes más afectados por la firma estaban involucrados en procesos metabólicos tales como la glucólisis, la fosforilación oxidativa (OXPHOS, por sus siglas en inglés, *Oxidative Phosphorylation*) y la síntesis de ácidos grasos.

Figura 2.

La firma de expresión ID1/ID3/IGJ está asociada con menor supervivencia global y libre de eventos en pacientes colombianos.

Curvas de supervivencia de Kaplan Meier. Supervivencia libre de eventos (A) y supervivencia global (B) de los pacientes con baja expresión simultánea de ID1/ID3/IGJ (línea verde) vs. Pacientes con alta expresión simultánea de ID1/ID3/IGJ (línea roja).



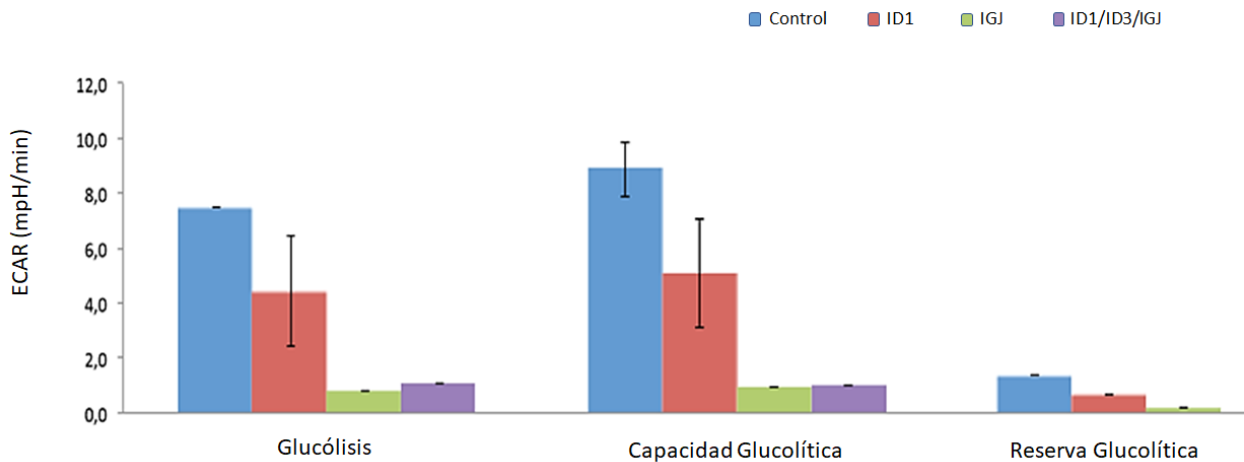
Nota: Tomado de: (Cruz-Rodríguez et al., 2016).

Teniendo en cuenta esta información, se realizaron ensayos de la función glucolítica en la línea celular de LLA-B NALM-6 con sobreexpresión de la firma génica *ID1/ID3/IGJ*, y se evidenció que la tasa de acidificación extracelular (*ECAR*, por sus siglas en inglés *Extracellular Acidification Rate*) se encontraba alterada a la baja con respecto al control, lo cual sugiere que estos genes pueden modular la función metabólica de las células leucémicas para conferir un fenotipo asociado a la resistencia frente al tratamiento quimioterapéutico (Datos no publicados) (Figura 3).

Figura 3.

La expresión de la firma génica ID1/ID3/IGJ está asociada con menor actividad glucolítica.

Actividad glucolítica de los genes ID1, ID3 e IGJ. Representación gráfica de los valores ECAR calculados para la glucólisis, la capacidad y la reserva glucolíticas en células NALM-6. Control: células NALM-6 sin inducción de expresión génica; células NALM-6 con sobreexpresión inducida del gen ID1; células NALM-6 con sobreexpresión inducida del gen IGJ; células NALM-6 con sobreexpresión inducida de los genes ID1, ID3 e IGJ.



Nota: Tomado de Archivo de Nataly Cruz Rodríguez.

Estos resultados, concuerdan con el hecho de que la reprogramación metabólica de las células tumorales se considera hoy en día como uno de los 14 marcadores moleculares del cáncer (3). Estudios iniciales al respecto realizados por Otto Warburg, demostraron que las células tumorales tienen un metabolismo particular caracterizado por obtener energía preferiblemente por glucólisis, incluso en presencia de oxígeno (Warburg, 1956). Posteriormente a Warburg, se encontró que el metabolismo cambia significativamente, y que muestra una plasticidad metabólica según los requerimientos celulares (Cairns et al., 2011). Lo anterior, nos abre el camino para profundizar en nuevos estudios que permitan dilucidar si los linfoblastos tumorales son capaces de

modular su metabolismo energético hacia un perfil metabólico particular para adaptarse a microambientes hostiles y poder evadir la muerte celular (Green, 2004; Wallace, 2012). Para ello, planteamos a continuación la evaluación de la función mitocondrial y la función glucolítica en linfoblastos tumorales de muestras primarias de pacientes diagnosticados con LLA-B asociados a variables clínicas y moleculares que nos permitan describir perfiles metabólicos asociados a estas.

Nuestro estudio se enfoca en la descripción de los perfiles metabólicos de linfoblastos tumorales LLA-B de pacientes colombianos, de tal manera que podamos extraer información que permita revelar los principios comunes sobre el origen, la evolución y la resistencia al tratamiento de esta patología, y por consiguiente, puede apoyar a los especialistas en la toma de decisiones sobre las nuevas alternativas en la selección de un tratamiento quimioterapéutico personalizado, de acuerdo con las condiciones biológicas de cada paciente, lo que impactaría de manera positiva en la respuesta al tratamiento, y en la remisión clínica. Para ello, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Existen perfiles metabólicos particulares de las células tumorales de pacientes con LLA-B que se asocian con variables biológicas y clínicas de la enfermedad?

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Identificar y describir perfiles de metabolismo energético asociado con variables biológicas y clínicas de LLA-B.

2.2 Objetivos Específicos

Describir el comportamiento metabólico de blastos tumorales de médula ósea de pacientes con LLA-B.

Determinar perfiles metabólicos de acuerdo con variables biológicas y clínicas de la enfermedad.

Establecer la relación entre el tipo de metabolismo energético de células de LLA-B con los perfiles transcripcionales de la firma génica de mal pronóstico *ID1*, *ID3* e *IGJ*.

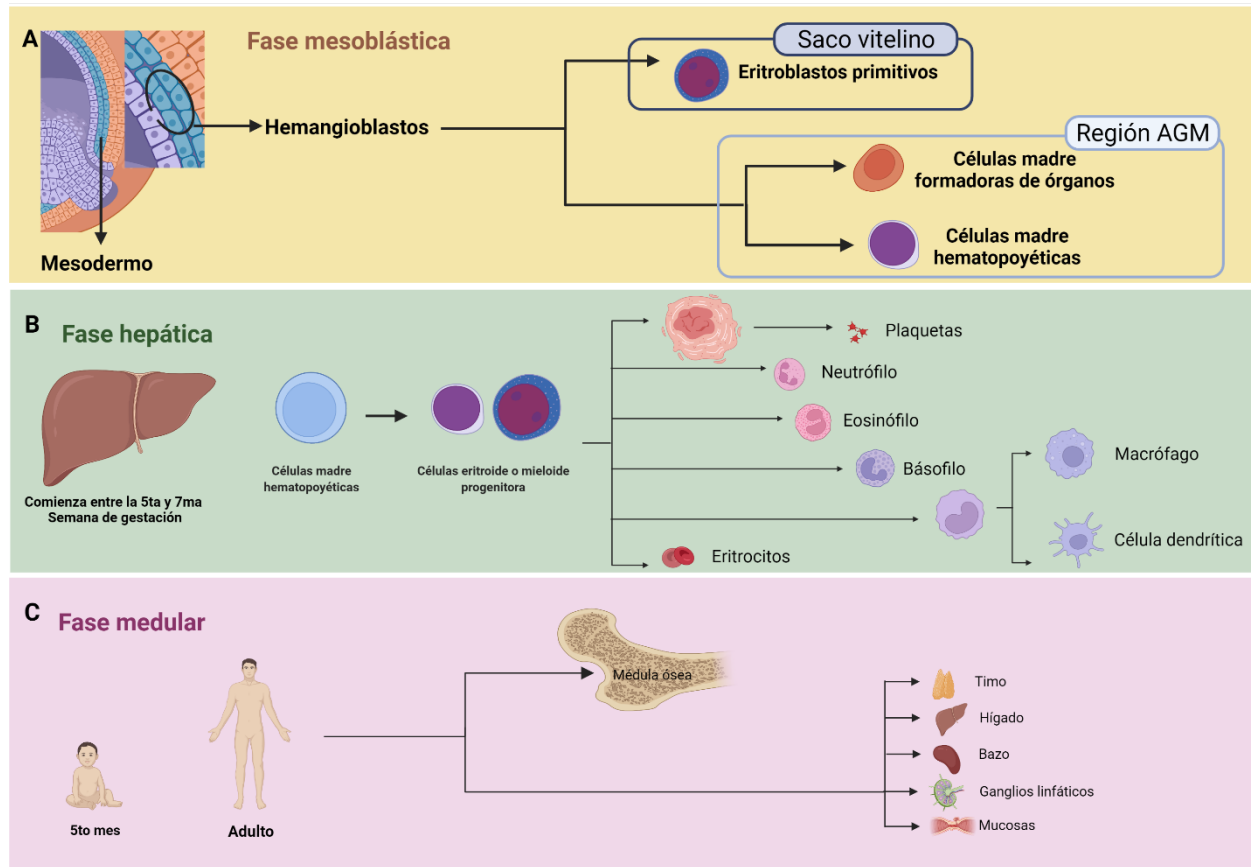
3. Marco referencial

3.1 Descripción del proceso hematopoyético

La hematopoyesis es el proceso de desarrollo que da origen a las células sanguíneas (Mirza, 2020; Tavian et al., 2010). El desarrollo hematopoyético consta de tres fases principalmente; la primera, es la fase mesoblástica, que toma su nombre por la capa embrionaria mesodermo, y es el lugar de donde provienen las células sanguíneas y las células endoteliales (Tavian et al., 2010). A su vez, la fase mesoblástica tiene dos momentos para generar los precursores hematopoyéticos; inicialmente, las células progenitoras llamadas hemangioblastos migran del mesodermo al saco

vitelino y dan origen a los eritroblastos primitivos, con el fin de producir células eritroides que puedan cubrir la demanda de disponibilidad de oxígeno necesaria para el desarrollo del embrión (Mirza, 2020; Rossmann et al., 2018). Posteriormente, las células del mesodermo migran a la región Aorta-Gónada-Mesonefros (AGM) en la que se desarrollan las células madre formadoras de órganos y las células madre hematopoyéticas (CMH) (Figura 4.A) (Ivanovs et al., 2011).

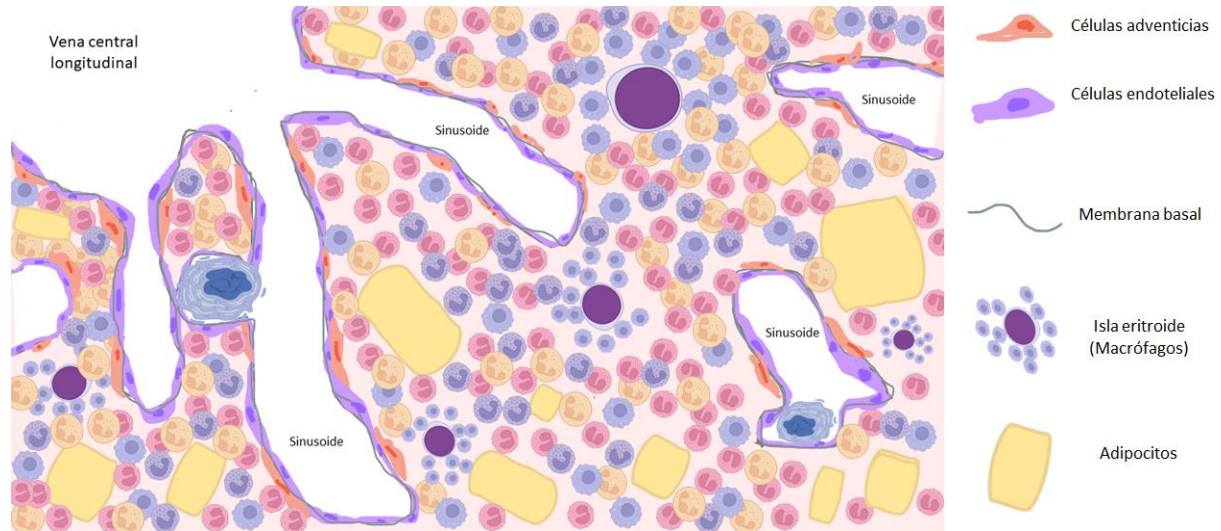
En segunda instancia, la fase hepática ocurre sobre la quinta y séptima semana de gestación, y se encarga de llevar los procesos de eritropoyesis y granulopoyesis principalmente en el hígado, esta etapa se caracteriza por aumentar la hematopoyesis definitiva y disminuir la hematopoyesis primitiva (Figura 4.B) (Mirza, 2020; Palis & Segel, 2016). A partir del quinto mes de gestación, se genera la fase medular, que convierte a la médula ósea en el sitio primario de la hematopoyesis la cual se mantiene hasta la edad adulta (Figura 4.C) (Koury & Lichtman, 2010). Adicional a la médula ósea, hay tejidos hematopoyéticos periféricos que cumplen funciones específicas de desarrollo, diferenciación y especialización de las células sanguíneas, como lo son el timo, el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos y el tejido linfoide asociado a mucosas (Mirza, 2020).

Figura 4.*Fases de la hematopoyesis.**(A). Fase mesoblástica. (B). Fase Hepática (C). Fase medular.**Nota:* Adaptado de (Mirza, 2020).**3.2 Estructura del nicho hematopoyético y su función en el microambiente de la médula ósea**

La arquitectura de la médula ósea es fundamental para el correcto funcionamiento del proceso hematopoyético (Lucas et al., 2020). La médula contiene un soporte óseo con proyecciones que se dirigen desde el exterior al interior, las cuales son llamadas trabéculas y dan forma de hoja de helecho (Mirza, 2020). A su vez, dichas proyecciones limitan con arterias nutritivas y sinusoides venosos, que son revestidas por células endoteliales y células adventicias, que tienen la función principal de nutrir y contener en su interior la médula roja (células

hematopoyéticas en diferentes estadios) y la médula amarilla (células adiposas) (Mirza, 2020; Rossmann et al., 2018). A medida que se avanza en edad, se disminuye la proporción de médula roja en relación con la médula amarilla; sin embargo, por requerimientos específicos del organismo, como lo pueden ser los traumatismos, las infecciones o los procesos patológicos como las neoplasias, la médula roja se puede reactivar con el fin de suplir la demanda celular (Koury & Lichtman, 2010).

Por su parte, la médula ósea roja ha mostrado regiones en las cuales se organizan diferentes nichos de células estromales que estimulan el desarrollo de las células sanguíneas a través de la producción e interacción de moléculas como las citoquinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento celular que regulan la autorrenovación y la diferenciación celular (Wei & Frenette, 2018). A pesar de presentar heterogeneidad celular, se han descrito cinco regiones principales en la médula ósea con funciones específicas para los procesos hematopoyéticos: la arteriolar, la sinusoidal, la endóstica, la subendosteal y la no vascular (Baccin et al., 2020). Por ejemplo, se ha distinguido que los precursores megacariocíticos suelen ubicarse cerca a los espacios del endostio y los sinusoides con el fin de enviar plaquetas directamente al torrente sanguíneo (Koury & Lichtman, 2010; Lucas, 2021). Asimismo, se ha encontrado que los precursores eritroides tienden a estar rodeados de macrófagos, quienes proveen los factores de diferenciación necesarios para la maduración eritroide (Lucas, 2021). Además, quizás los más estudiados, son los nichos de las CMH, los cuales se identificaron cerca a los sinusoides y megacariocitos, también, hay un pequeño grupo que se localiza cerca de las arteriolas, y un grupo aún más pequeño que se encuentra cerca del endostio (Figura 5) (Lucas et al., 2020; Wei & Frenette, 2018).

Figura 5.*Arquitectura del nicho hematopoyético.*

Nota: Adaptado de (Mirza, 2020).

Adicionalmente se pueden describir dos regiones, de las cuales diferentes estudios han descrito tanto su estroma celular como la importancia de su microambiente para generar nichos con funciones específicas, por medio de los diferentes mecanismos de comunicación establecidos como lo son el componente humoral, la interacción con la matriz extracelular y el contacto directo de célula a célula (Mayani et al., 2007).

El primero hace referencia al nicho osteoblástico o nicho endostal, que es una región de la médula ósea cercano a las trabéculas, en la cual predominan células de origen mesenquimal como los osteoblastos, los fibroblastos y los adipocitos (Mayani et al., 2007). Los osteoblastos suelen expresar altas cantidades de la quimiocina CXCL12, la cual es el ligando del receptor CXCR4 expresado por las CMH (Ehninger & Trumpp, 2011; Miller et al., 2018). Dicha interacción ligando-receptor es de importancia ya que permite el secuestro de las CMH por parte de los osteoblastos en esta área de la médula ósea y le confiere características especiales a las CMH de

largo término tales como el aumento de la capacidad de autorrenovación, además de la disminución de los procesos de diferenciación y proliferación (Ehninger & Trumpp, 2011). Por esto, se dice que dichas células se encuentran en quiescencia al mantener un estado G_0 o G_1 del ciclo celular, lo que da lugar, al compendio de células requeridas para el mantenimiento y la producción de las células hematopoyéticas en la médula ósea (Sugiyama et al., 2006).

Adicionalmente, también se ha generado información acerca del nicho vascular, el cual como su nombre lo indica, es un área cercana a los sinusoides vasculares (Ehninger & Trumpp, 2011). Este nicho consta de células endoteliales y macrófagos que interactúan con CMH activas, que se encuentran en contacto con diferentes interleucinas y factores de crecimiento disponibles en el microambiente, lo que resulta en la diferenciación y proliferación de las CMH (Ehninger & Trumpp, 2011). Finalmente, las células diferenciadas se dirigen al torrente sanguíneo para entrar en funcionamiento, o en el caso de los linfocitos que migran a órganos del sistema hematopoyético periférico, para especializarse y activarse con el fin de ser competentes en sus funciones inmunológicas (Paraskevas, 2013; Sugiyama et al., 2006).

En síntesis, la médula ósea lleva a cabo diferentes procesos complejos que comprenden la interacción y la retroalimentación del microambiente hematopoyético, a través de una comunicación equilibrada, tanto por el componente humoral como por el celular, que le brinda al sistema hematopoyético la homeostasis necesaria para el funcionamiento adecuado en el organismo (Cosgrove et al., 2021; Mirza, 2020; Rossmann et al., 2018). Todo esto permite que el sistema hematopoyético tenga la capacidad de generar las células y los componentes plasmáticos necesarios, hasta alcanzar entre el 7 - 8% del volumen corporal del cuerpo humano (Mirza, 2020). De manera interesante, estudios recientes han calculado que los humanos tienen entre $2,5 \times 10^4$ a

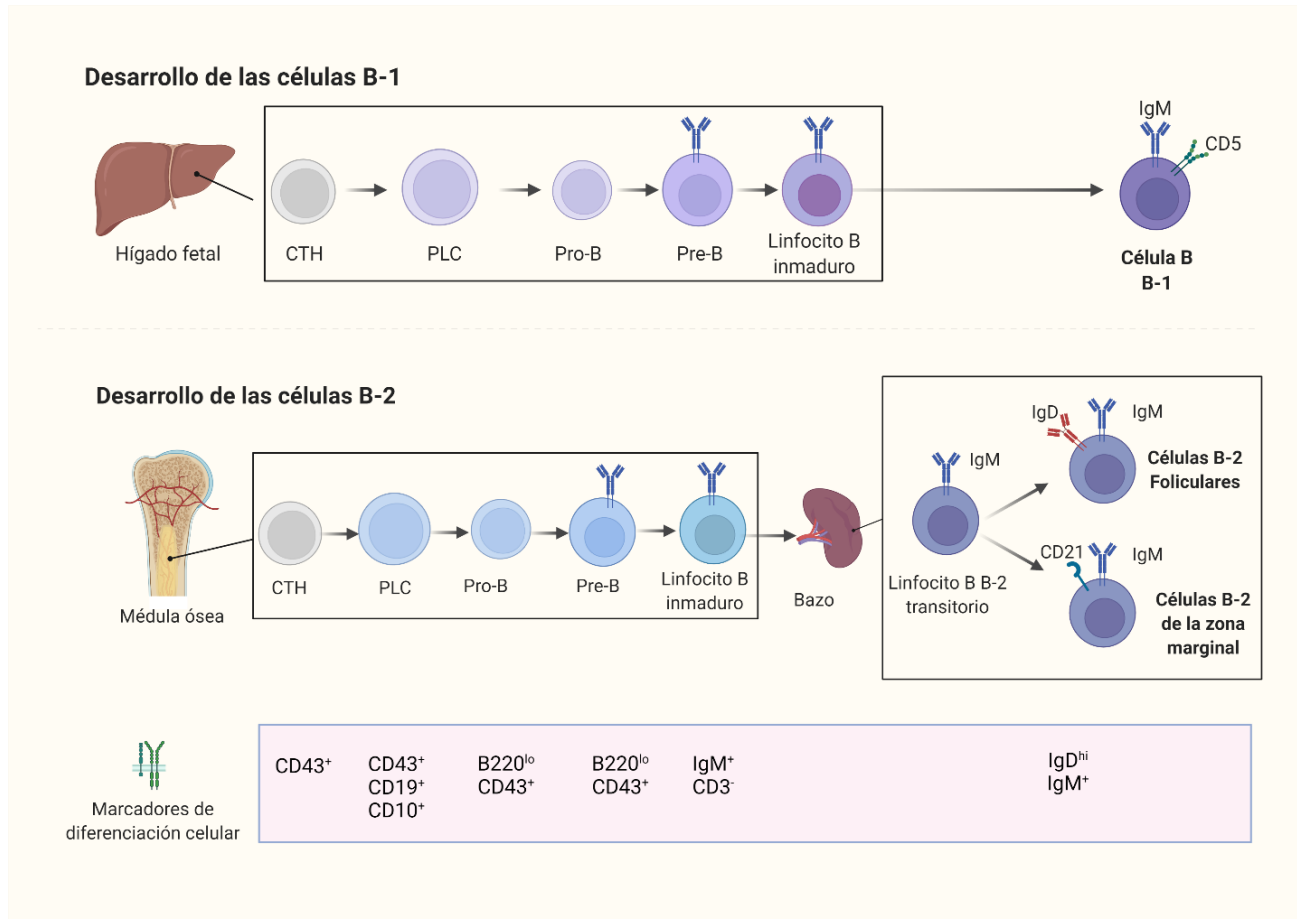
$1,3 \times 10^6$ CMH que dan lugar alrededor de 10^{13} células hematopoyéticas diferenciadas (Cosgrove et al., 2021).

3.3 Desarrollo de las células B

Los linfocitos B son células que forman parte de la inmunidad adaptativa, y tienen la función principal de producir anticuerpos; de los cuales se conocen tres tipos: los linfocitos foliculares, los linfocitos de la zona marginal y los linfocitos B B-1. (Montecino-Rodríguez & Dorshkind, 2012). Este proceso tiene dos orígenes de desarrollo: el primero ocurre en el hígado fetal, del cual se obtienen linfocitos B B-1, y el segundo con origen en la médula ósea que se da después del nacimiento (Montecino-Rodríguez & Dorshkind, 2012; Quách et al., 2016).

La maduración de los linfocitos B comienza a través de las Células Troncales Hematopoyéticas (CTH) que se diferencian en Progenitores Linfocitarios Comunes (PLC), que a su vez desarrollan un estadio de Células Pro-B, que derivan en células Pre-linfocitarias, y finalmente se diferencian en linfocitos B inmaduros antes de llegar a su madurez. Además, cabe señalar que, cada una de estas etapas que atraviesa el linfocito B despliegan marcadores o antígenos de diferenciación (*CD*, *Cluster of differentiation*) en la superficie celular (Figura 6) (Bendall et al., 2014; Dorshkind & Montecino-Rodríguez, 2007).

El desarrollo de los linfocitos inicia por las señales recibidas en la superficie celular, las cuales son captadas por los receptores de membrana, y tienen como objetivo promover la proliferación de las células progenitoras, y comenzar el reordenamiento génico del receptor de antígeno; este último, es requerido para alcanzar un estado de desarrollo completo de la célula B (Abbas AK, Lichtman AH, 2021).

Figura 6.*Desarrollo de los linfocitos B.*

Nota. Adaptado de (Montecino-Rodríguez & Dorshkind, 2012) y (Quách et al., 2016).

En consecuencia, los linfocitos B sufren un aumento de la proliferación que es inducida por la respuesta a factores de crecimiento y citocinas como la IL-7 (Clark et al., 2014). En términos moleculares, la diferenciación se encuentra dirigida por el acceso a la cromatina y los reguladores transcripcionales como EBF, E2A y PAX5, que median inicialmente sobre las proteínas involucradas en el reordenamiento genético (Kreslavsky et al., 2018; Lin et al., 2018). En el transcurso de su desarrollo, aquellos linfocitos B cuyos receptores reconocen fuertemente

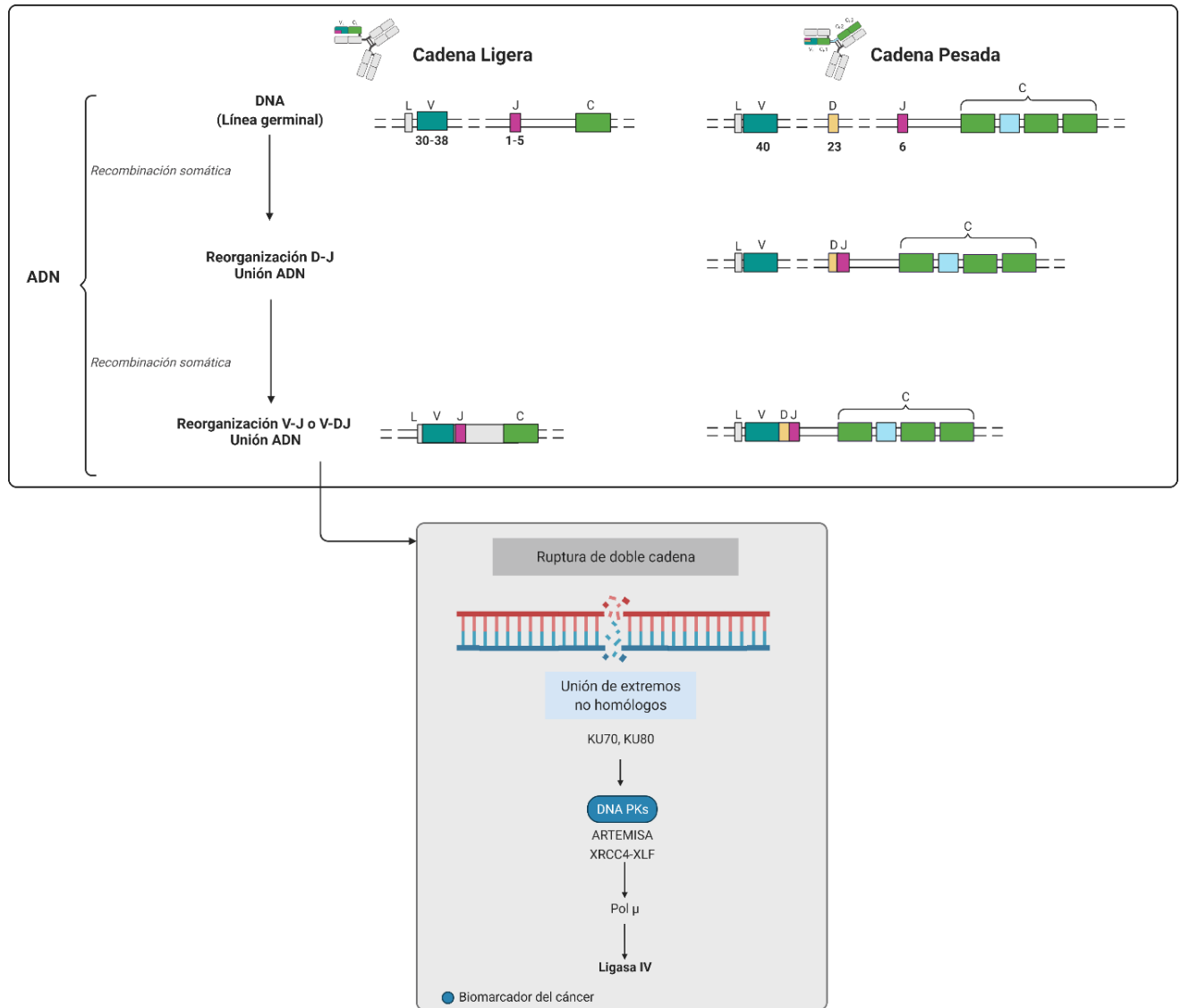
antígenos propios son eliminados mediante un proceso de selección riguroso (H. Chen et al., 2020; Dreyer & Bennett, 1965).

El mecanismo de recombinación V(D)J que realizan los linfocitos B para alcanzar un receptor antigénico completo y maduro, implica (i) la sinapsis de los dos segmentos que codifican, (ii) la escisión por parte de la enzima VDJ recombinasa, la cual es conformada por RAG1 y RAG2; (iii) la apertura de la horquilla en los extremos por parte de la enzima endonucleasa ARTEMISA, y la adición de nucleótidos en los extremos rotos por parte de la enzima desoxi-nucleotidilo transferasa terminal (*TdT*, *Terminal desoxynucleotidyl transferase*) (Carmona & Schatz, 2017; Schatz et al., 2008). Finalmente, (iv) ocurre el proceso de unión de los extremos no homólogos a través de XRCC4 y la enzima ADN-ligasa IV (Figura. 7) (Carmona & Schatz, 2017; Schatz et al., 2008).

La reorganización V(D)J es importante para cumplir con las funciones principales en la expresión del repertorio para el reconocimiento antigénico, que se caracteriza por la diversidad combinatoria que genera diferentes sitios de unión al antígeno, dando lugar entre 1 a 3 millones de posibles combinaciones; así mismo, se caracteriza por la diversidad de unión, ya que se añaden o se eliminan nucleótidos entre las diversas uniones de los segmentos (Chi et al., 2020; Tonegawa et al., 1974).

Figura 7.

Mecanismo de recombinación V(D)J. Reparación no homóloga del ADN.



Nota. Adaptado de (Barton., 2022) y (Morgan & Lawrence, 2015).

3.4 Origen de las leucemias

El origen de las leucemias fue descrito por Bennett y Virchow en 1845 cuando notaron un aumento de leucocitos en el momento de estudiar los cuerpos de pacientes fallecidos con patologías crónicas de hasta dos años (Bennett, 1980; R, 1847).

Actualmente, se describen a las neoplasias hematológicas como un grupo de enfermedades asociadas al aumento descontrolado de los clones de diferentes linajes celulares como resultado de diversos factores que incluyen las mutaciones genéticas (Coombs et al., 2017; S. J. Park & Bejar, 2020; Zink et al., 2017). Este tipo de células tienen la capacidad de reemplazar una médula ósea normal, modificar la función medular, e incluso migrar a sitios extramedulares. Esta última es una particularidad innata de las leucemias que son de naturaleza líquida en relación con otros tipos de cánceres sólidos que requieren de la acumulación de diferentes anomalías biológicas para realizar metástasis (Whiteley et al., 2021).

Asimismo, se ha descrito que las células tumorales leucémicas tienen una heterogeneidad significativa debido a la adquisición de mutaciones que definen los clones de las células hijas a medida que aumentan las generaciones, a este proceso se le conoce como evolución subclonal (Miles et al., 2020; Whiteley et al., 2021). De los subclones de las CMH, es posible que se originen células con la capacidad de resistir a los tratamientos antitumorales, provocando recaídas de la enfermedad y ocasionando el fallecimiento de los pacientes (Ye et al., 2016b).

Por otro lado, se conoce que el origen del linaje celular y la progresión de la enfermedad determinan los diferentes tipos de leucemias, de los cuales se deducen cuatro tipos principales, aquellas de linaje mieloide o linfoide, que pueden ser tanto de evolución clínica aguda o crónica (Whiteley et al., 2021).

Las leucemias crónicas son originadas a partir de células diferenciadas o parcialmente maduras, que no cumplen sus funciones celulares, y lentamente van desplazando a las células normales, por lo que es frecuente encontrar una población mixta entre células funcionales y células no competentes (células tumorales) para el control de las infecciones. Ejemplo de este tipo de leucemias son la Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) y la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) que tienen un tiempo más prolongado para desarrollar la patología, que de no controlarse puede convertirse en una leucemia aguda (L. I. Shlush & Feldman, 2021; Weijie, 2022; Whiteley et al., 2021).

Las leucemias agudas como la Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) o la Leucemia Mieloide Aguda (LMA) se caracterizan por un rápido desarrollo de la enfermedad, y por presentar alteraciones en células inmaduras o poco diferenciadas que no cumplen con las funciones normales, además estas células se adaptan al entorno de la médula ósea de tal manera que son capaces de reemplazar la población de células normales, y se presenta tanto en niños como en adultos (L. I. Shlush & Feldman, 2021; Whiteley et al., 2021).

En este caso particular, nuestros estudios se centrarán en la Leucemia Linfocítica Aguda de precursores B, que tiene como características fisiopatológicas la presencia de pancitopenia, síntomas recurrentes como fatiga, fiebre, hemorragias, linfadenopatía, esplenomegalia, hepatomegalia, dolor óseo, infiltración de células tumorales en el Sistema Nervioso Central (SNC), entre otras (Chennamadhavuni et al., 2022).

3.5 Características y estratificación del riesgo de la LLA-B

La LLA-B es una enfermedad multifactorial que confiere diversas características a las células tumorales y que son utilizadas para la evaluación de la estratificación del riesgo de los pacientes en el momento del diagnóstico (Whiteley et al., 2021). Algunas de las características de

los linfoblastos que han sido descritas previamente es que proceden de una CMH de linaje linfoide, por lo que heredan la capacidad para autorrenovarse, realizar proliferación no controlada, y mantener un metabolismo en dormancia (Morganti et al., 2022; L. I. Shlush & Feldman, 2021). Adicionalmente, los linfoblastos tumorales de la LLA-B presentan un inmunofenotipo que puede ser homogéneo o heterogéneo dependiendo de cada paciente, lo que conlleva a diferentes tipos de LLA-B según los criterios de clasificación del grupo EGIL (*European Group for the Immunological Classification of Acute Leukemias*), los cuales son descritos en la Tabla 1 (Bene et al., 1995).

Tabla 1.

Clasificación inmunofenotípica de la LLA-B.

Subtipo	Características fenotípicas
Pro-B (B I)	CD19+, CyCD79+ o CD22+, CD10-, CyIgμ-, sIgM- (o todas)
Común (B II)	CD10+, CyIgμ-, sIgM
Pre-B (B III)	CyIgμ+, sIgM
B (IV)	sIgM

Adicionalmente, se tienen en cuenta cualidades biológicas como la edad, el recuento de leucocitos en el momento de diagnóstico mayor a 30.000 células/uL, la infiltración del SNC, las características genotípicas del paciente, y la respuesta al tratamiento de inducción (Paul et al., 2016; Rowe, 2010) .

En los niños, la enfermedad mínima residual (EMR) del día quince en el tratamiento de inducción es uno de los factores pronósticos más importantes, así como la EMR al día 30 en población adulta, y establece que la presencia de células tumorales menor al 0,01% es favorable para la respuesta al tratamiento (Souza Silva et al., 2019). Adicionalmente, en un estudio realizado

en población adulta colombiana se evidenció la importancia de la Remisión Completa (RC) como factor de protección a futuras recaídas de la enfermedad (Quách et al., 2016).

De igual forma, se han descrito alteraciones genéticas asociadas a mal pronóstico en LLA-B como: la translocación Robertsoniana constitucional, la hipodiploidía menor a 44 cromosomas (2-3%), la translocación *BCR-ABL1* (2-4%), el reordenamiento *Pax5* (~2%) o la presencia del cromosoma Filadelfia (10-15%) (Hunger & Mullighan, 2015; Mullighan et al., 2008a). Notablemente, se ha demostrado que el reordenamiento cromosómico está relacionado con factores de transcripción hematopoyéticos de linaje B como *IKZF1* (Virely et al., 2010), modificadores epigenéticos como *EZH2* y *SETD2*, y receptores citosina y tirosina quinasa como *JAK2* y *CRLF2* (Mullighan et al., 2007; J. Zhang et al., 2011). Estas alteraciones genéticas conllevan a alteraciones en los productos proteicos y a la regulación negativa de la diferenciación celular (Harrison, 2009; Hunger & Mullighan, 2015). Adicionalmente, síndromes congénitos como el síndrome de Down, y la exposición a factores medioambientales como pesticidas, radiación ionizante o infecciones pueden ser detonantes de la enfermedad (Malard & Mohty, 2020).

En nuestro grupo de investigación se identificó una firma génica de mal pronóstico *ID1/ID3/IGJ* en pacientes adultos diagnosticados con LLA-B relacionada con la resistencia al tratamiento, y se observó que dicha firma de expresión génica es una variable que permite realizar una mejor asignación del pronóstico con respecto a otros factores empleados actualmente en la rutina clínica, como son la edad, el recuento leucocitario y la presencia del cromosoma Filadelfia (Cruz-Rodríguez et al., 2017).

En consecuencia, la estratificación de riesgo del paciente permite al personal médico tomar decisiones en la asignación del tratamiento a seguir, los cuales se encuentran ajustados a

lineamientos internacionales; asimismo, se ha demostrado que el manejo adecuado del protocolo es vital en la evolución de la enfermedad (Nieto Gutiérrez et al., 2021). Por ejemplo, uno de los protocolos sugeridos para niños menores de 14 años y adultos jóvenes menores de 35 años es el *Berlín-Frankfurt-Münster Intercontinental 2009 (ALL IC-BFM 2009)*, el cual demostró una supervivencia del 82% en Latinoamérica, y es una actualización del *ALL IC-BFM 2002* (Myriam Campbell, 2009). Este protocolo, permite a los especialistas desde el momento del diagnóstico y bajo criterios clínicos determinar el riesgo del paciente en estándar, intermedio o alto (Myriam Campbell, 2009), así como, la re-estratificación del riesgo en el transcurso del tratamiento, de acuerdo con la valoración de la EMR (Hunger & Mullighan, 2015; Stary et al., 2014).

Por otro lado, en los adultos mayores de 36 años es común utilizar el protocolo del Programa Español para el Tratamiento de las Hemopatías Malignas (PETHEMA) con código de protocolo LAL-19, el cual también define la estratificación y valoración de la enfermedad de acuerdo con la EMR presentada por el paciente (HEMOTERAPIA, 2013; Larson et al., 1998). Adicionalmente, a los pacientes con cromosoma Filadelfia positivo, se les realiza un ajuste en el tratamiento con respecto a los inhibidores de tirosin quinasa (Sancho et al., 2007; Trias, 2013).

3.6 Metabolismo del cáncer

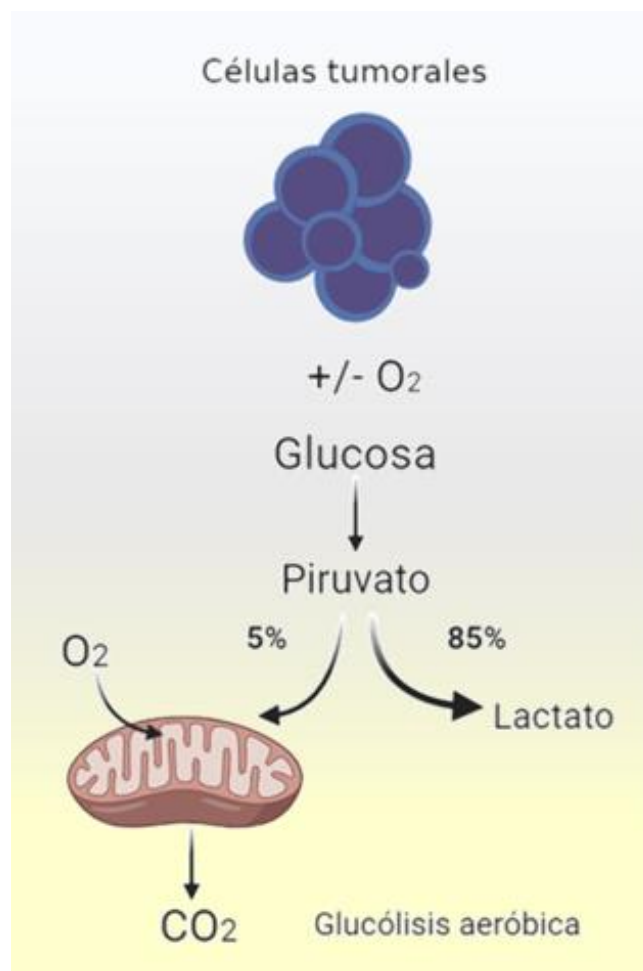
El metabolismo es un conjunto de procesos que realizan las células con el objetivo de generar energía y biomasa, a través de diferentes tipos de reacciones químicas, que van a permitir el funcionamiento jerárquico de órganos, sistemas y organismos para mantener la vida (Judge & Dodd, 2020).

Otto Warburg describió lo que sería un metabolismo diferencial de las células tumorales con respecto a las células normales, y es precisamente que estas células se caracterizan por presentar un metabolismo glucolítico aeróbico (en presencia de oxígeno) en vez de tener un

metabolismo oxidativo (Figura.8) (Warburg, 1956). Estudios posteriores, reconocieron que el metabolismo cambia significativamente durante la tumorigénesis y la metástasis (Cairns et al., 2011), lo cual es producto de numerosos ajustes bioquímicos, incluidas mutaciones y modificaciones postraduccionales (Solit & Mellinghoff, 2010).

Figura 8.

Efecto Warburg.



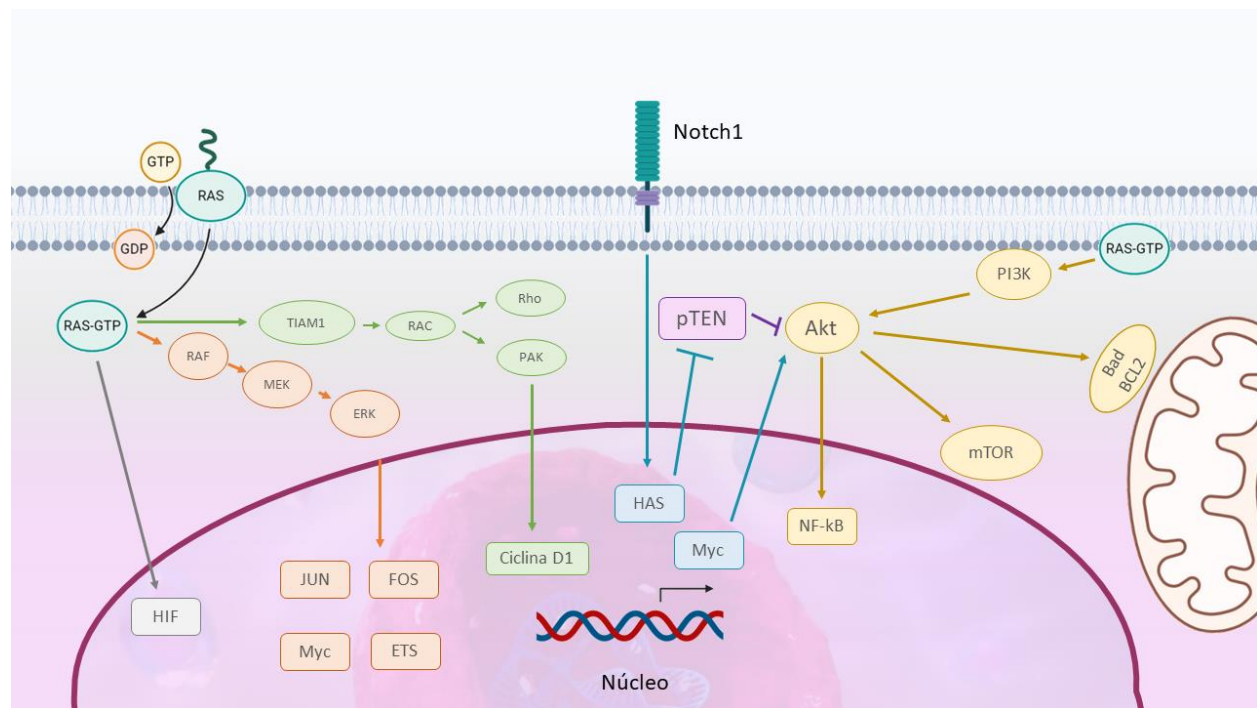
Nota: Adaptado de (Vaupel & Multhoff, 2021)

Algunas de las alteraciones metabólicas pueden estar influenciadas por la oncoproteína Ras mutante, que representa solo una de las múltiples vías que activan los receptores del factor de

crecimiento y puede provocar una serie de alteraciones en la remodelación de la cromatina, la síntesis de proteínas y la transcripción (Karnoub & Weinberg, 2008). Además, la proteína Raf es capaz de activar la vía de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) (C.-H. Huang et al., 2007), que puede inhibir la apoptosis por la vía Bad (Manning & Cantley, 2007), además de estimular la síntesis de proteínas por la vía mTOR (Brognard & Hunter, 2011), aumentar la proliferación celular por GSK-3 β (Cohen & Frame, 2001) y la progresión del ciclo celular a través del factor de transcripción FOXO (Manning & Cantley, 2007) (Figura. 9).

Figura 9.

Principales rutas metabólicas involucradas en las leucemogénesis.



Nota: Adaptado de (Brognard & Hunter, 2011; Cohen & Frame, 2001; C.-H. Huang et al., 2007; Manning & Cantley, 2007)

Adicionalmente, se ha reportado que mutaciones genéticas con consecuencias metabólicas están relacionadas con supresión de la fosforilación oxidativa y la función mitocondrial, como es

el caso de la pérdida de función de p53 que promueve un fenotipo glucolítico y regula positivamente las enzimas glucolíticas como la fosfoglicerato mutasa y la enzima limitante de la hexoquinasa (HK) (J. Kim & Dang, 2006); de manera similar, la activación de Akt no solo aumenta la actividad de enzimas glucolíticas sino que también transloca transportadores GLUTs a la membrana celular (J. Kim & Dang, 2006). Estudios recientes reportaron que el aumento de la glucólisis puede conferir una mayor resistencia a la quimioterapia, tal como se ha observado en pacientes y en líneas de células leucémicas (Herst et al., 2011; SONG et al., 2016).

Por otra parte, se ha descrito que más del 80% de las lesiones genéticas encontradas en la LLA-B infantil están asociadas sólo con los genes *PAX5* e *IKZF1* (Mullighan et al., 2007, 2008b), y que las mutaciones en estos genes pueden influir en la regulación de genes clave relacionados con el metabolismo de la glucosa como el receptor de insulina, el transportador de glucosa-1 (GLUT1), el transportador de glucosa-6, la glucosa-6 -Fosfato deshidrogenasa y hexoquinasa-2, lo que podría contribuir a problemas en la captación y utilización de glucosa en las células (Chan et al., 2017). En el caso del factor de transcripción *PAX5* se conoce que es esencial para la identidad del linaje B durante la diferenciación linfoide, y se encuentra vinculado con los perfiles de expresión genética, que son fundamentales para procesos celulares como la viabilidad, la proliferación y la diferenciación (Nasri Nasrabadi et al., 2022).

En consecuencia, las mutaciones negativas dominantes en *PAX5* e *IKZF1* podrían contribuir a la transformación maligna en LLA-B al alterar la regulación de genes relacionados con la glucosa y la energía, lo que podría proporcionar un ambiente favorable para el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas (Chan et al., 2017; Kurimoto et al., 2017).

3.6.1 Metabolismo del cáncer asociado con procesos glucolíticos.

La glucólisis es un proceso metabólico de tipo catabólico que tiene como fin la obtención de energía por medio de la oxidación de la glucosa, además de poder generar precursores para la biosíntesis de las macromoléculas celulares (Kierans & Taylor, 2021). Este proceso consiste en un conjunto de reacciones químicas que generan energía en forma de ATP, NADH y FADH, mientras se convierte cada molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, que posteriormente servirán de sustrato para alimentar otras vías metabólicas como el ciclo de Krebs (Judge & Dodd, 2020).

En condiciones normales, la glucólisis se puede realizar en presencia de oxígeno, sin embargo, se ha observado que este proceso ocurre en un microambiente con concentraciones bajas de oxígeno como lo es la médula ósea, la cual tiene un presión de oxígeno menor a 32 mmHg (Simsek et al., 2010; J. A. Spencer et al., 2014). De hecho, se ha observado que las CMH utilizan la glucólisis anaerobia para generar energía y conservar la quiescencia característica de estas células (Morganti et al., 2022).

La programación metabólica, que permite la adaptación celular en condiciones hipóxicas, son conducidas en diferentes niveles de las células, e incluye las modificaciones transcripcionales que induce el factor inducible por hipoxia HIF-1 α , el cual aumenta la expresión de enzimas glucolíticas (Kierans & Taylor, 2021), por ejemplo, se ha descrito que las CMH tienen mayor concentración de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (Pdk), la cual inhibe la conversión de piruvato en Acetil-CoA, lo que impide la entrada de este metabolito al ciclo de Krebs (Morganti et al., 2022; Takubo et al., 2013).

De manera similar, las células tumorales en la LLA-B han mostrado una programación metabólica relacionada con el efecto Warburg para obtener energía y mantener la disponibilidad

de intermediarios metabólicos requeridos en la síntesis de otras macromoléculas esenciales, como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, los cuales son indispensables para la proliferación celular (Ishibashi et al., 2018; M.-Y. Zhang et al., 2020). Además, las células de LLA-B son capaces de redirigir los carbonos de la glucosa de la vía glucolítica a la ruta de las pentosas fosfato, a través de serina/treonina-proteína fosfatasa 2A (PP2A), para evitar el estrés oxidativo (Xiao et al., 2018).

Así pues, la actividad glucolítica se encuentra influenciada por diferentes vías y moléculas celulares que favorecen la expresión de protooncogenes como *c-Myc*, el cual actúa como sensor metabólico favoreciendo los procesos glucolíticos, la proliferación celular y la metástasis (Mushtaq et al., 2015; N. Y. Spencer & Stanton, 2019). Adicionalmente, estudios realizados en líneas celulares de LLA-B, evidenciaron que la utilización de inhibidores de *c-Myc* como CDK9 y JQ1 suprimen la glucólisis y disminuyen significativamente la progresión tumoral al inducir la apoptosis y disminuir la proliferación celular (W.-L. Huang et al., 2021; M.-Y. Zhang et al., 2020).

Por otro lado, se ha observado que el uso de inhibidores de la glucólisis como la 2-desoxi-glucosa (2-DG), favorece la muerte de células tumorales en la LLA, y genera sensibilidad a los glucocorticoides utilizados en el tratamiento quimioterapéutico como la prednisolona (Gu et al., 2017; Hulleman et al., 2009; Leni et al., 2017). En consecuencia, la glucólisis es la vía de preferencia para el mantenimiento celular, la progresión tumoral y la resistencia a fármacos en la LLA-B (Xiao et al., 2018).

3.6.2 Metabolismo del cáncer asociado a la respiración mitocondrial.

La respiración celular es un proceso que consta de diferentes reacciones químicas con el objetivo de producir energía a través de la producción de ATP. Este proceso utiliza el oxígeno como aceptor final de los electrones, que proceden de los cofactores reducidos NADH^+ y FADH^+ ,

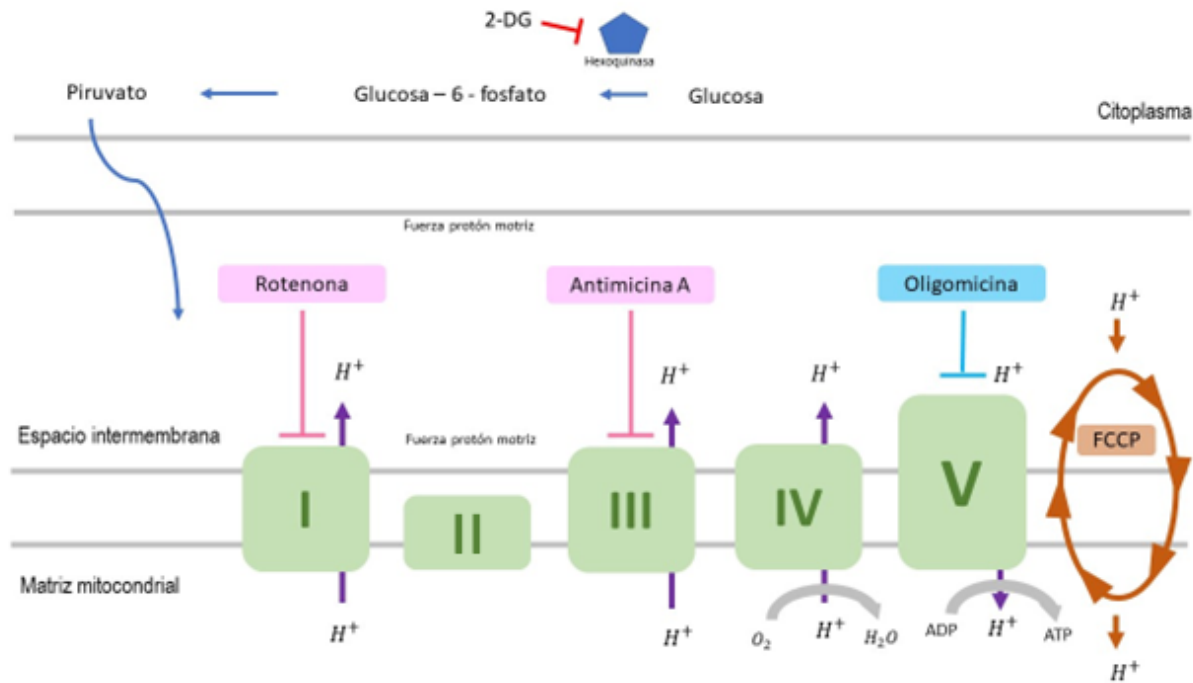
que son obtenidos de la degradación de la glucosa en el proceso de glucólisis y el ciclo de Krebs (Pfanner et al., 2019).

La fosforilación oxidativa incluye dos procesos esenciales, el primero se realiza a través de la Cadena Transportadora de Electrones (CTE), la cual consta de un conjunto de proteínas y moléculas orgánicas ubicadas en la membrana interna mitocondrial (Chandel, 2015). Estos complejos se comportan como receptores de los electrones provenientes de los cofactores NADH^+ y FADH^+ , para posteriormente transferirlos a diversos complejos membranales y en ese proceso bombear los protones al espacio intermembrana de la mitocondria (Martínez-Reyes & Chandel, 2020). Este proceso genera un gradiente electroquímico, también conocido como fuerza protón motriz, que es aprovechado por la ATP sintetasa para formar las moléculas de ATP (Martínez-Reyes et al., 2016). Adicionalmente, cabe señalar que al final de la cadena transportadora de electrones también se genera H_2O (Figura. 10) (Martínez-Reyes et al., 2016).

Finalmente, cabe señalar que una forma de estudiar el metabolismo mitocondrial es a través de la modulación funcional de la glucólisis y de los componentes de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa, mediante el uso de compuestos químicos específicos (Figura.10) (Jaber et al., 2020; Whitley et al., 2019).

En las células cancerosas, que a menudo tienen un metabolismo más dependiente de la glucólisis el llamado "efecto Warburg", la inhibición de la glucólisis por la 2-DG puede reducir la disponibilidad de energía y nutrientes esenciales, lo que puede llevar a la supresión del crecimiento e incluso a la muerte celular (Pajak et al., 2019). Por lo que la acción de la 2-DG es comportarse como un imitador de la D-glucosa, para inhibir la glucólisis por la formación y acumulación intracelular de 2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato (2-DG6P), que a su vez inhibe la función de la hexoquinasa y la glucosa-6-fosfato isomerasa (Bost et al., 2016).

En el caso de los inhibidores de la CTE se conoce que la oligomicina es una sustancia que actúa inhibiendo la actividad de la ATP sintasa, la enzima responsable de la síntesis de ATP en la CTE en las mitocondrias. Este compuesto se une al componente F_0 de la ATP sintasa, bloqueando el canal de protones y evitando así la síntesis de ATP a partir del gradiente de protones generado en la CTE. Como consecuencia de esta inhibición, se interrumpe la producción de ATP mitocondrial, la translocación de protones y también puede afectar la absorción de oxígeno en el proceso de fosforilación oxidativa (Hearne et al., 2020). Por su parte, la Rotenona actúa como un inhibidor del complejo I en la cadena de transporte de electrones dentro de la mitocondria, e interrumpe la función del complejo I, llamado también NADH deshidrogenasa, impidiendo su habilidad para transferir electrones a la coenzima ubiquinona (Y. Zhang et al., 2019). Otro inhibidor es la Antimicina A es un compuesto químico generado por *Streptomyces Kitazawensis*, y se reconoce por su capacidad de unirse al sitio Q_i de la citocromo c reductasa en el complejo III de la mitocondria, obstaculizando así la oxidación del ubiquinol en la cadena de transporte de electrones (Ma et al., 2011).

Figura 10.*Cadena Transportadora de Electrones (CTE).*

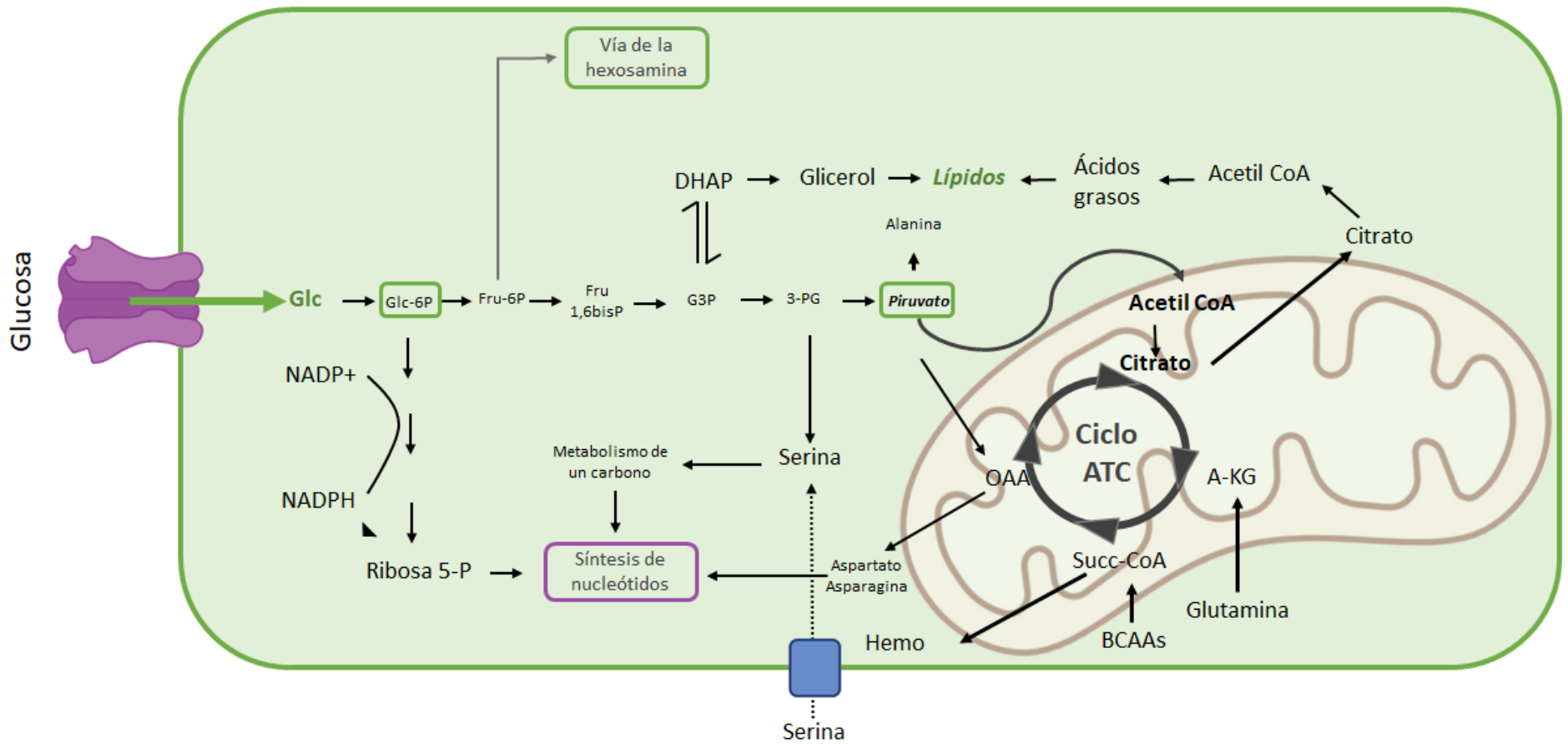
Actualmente, el metabolismo celular representa un eje fundamental de estudio ya que se encuentra ligado a las condiciones y funciones de los diferentes tipos de células (Morganti et al., 2022) (Figura. 11). Por ejemplo, se ha descrito que el metabolismo es un punto de control en las CMH para el mantenimiento, la diferenciación y proliferación celular. Es así como la pérdida de la quiescencia de las CMH se relaciona con una transición desde la glucólisis anaeróbica hacia OXPHOS (Suda et al., 2011). Sin embargo, es importante destacar la necesidad que tienen las células tumorales para realizar cierto nivel de OXPHOS, ya que esta ruta metabólica le permite adquirir metabolitos intermediarios requeridos para el mantenimiento de las células. Es decir, si bien tanto las CMH como las células tumorales descritas por Warburg están predeterminadas a mantener un metabolismo preferiblemente glucolítico, estas también están obligadas a mantener cierto grado de respiración mitocondrial (Ito et al., 2019; Vasan et al., 2020).

Las células tumorales atraviesan una reconfiguración metabólica impulsada por mutaciones fundamentales. Estos cambios alteran el flujo metabólico a lo largo de las rutas convencionales, incrementando o reduciendo el metabolismo en comparación con las células normales del tejido premaligno (DeBerardinis & Chandel, 2020). Durante este proceso, las células tumorales se activan en la glucólisis y sus rutas afines, así como en el ciclo del ácido cítrico, con el objetivo de producir ATP, NADPH y los componentes esenciales para la formación de macromoléculas, tales como nucleótidos, lípidos y aminoácidos. Estos recursos resultan cruciales para el crecimiento celular y la proliferación (Vander Heiden & DeBerardinis, 2017).

En consecuencia, la disponibilidad de nutrientes y la red metabólica ejercen influencia en los fenotipos metabólicos, ya que inciden en la manera en que las células utilizan el metabolismo para generar ATP, sintetizar macromoléculas y regular el estado redox. La Figura 11 ilustra las reacciones clave en el metabolismo central del carbono, incluyendo la participación del ciclo del ácido tricarboxílico y la cadena de transporte de electrones en la síntesis de purinas y pirimidinas (Vander Heiden & DeBerardinis, 2017).

Figura 11.

Metabolismo energético celular.



El aumento del metabolismo oxidativo en las CMH se ha detallado en un estudio en el que eliminan MEIS 1, que es el activador transcripcional de HIF-1, y esto a su vez desencadena un aumento de la producción de ROS, la pérdida de competencia de las CMH y el fracaso de la repoblación celular normal después de realizar trasplantes de médula ósea (Kocabas et al., 2012).

Por otra parte, se ha descrito que en las Células Madre Leucémicas (CML) el metabolismo energético mitocondrial se encuentra relacionado con la resistencia al tratamiento, lo que promete en un futuro ser un punto terapéutico (de Beauchamp et al., 2022). Además, se ha identificado que la actinomicina D que es un medicamento dirigido hacia la actividad mitocondrial son relevantes para la terapia anti leucémica (Morganti et al., 2022).

3.6.3 Mecanismos generales de resistencia quimioterapéutica al cáncer

La resistencia al tratamiento quimioterapéutico contra el cáncer es un obstáculo que presentan los pacientes para alcanzar la remisión completa, y suele estar asociado con un pobre pronóstico de la enfermedad (Brown et al., 2019). Actualmente se conoce que la resistencia es un fenómeno multifactorial que incluye diversos mecanismos metabólicos, alteraciones moleculares, genéticas y epigenéticas en los pacientes (Broxterman et al., 2009). Es por esto por lo que la estratificación personalizada de las cualidades biológicas del paciente representa una ganancia para dirigir mejor el tratamiento y determinar su riesgo.

La farmacocinética de los agentes quimioterapéuticos es dependiente de la disponibilidad y el acceso del fármaco al destino específico (Rey-Caro et al., 2020). A nivel génico, hay que destacar que la presencia del gen *MRD1* (*Multi Drugs Resistance 1*, por sus siglas en inglés) que codifica para la glicoproteína de permeabilidad (P-gp), participa en el transporte activo de múltiples moléculas relacionadas con la extrusión de diversos medicamentos quimioterapéuticos (Nørgaard et al., 2004). Por ejemplo, se ha observado que este gen se encuentra asociado a la

resistencia contra el Imatinib en la leucemia mieloide crónica (LMC) y en pacientes con LLA con presencia del cromosoma Filadelfia positivo (Kantarjian et al., 2006). Por otro lado, las mutaciones en los genes que codifican los reguladores apoptóticos (MDM2 / p53) y los factores epigenéticos (PRC2) se han encontrado con frecuencia en la LLA-T y pueden tener un papel en la resistencia a la quimioterapia (Ariès et al., 2018; Tzoneva et al., 2013).

Adicionalmente, se han descrito otras vías que pueden inducir resistencia de agentes quimioterapéuticos comunes, incluidos los glucocorticoides y los mecanismos de resistencia a la terapia dirigida, como IL7R, PI3K-AKT-mTOR, NOTCH1, BRD4/MYC, Ciclina D3: CDK4/CDK6, inhibidores de BCL2 e inhibidores selectivos de la exportación nuclear (SINE) (Follini et al., 2019). Además, se ha observado que las células tumorales resistentes a la quimioterapia se caracterizan por alteración funcional de enzimas involucradas en la maduración de microARN, como es el caso de la enzima Dicer (Geretto et al., 2017).

Asimismo, la reprogramación metabólica está vinculada a la heterogeneidad manifiesta de la neoplasia como una de sus características principales frente a la resistencia al tratamiento (Hanahan & Weinberg, 2011). Por ejemplo, se han descrito que las alteraciones del ADNmt asociadas a la disfunción de la actividad mitocondrial causa quimiorresistencia a fármacos como la Doxorubicina, a través de una adaptación mejorada de las enzimas glutatión peroxidasa y manganeso superóxido dismutasa (Guerra et al., 2017; S. Y. Park et al., 2004). Adicionalmente, se han asociados fenotipos resistentes vinculados a la glucólisis que se favorecen por enzimas reguladoras como la Hexoquinasa 2 (HK2) y Piruvato quinasa M2 (PKM2) (Bhattacharya et al., 2016).

3.7 Biología de los genes *ID1* e *ID3*

Los inhibidores de proteínas de unión al ADN codificados por los genes *Id* son miembros de la familia de los factores de transcripción de tipo helix-loop-helix (HLH) que carecen de dominio de unión al ADN directamente (Lasorella et al., 2014). Estudios previos, observaron que estas proteínas se translocan continuamente entre el núcleo y el citoplasma (Ghil et al., 2002; Roschger & Cabrele, 2017), y se encuentran vinculados a procesos del ciclo celular. Por ejemplo, *ID1* promueve la diferenciación celular por medio de la vía MAPK e *ID3* está relacionado con *Egr1* en la activación del TCR por la ruta ERK MAPK (Bain et al., 2001; Ling et al., 2002). Con respecto a las células madre hematopoyéticas (CMH), se ha descrito que *ID1* inhibe la diferenciación celular (Jankovic et al., 2007). Por su parte, *ID3* está relacionado con la angiogénesis y la presencia de células madre tumorales de glioma (Jin et al., 2011). En resumen, debido a que las vías celulares en cáncer se encuentran desreguladas, y que la actividad de las proteínas *ID1* e *ID3* se encuentra relacionada con la división y diferenciación celular, estos genes son candidatos para estar involucrados con procesos que permiten la progresión tumoral (Niles et al., 1995; Roschger & Cabrele, 2017).

Es conocido que el aumento de la expresión de los genes *ID1* e *ID3* se encuentra relacionado con diferentes tipos de cancer como lo son: Cancer de mamá triple negativo, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas, leucemias, entre otros (D. Chen et al., 2014; Panahipour et al., 2020; Sharma et al., 2012). De manera interesante, se ha observado que *ID1* e *ID3* tienen actividad antioxidante, ya que se encuentran involucrados en la respuesta de las células β pancreáticas contra el estrés por el aumento de las especies reactivas de oxígeno, producidas por la sobrecarga de hierro (Hamad et al., 2021).

También, se evidenció que la eliminación de estos genes tienen consecuencias graves en el proceso de eritropoyesis (Zhao et al., 2016), daños vasculares en el miocardio de pacientes adultos (Chang et al., 2017), función de células B, mantenimiento y diferenciación de células T (Hidaka et al., 2022) . Mientras que, en un modelo de carcinoma de células escamosas, se observó resistencia al oxaliplatino por *IDI*, ya que tiene relación positiva a través de la señalización Wnt/ β -catenina/c-MYC, al activar al promotor de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, aumentar la actividad de la vía de las pentosas fosfato y disminuir las especies reactivas de oxígeno, para evitar la muerte celular programada (Yin et al., 2017).

La identificación por parte de nuestro grupo de investigación de la firma génica de mal pronóstico *IDI/ID3/IGJ* asociada con la respuesta negativa al tratamiento quimioterapéutico en pacientes adultos colombianos con LLA-B, mostró que la sobreexpresión génica junto con la sobreexpresión de marcadores relacionados con la maduración celular como CD10 y CD20 se encuentran asociadas a menor SLE y SG (Cruz-Rodríguez et al., 2016, 2017). Otras investigaciones en modelos murinos han determinado que las proteínas ID1 e ID3 son necesarias para mantener el estado estacionario de las células dentro del nicho de la médula ósea requerido para la supervivencia celular y la regeneración de las células madre hematopoyéticas (Gadomski et al., 2020). También, en modelos murinos de cáncer de pulmón se evidenció que *IDI* mejora la sensibilidad al tratamiento con Gefitinib (ZD1839), al mantener activa la vía *Akt* mediada por *RIP1/RIP3* que índice la necroptosis (Tan et al., 2020). Por otro lado, estudios en neuronas mostraron que *IDI* induce a HIF-1 α , factor transcripcional inducido en hipoxia celular, lo que a su vez induce la expresión de Ciclina D1 y el antígeno nuclear de células en proliferación (*PCNA*, por sus siglas en inglés *Proliferating cell nuclear antigen*) (Chao et al., 2020). Adicionalmente, se ha descrito la actividad anti-apoptótica de *IDI* en diferentes tipos de cáncer, a través de diferentes

vías como la disminución de p53 y la activación de Bcl-2 (Hui et al., 2006; T. K. Kim & Eberwine, 2010).

3.8 Biología del gen *IGJ*

La proteína IGJ (proteína enlazante de los anticuerpos IgA e IgM) expresada por el gen *IGJ* (también conocido como *JCHAIN*), es requerida para la formación del pentámero de IgM (45), y la homodimerización de IgA (H. Chen et al., 2020). Este gen se encuentra expresado en las células plasmáticas diferenciadas (Carmona & Schatz, 2017). Aunque no se ha dilucidado su papel en los linfoblastos tumorales de la LLA-B (Ying et al., 2003)(Corradi et al., 2018), el gen *IGJ* ha sido reportado en varios estudios como indicador de mal pronóstico en LLA y otros modelos de leucemias agudas (Schatz et al., 1989), lo que sugiere que podría tener relación con los procesos biológicos tumorales en las neoplasias hematológicas (Cruz-Rodríguez et al., 2016; Ying et al., 2003).

Asimismo, se encontró que su gen vecino *CRLZI* se encuentra en células Pre-B de ratones y está regulado por acetilación en la cromatina (J. Zhang et al., 2011). Además, *CRLZI* codifica para una proteína capaz de unirse al factor de unión al núcleo (CBF), el cual está involucrado en la regulación de la hematopoyesis y la osteogénesis (Harrison, 2009; J. Zhang et al., 2011). También, se ha observado que este gen se asocia a la resistencia a los glucocorticoides en diferentes líneas celulares, y es un marcador asociado a recaídas y mal pronóstico en niños con LLA-B (Tonegawa et al., 1974; Trias, 2013).

3.9 Línea celular NALM-6

Desde hace varios años, la utilización de las líneas celulares inmortalizadas ha servido como sistemas modelo para la investigación del cáncer, principalmente leucemias y linfomas.

NALM-6 corresponde a una línea celular inmortalizada de la muestra de sangre periférica de un hombre de 19 años con LLA-B. Esta línea celular se encuentra caracterizada en su inmunofenotipo: CD3 -, CD10 +, CD19 +, CD37 -, cyCD79a +, CD80 -, CD138 +, HLA-DR +, sm/cyIgG -, cyIgM +, smIgM -, sm/cykappa -, sm/cylambda; citogenética: cariotipo casi diploide humano 46(43-47) < 2n > XY, t(5;12)(q33.2;p13.2). Información relacionada en el enlace: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-128>.

4. Materiales y Métodos

4.1 Recolección de muestras de médula ósea

Se empleó el volumen residual de las muestras de médula ósea, tomado por el hematólogo tratante, para el diagnóstico de pacientes pediátricos y adultos con LLA-B que aceptaron voluntariamente participar en el estudio de las instituciones prestadoras de servicios: Hospital Universitario de Santander (HUS), la Clínica Materno Infantil San Luis y el Hospital Internacional de Colombia (HIC). Dichas muestras fueron obtenidas a través del proyecto CT-767-2008, financiado por Colciencias (actual MINCIENCIAS), dirigido inicialmente por la Doctora Nataly Cruz Rodríguez y posteriormente por el Doctor José Arturo Gutiérrez.

Según los datos publicados en la Cuenta de Alto Costo, entre el 2 de enero de 2018 al 1 de enero del 2019, las EPS en Colombia reportaron 1191 casos de LLA en adultos de los cuales 66 procedían de Santander. Por otro lado, en menores de 18 años, Santander reportó 134 casos de los 1952 casos de LLA en Colombia reportados en el mismo período. Por esta razón, se estimó poder reclutar al menos 10 pacientes pediátricos y 10 pacientes adultos entre todos los centros, al tener en cuenta consideraciones como que la presunción de diagnóstico fuera para LLA-B, además de

considerar circunstancias como la posibilidad de realizar el adecuado seguimiento de los pacientes, ya que en algunos casos son remitidos a otras entidades del país para las cuales no se podría realizar el seguimiento pertinente. Asimismo, era necesario garantizar la calidad de las muestras y el cumplimiento de los tiempos en el procesamiento de estas. Por todas las consideraciones anteriores, el presente documento incluye apéndices con la siguiente información complementaria:

Apéndice A. Protocolo de inclusión de pacientes al estudio.

Apéndice B. Asentimiento informado en su última versión.

Apéndice C. Consentimiento informado para padres en su última versión.

Apéndice D. Consentimiento informado para mayores de edad en su última versión.

4.2 Aislamiento de células leucémicas a partir de muestras primarias

Una vez tomada la muestra de médula ósea por parte del especialista, y dentro de las primeras 24 horas, las células mononucleares (CMN) fueron separadas por medio de separación de gradiente de densidad (*Lymphocyte Separation Medium, Lonza, USA*). La población de blastos tumorales fue aislada por la técnica *Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)*, usando anticuerpos anti-CD19 o anti-CD34 conjugados con microesferas magnéticas y columnas MS (*Miltenyi Biotec®*) (selección inmunomagnética positiva), según el inmunofenotipo tumoral de cada muestra.

4.3 Mantenimiento de la línea celular NALM-6

Se utilizó la línea celular comercial NALM-6, adquirida de la casa comercial *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ*, Alemania, con el objetivo establecer un control de referencia para los estudios de comportamiento metabólico y expresión génica. Para el mantenimiento de la línea celular, se utilizaron frascos de cultivo de 75 cm², y se sembraron entre 3 x 10⁵ a 5 x 10⁵ células/ml en con 10 mL de medio RPMI suplementado con 10%

de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de penicilina/estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂, hasta la realización de los ensayos metabólicos.

4.4 Evaluación de la función mitocondrial de los linfoblastos tumorales de pacientes con LLA-B y de la línea celular NALM-6

La actividad mitocondrial de los linfoblastos tumorales, tanto de pacientes como de la línea celular, fue evaluada en el equipo *Seahorse Bioscience XFe24 Extracellular Flux Analyzer* (*Seahorse Biosciences*), mediante el ensayo de *Mito Stress Test*, que permite medir simultáneamente la rapidez del consumo de oxígeno (*OCR*, por sus siglas en inglés, *Oxygen Consumption Rate*) y la tasa de acidificación extracelular (*ECAR*, por sus siglas en inglés *Extracellular Acidification Rate*). Para los ensayos se sembraron los linfoblastos tumorales aislados de pacientes a una densidad entre 8×10^5 a $1,6 \times 10^6$ por pozo, y se sembraron 3×10^5 células NALM-6 por pozo (para el análisis de los datos la densidad celular fue normalizada a 1×10^6 células por pozo), en medio de cultivo XF RPMI con HEPES 1 mM (*Seahorse Biosciences*), el cuál fue suplementado con glutamina a una concentración final de 2,053 mM y de glucosa a una concentración final de 11,1 mM o 2 g/L. Las células fueron sembradas en placas *Seahorse XF24 V7 PS Cell Culture Microplates*, y se incubaron durante 40 minutos a 37°C en ausencia de CO₂.

Se utilizaron diferentes moduladores de la respiración dirigidos hacia componentes de la cadena de transporte de electrones (**Tabla 2**), de modo que se realizaron inyecciones seriales de Oligomicina (Oligomycin A, *Chem Scene, USA*), Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (*FCCP, Santa Cruz Biotechnology, USA*) y una mezcla de Rotenona (*Santa Cruz Biotechnology, USA*) y Antimicina A (*Santa Cruz Biotechnology, USA*) (Figura.12). Las concentraciones finales de los moduladores se relacionan en la **Tabla 3**.

Tabla 2.*Acción de los moduladores de la cadena transportadora de electrones.*

Moduladores	Acción en la Cadena Transportadora de Electrones (CTE)
Oligomicina	Inhibidor de la ATP sintasa.
FCCP	Agente desacoplante de la membrana mitocondrial con actividad protonófora.
Rotenona	Inhibidor del complejo I.
Antimicina A	Inhibidor del complejo III.

Tabla 3.*Concentraciones finales de los moduladores para el ensayo de Mito Stress Test.*

	Oligomicina	FCCP	Rotenona / Antimicina A
[Stock]	1 mM	2.5 mM	10 mM
[Puerto]	8 μ M	9 μ M	10 μ M
[Pozo]	1 μ M	1 μ M	1 μ M

El uso de los moduladores descritos permitió medir: la respiración basal, la producción de ATP, la salida de protones, la respiración máxima, la capacidad respiratoria de reserva y al consumo de oxígeno no mitocondrial, respectivamente Tabla 4. La obtención de los datos y el análisis de estos se realizó a través del software *Seahorse Wave Desktop*, Agilent Technologies.

Tabla 4.

Tabla de descripción de las variables a medir para Mito Stress Test .

Variable	Definición operativa	¿Cómo se establece?	¿Cómo se calcula?	Naturaleza	Nivel operativo
Respiración basal (RB)	Respiración utilizada para satisfacer la demanda de ATP endógeno de la célula e impulsar las vías de fuga de protones.	La tasa basal de respiración se establece mediante la tasa de utilización de ATP, la disponibilidad y oxidación del sustrato o la fuga de protones.	RB = (Última medición antes de la primera inyección) – (Respiración no mitocondrial)	Cuantitativa continua	pmol O ₂ / min
Salida de protones (SP)	La salida o fuga de protones se refiere a la filtración de protones a través de la membrana interna mitocondrial,	La magnitud del consumo de oxígeno insensible a la oligomicina determina principalmente por la	SP = (Promedio de las Mediciones después de la adición de oligomicina, pero antes de la inyección de FCCP) – (consumo de oxígeno no mitocondrial)	Cuantitativa continua	pmol O ₂ / min

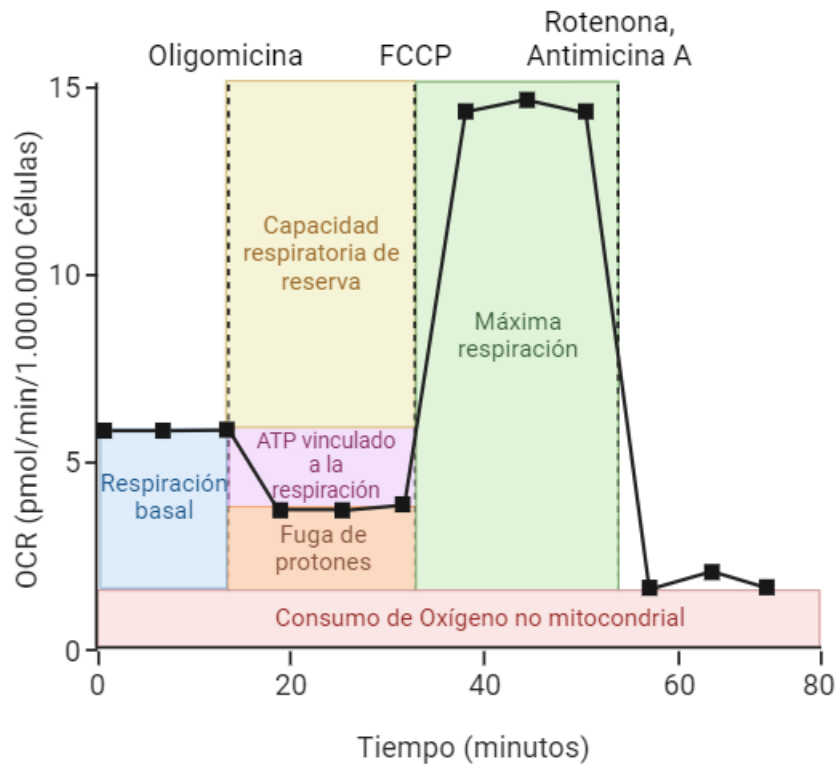
Variable	Definición operativa	¿Cómo se establece?	¿Cómo se calcula?	Naturaleza	Nivel operativo
	<p>independiente de la actividad de la ATP sintetasa. Es decir que no se encuentra acoplada a la producción de ATP. Esta fuga puede significar un daño mitocondrial.</p>	<p>fuga de protones. Según el modelo experimental y el contexto, una gran fuga puede indicar una respuesta mitocondrial, lesión o fisiológica normal.</p>			
Producción de ATP (PA)	<p>Proceso que es sensible a la oligomicina y lleva a estimar la respiración que se utiliza para impulsar la síntesis de ATP mitocondrial.</p>	<p>La tasa de respiración ligada a ATP está determinada en gran medida por la demanda de ATP de la célula. También puede establecerse por suministro de sustrato y oxidación,</p>	$PA = RB - SP$	Cuantitativa continua	pmol O ₂ / min

Variable	Definición operativa	¿Cómo se establece?	¿Cómo se calcula?	Naturaleza	Nivel operativo
		particularmente si hay disfunción mitocondrial.			
Respiración máxima (RM)	Tasa máxima de consumo de oxígeno obtenida al agregar el desacoplador FCCP, el cual imita una demanda de energía fisiológica mediante la estimulación de la cadena respiratoria para que funcione a su máxima capacidad, lo que provoca la oxidación rápida de los sustratos (azúcares, grasas,	La tasa de respiración máxima se establece principalmente por el suministro de sustrato y la oxidación. Esto incluye el transporte de sustrato a través del plasma y las membranas mitocondriales, así como las enzimas metabólicas que controlan la velocidad del proceso. Los cambios también	RM = (Promedio de las medidas después de la inyección de FCCP) – (Respiración no mitocondrial)	Cuantitativa continua	pmol O ₂ / min

Variable	Definición operativa	¿Cómo se establece?	¿Cómo se calcula?	Naturaleza	Nivel operativo
	<p>aminoácidos) para pueden reflejar una compensar a este alteración en la desafío metabólico. biogénesis</p> <p>Muestra la tasa mitocondrial o en la máxima de densidad de crestas respiración que la mitocondriales. célula puede alcanzar.</p>				
<p>Capacidad respiratoria de reserva (CR)</p>	<p>La capacidad de reserva (o reserva respiratoria) es la diferencia entre la respiración basal y máxima. Lo que implica la capacidad de una célula para satisfacer un aumento de la demanda de energía.</p>	<p>Los factores que afectan la frecuencia respiratoria basal como la máxima, también pueden determinar la capacidad de reserva.</p>	$CR = RM - RB$	<p>Cuantitativa continua</p>	<p>pmol O₂ / min</p>

Variable	Definición operativa	¿Cómo se establece?	¿Cómo se calcula?	Naturaleza	Nivel operativo
Consumo de oxígeno no mitocondrial (CONM)	El consumo de oxígeno mitocondrial refiere a los procesos celulares que consumen oxígeno después de la inhibición del sistema <i>OXPPOS</i> completamente por la adición de la rotenona y la Antimicina A.	Los cambios pueden no indicar un número de células diferencial si aparecen diferencias paralelas en otros lugares. En algunos sistemas, las oxidasas citoplásmicas son relevantes (por ejemplo, células hematopoyéticas, ROS / RNS elevados)	CONM = El promedio de las medidas después de la inyección de Rotenona/Antimicina (A)	Cuantitativa continua	pmol O ₂ / min

(Divakaruni , Paradyse, Ferrick , Murphy, & Jastroch, 2016)

Figura 12.*Ensayo de Estrés Mitocondrial.*

A través del ensayo de estrés mitocondrial también se podrán evaluar el fenotipo energético celular, al calcular los parámetros: fenotipo de referencia, fenotipo estresado y el potencial metabólico, conceptos relacionados en la **Tabla 5**.

Tabla 5.

Conceptos relacionados con el fenotipo energético celular.

Término	Concepto
Fenotipo en línea base o de referencia	Medidas de <i>OCR</i> y <i>ECAR</i> de células en las condiciones iniciales del ensayo (específicamente, en presencia de una cantidad ilimitada de sustratos).
Fenotipo estresado	Medidas de <i>OCR</i> y <i>ECAR</i> de células bajo demanda energética inducida (en concreto, en presencia de compuestos estresantes).
Potencial metabólico	El potencial metabólico es la medida de la capacidad de las células para satisfacer una demanda de energía a través de la respiración y/o de la glucólisis. Dicha medida, se calcula con la siguiente fórmula: $\% \text{ Potencial metabólico } OCR = \frac{OCR \text{ Estresado}}{OCR \text{ Línea base}} \times 100$ $\% \text{ Potencial metabólico } ECAR = \frac{ECAR \text{ Estresado}}{ECAR \text{ Línea base}} \times 100$

4.5 Evaluación de la función glucolítica de los linfoblastos tumorales de pacientes con LLA-B y de la línea celular NALM-6

Para la evaluación de la función glucolítica, se sembraron las células en las mismas condiciones descritas para los ensayos de *Mito Stress Test*. El medio *XF Seahorse RPMI* se suplementó con glutamina a una concentración final de 2.053 mM, glucosa a una concentración

de 11,1 mM o 2 g/L y HEPES hasta alcanzar una concentración final de 5 mM. Seguidamente, se cargaron los puertos respectivos para generar las inyecciones subsecuentes de: Rotenona / Antimicina A y 2-deoxi glucosa (2-DG), inhibidor de la glucólisis (Figura. 13). Las concentraciones finales por puerto y pozo se relacionan en la **Tabla 6**.

Tabla 6.

Concentraciones finales de los moduladores del ensayo de Glycolytic Rate.

	Rotenona / Antimicina A	2-DG
[Stock]	10 mM	1 M
[Puerto]	10 μ M	500 mM
[Pozo]	1 μ M	50 mM

Lo anterior, permitió identificar parámetros del metabolismo glucolítico como la glucólisis basal, tasa de flujo de protones, glucólisis compensatoria y la acidificación posterior a 2-DG Tabla 7. Finalmente, para la obtención de los datos y el análisis se usó el *software Seahorse Wave Desktop, Agilent Technologies*.

Tabla 7.

Tabla de descripción de las variables a medir para Glycolytic Rate Assay.

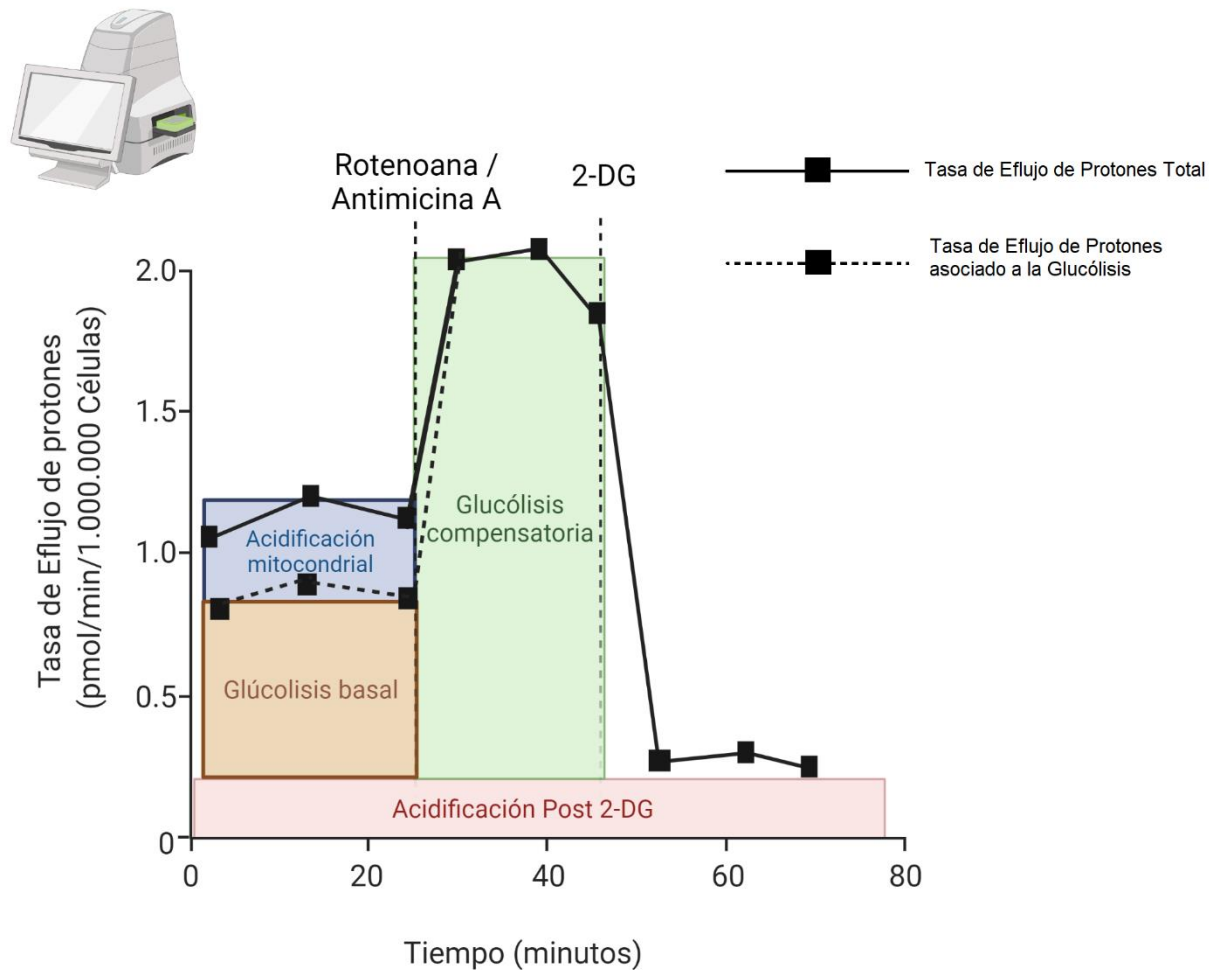
Variable	Definición operativa	¿Cómo se calcula?	Naturaleza	Nivel operativo
Tasa de flujo de protones basal	Es la cantidad total de protones exportados por las células al medio de ensayo en función del tiempo, expresado en pmol/min. Incluye el efecto de la acidificación dependiente del CO ₂ .	Última medición de PER antes de la primera inyección.	Cuantitativa Continua	PER (pmol/min)
Glucólisis basal	Es el proceso de conversión de glucosa en lactato e hidrogeniones y representa la tasa de flujo de protones derivada de la glucólisis (descontando el efecto de la acidificación dependiente del CO ₂).	Última medición de glycoPER, la tasa de protones exportados por la célula en función del tiempo como resultado de la glucólisis, antes de la inyección de Rotenona/Antimicina A.	Cuantitativa Continua	GlycoPER (pmol/min)
Glucólisis compensatoria	Es la tasa de glucólisis en las células después de la adición de inhibidores que bloquean la fosforilación oxidativa e impulsan cambios compensatorios en la célula para	Medición máxima de glycoPER después de la inyección de Rotenona/Antimicina A.	Cuantitativa Continua	GlycoPER (pmol/min)

Variable	Definición operativa	¿Cómo se calcula?	Naturaleza	Nivel operativo
	reforzar la glucólisis y satisfacer las demandas de energía de las células.			
Acidificación post 2-DG	Es un valor que incluye otras fuentes de acidificación extracelular que no se atribuyen a la glucólisis ni a la actividad del ciclo de ácido tricarboxílico mitocondrial, así como cualquier glucólisis residual que no esté totalmente inhibida por la 2-DG.	Se mide después de la adición de 2-DG en el flujo de trabajo del ensayo de tasa glucolítica	Cuantitativa Continua	GlycoPER (pmol/min)
% PER Glucólisis	Es el porcentaje de la Tasa de flujo de Protones asociado a glucólisis.	$(\text{Glucólisis Basal}) / (\text{PER Basal}) \times 100\%$	Cuantitativa Continua	Porcentaje
Mito OCR/GlycoPER (Basal)	Es la relación entre la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial (<i>mitoOCR</i>) la respiración mitocondrial y la tasa de flujo de protones (<i>GlycoPER</i>).	$[(\text{Última medición de } OCR \text{ antes de la primera inyección}) - (\text{Mínimo de } OCR \text{ después de la inyección de Rot/AA})] / (\text{Glucólisis basal})$	Cuantitativa Continua	<i>GlycoPER</i> (pmol/min)

(Divakaruni, Paradyse, Ferrick, Murphy, & Jastroch, 2016 y Agilent Technologies, Inc. 2019)

Figura 13.

Ensayo de la Tasa Glucolítica.



4.6 Determinación de la expresión del perfil genético *ID1/ID3/IGJ* en muestras primarias

El ARN total de los linfoblastos previamente separados, fue aislado usando el *Kit Qiagen all-prep*. Posteriormente, se realizaron los montajes de PCR en tiempo real con SYBR GREEN para la cuantificación relativa de los niveles de expresión del mRNA de los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ* para lo cual se utilizaron los kits *cDNA Script* de la marca *Promega*, y *BrightGreen MasterMix* de la casa comercial *abm*. Las secuencias de los primers utilizados se encuentran relacionados en la **Tabla 8**. Posteriormente, se empleó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para estimar la expresión relativa de cada

gen, para lo cual se usó GAPDH como gen de referencia, además se calculó el promedio aritmético de todas la muestras como control positivo; finalmente, se utilizó agua como control negativo (todos los ensayos se realizaron por triplicado).

Tabla 8.

Primers utilizados para la amplificación génica.

Gen	Secuencia de primers	Referencia NCBI
<i>ID1</i>	<i>F 5' -CGACTACATCAGGGACCTTCAG-3'</i>	<i>ID1 NM_002165.4</i>
	<i>R 5' -GCTTCAGCGACACAAGATGC-3'</i>	
<i>ID3</i>	<i>F 5' -TCAGCTTAGCCAGGTGGAAATC- 3'</i>	<i>ID3 NM_002167.5</i>
	<i>R 5' -GTCGTTGGAGATGACAAGTTCC- 3'</i>	
<i>IGJ</i>	<i>F 5' -TGTAAGTGTGCCCGGATTACTTC- 3'</i>	<i>IGJ NM_144646.4</i>
	<i>R 5' -CACAAATCTGGTTCTCAATGGTG- 3'</i>	

4.7 Construcción de bases de datos

Se consultaron las historias clínicas de cada uno de los pacientes y se registraron las variables clínicas detalladas en el **Apéndice E**. Entre los datos registrados, se encuentra la respuesta al tratamiento de inducción según el porcentaje de blastos tumorales por citometría de flujo, en los días 15 y 33 para los pacientes pediátricos, y en el día 30 para los pacientes adultos. Asimismo, se tuvo en cuenta la remisión completa al tratamiento de inducción según los resultados de mielograma con remisión morfológica completa o porcentaje de linfoblastos tumorales menor al 5%. Todos los datos encontrados fueron tabulados en una hoja Excel.

4.8 Análisis de los datos

Se utilizó el software Seahorse Wave Desktop, Agilent Technologies para generar los reportes y el análisis de la evaluación del comportamiento metabólico de los blastos de pacientes con LLA-B, usando la línea celular NALM-6, como patrón de referencia. Para esto, se realizaron las comparaciones de los valores obtenidos en la evaluación de las variables de respiración mitocondrial y evaluación glucolítica (Tablas 4 y 7) de los grupos con potencial metabólico diferencial, mediante la prueba de *Mann-Whitney* en el programa *GraphPad Prism 9.3.1*. (*GraphPad Software Inc. San Diego, CA*) y se consideró como estadísticamente significativos los resultados con valores de $p < 0,05$.

Las asociaciones y/o correlaciones entre las variables de función metabólica y las variables biológicas y clínicas de la enfermedad fueron evaluadas para el modelo univariado por la prueba de asociación de *Spearman*. Mientras que, para el análisis del modelo multivariado se empleó el tipo de potencial metabólico como posible predictor de correlación con los diferentes parámetros a través de análisis de regresión logística para variables dependientes categóricas y regresión lineal para variables dependientes continuas. Por otro lado, para el análisis de relación multivariado de la firma de expresión génica se utilizó regresión lineal. Para todo lo anterior, los datos se analizaron y representaron por medio del programa *GraphPad Prism 9.3.1*.

Finalmente, se realizó la curva de Kaplan Meier para evaluar la estimación de la supervivencia libre de evento de los pacientes incluidos en el estudio.

5. Resultados

5.1 Reclutamiento de los pacientes

A través del proyecto con código interno institucional 8746, durante los períodos comprendidos entre octubre del 2019 a marzo del 2020 y enero del 2021 a octubre del 2021, se reclutaron 33 muestras, a las cuales se les realizó evaluación de la expresión génica de *IDI*, *ID3* e *IGJ*.

De las muestras iniciales, se realizaron estudios metabólicos de *Mito Stress Test* a 13 pacientes, de los cuales a 11 también se les realizó *Glycolytic Rate Assay*, esto debido a que se requerían entre $1,6 \times 10^7$ a $3,2 \times 10^7$ células por muestra. Sin embargo, no todas las muestras tenían el volumen y/o la concentración celular suficiente para obtener los linfoblastos necesarios para el montaje de los ensayos de metabolismo.

Todas las muestras fueron autorizadas para su procesamiento y tratamiento de datos, de acuerdo con los lineamientos de los comités de ética, y consensuado a través de las firmas de los pacientes y padres de familia en los asentimientos y consentimientos informados.

5.2 Descripción demográfica de la población reclutada

En relación con las 33 muestras reclutadas, se describen las características demográficas en la **Tabla 9**:

Tabla 9.

Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio.

Rango de edad	Sexo	
	Hombre	Mujer
Pacientes con evaluación de la expresión génica n = 33		
2 - 57 años	17	16
Pacientes con evaluación del metabolismo celular n =13		
2 – 50 años	8	5

5.3 Evaluación del metabolismo de los linfoblastos tumorales

A través del ensayo de *Mito Stress Test* realizado en linfoblastos tumorales de 13 pacientes se logró obtener el reporte del fenotipo metabólico al evaluar las condiciones fenotípicas basales o de referencia, el fenotipo estresado y el potencial metabólico.

Para analizar las condiciones fenotípicas se tuvieron en cuenta dos medidas del comportamiento metabólico de los linfoblastos: la Tasa de consumo de Oxígeno (*OCR*, por sus siglas en inglés, *Oxygen Consumption Rate*), expresada en pmol/min/1 x 10⁶ células, y la Tasa de acidificación extracelular (*ECAR*, por sus siglas en inglés, *Extracellular Acidification Rate*) expresada en mpH/min/1 x 10⁶ células; dichas medidas fueron tomadas por el equipo *Seahorse* en condiciones basales y de demanda energética.

Se evidenció que los linfoblastos tumorales de los pacientes en condiciones basales tienen valores de *OCR* y *ECAR* menores que los de la línea celular de referencia NALM-6, excepto por un paciente que presentó un mayor valor de *ECAR* en condiciones basales (**Apéndice F y G**). Asimismo, se observó una disminución de las medidas en estado de estrés celular, después de la

inyección del desacoplante mitocondrial FCCP, con respecto a las NALM-6 (**Tablas 10 y 11**), los cálculos se realizaron a partir de las fórmulas descritas en las Tablas 4, 5 y 7. Lo anterior, sugiere que los linfoblastos tumorales provenientes de muestras primarias de pacientes, en relación con la línea celular de referencia, presentan un metabolismo energético con tendencia a la quiescencia, como se observa en la figura 14.

La quiescencia celular es un estado en el cual las células detienen temporalmente su ciclo celular y entran en un estado de reposo reversible, caracterizado por un estado metabólico bajo, con una disminución en la captación de glucosa y la glucólisis, así como la disminución de la producción de ATP a través de respiración mitocondrial. Así mismo, hay reducción en los niveles de traducción de proteínas, y se incrementa la autofagia como medio para suministrar nutrientes necesarios para la supervivencia celular, todo esto para brindar protección contra diversas agresiones ambientales, como el estrés oxidativo o la falta de nutrientes (Valcourt et al., 2012).

En el caso de las CMH se ha descrito que se encuentran en un estado de quiescencia o reposo, lo que significa que no están activamente produciendo células sanguíneas. Esta característica les permite preservar su capacidad regenerativa a lo largo del tiempo. Sin embargo, cuando el organismo se enfrenta a una situación de estrés agudo, como una infección o lesiones en los tejidos, las CMH pueden ser activadas para iniciar una rápida producción de células sanguíneas. Esta activación puede ocurrir mediante diferentes mecanismos, como señales inflamatorias o factores de crecimiento liberados en respuesta al estrés (Juan Li et al., 2022). La adquisición de la quiescencia metabólica también se observa durante el desarrollo temprano de las células B independientes de antígenos en humanos, un proceso crucial que permite la selección y maduración adecuada de las células B así como la adaptación metabólica para mantener la viabilidad y la homeostasis energética. Este proceso contribuye a la formación de un repertorio

funcional de células B capaces de reconocer y responder eficientemente a antígenos, desempeñando un papel fundamental en la respuesta inmunológica (Farmer et al., 2019). Cabe señalar que también se ha descrito el estado de quiescencia en las células madre leucémicas (Morganti et al., 2022).

Tabla 10.

Valores de OCR de la línea celular NALM-6 y los linfoblastos de los pacientes en condiciones basales y de estrés.

Porcentaje del potencial metabólico OCR. SEM: Error estándar de la media.

Código de la muestra	OCR Línea base	OCR Línea base (SEM)	OCR Estresado	OCR Estresado (SEM)	Potencial metabólico (% OCR Línea base)
NALM-6	189,1	9,4	210,8	12,7	110,2
FSB 021	69,4	3,7	84,8	4,8	122,2
JCO 026	51,1	0,8	88,6	6,2	173,7
JVE 028	47,0	1,9	68,0	4,7	146,2
WGP 037	38,6	1,2	67,0	3,3	173,0
APG 038	39,5	2,2	115,7	3,7	294,2
JAM 040	107,3	6,9	153,8	22,6	150,4
JCC 041	51,5	2,9	190,6	19,1	374,4
JMM 042	53,1	2,7	118,7	19,4	219,4
ASP 043	43,5	2,9	60,9	6,7	140,4
HLT 044	89,5	2,9	199,6	21,3	229,2
NAC 045	80,0	2,9	123,8	10,6	156,6
MCF 046	63,0	4,2	101,8	6,2	162,3
SQG 047	51,8	1,1	95,4	7,5	185,4

Tabla 11.

Valores de ECAR de la línea celular NALM-6 y los linfoblastos de los pacientes en condiciones basales y de estrés.

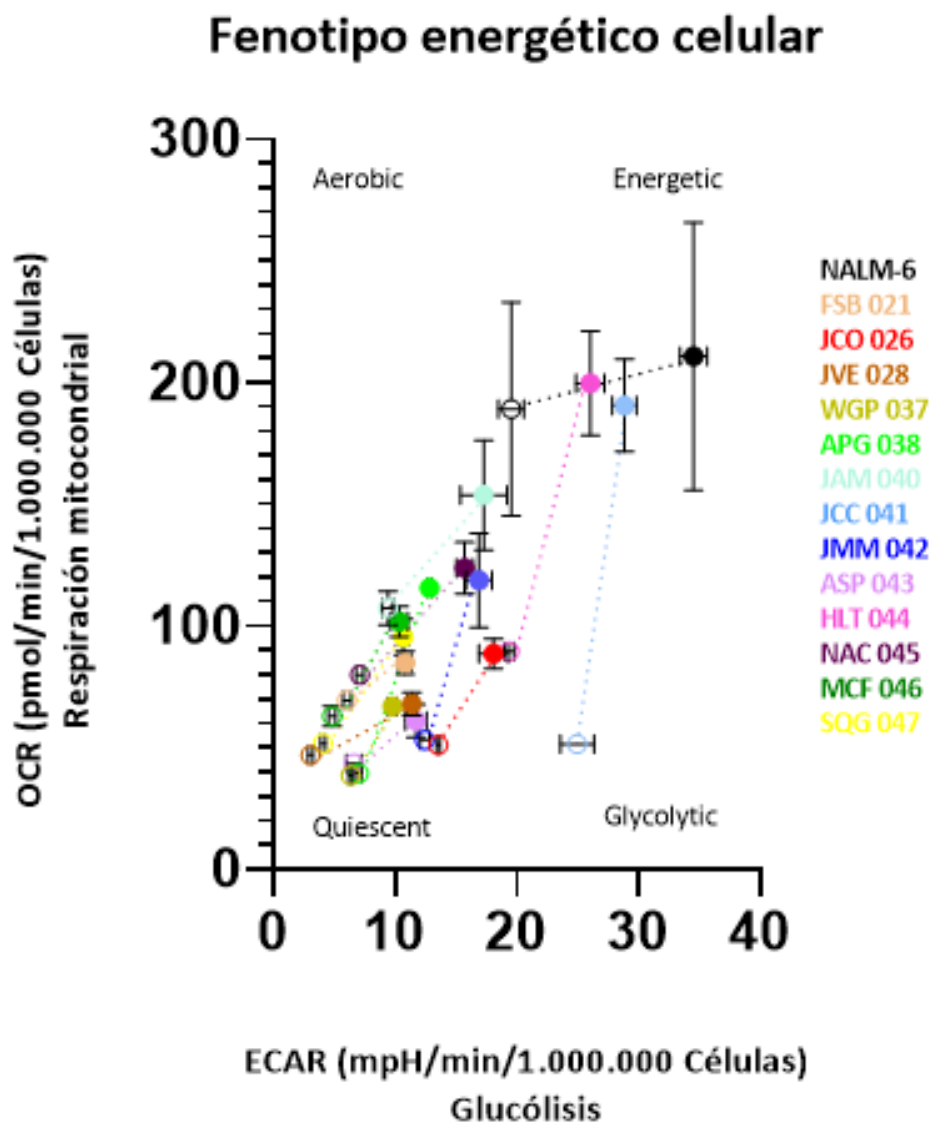
Porcentaje del potencial metabólico ECAR. SEM: Error estándar de la media.

Código de la muestra	ECAR Línea base	ECAR Línea base (SEM)	ECAR Estresado	ECAR Estresado (SEM)	Potencial metabólico (% ECAR Línea base)
NALM-6	21,6	0,6	37,4	0,9	177,1
FSB 021	6,0	0,3	10,8	0,5	179,6
JCO 026	13,5	0,1	18,1	1,2	137,8
JVE 028	3,0	0,2	11,3	0,4	380,8
WGP 037	6,3	0,2	9,8	0,4	154,2
APG 038	7,0	0,2	12,8	0,2	184,2
JAM 040	9,4	0,4	17,3	1,9	191,0
JCC 041	24,9	1,4	28,8	1,0	118,7
JMM 042	12,4	0,4	16,9	1,1	135,3
ASP 043	6,6	0,6	11,7	0,9	179,0
HLT 044	19,3	0,4	26,0	1,2	134,8
NAC 045	7,1	0,3	15,7	0,7	225,2
MCF 046	4,8	0,3	10,3	0,7	215,0
SQG 047	4,1	0,2	10,7	0,5	262,5

Figura 14.

Las células tumorales de los pacientes con LLA-B tienden a la quiescencia en comparación con las NALM-6.

Fenotipo energético de la línea celular NALM-6 y linfoblastos tumorales de pacientes. Representación gráfica de cada paciente del estado energético basal (círculo sin relleno) al estado estresado (círculo relleno).



La capacidad de una célula para llevar a cabo los procesos metabólicos, y mantener su funcionalidad en condiciones de estrés celular se conoce como potencial metabólico. Lo que implica, una serie de reacciones químicas que generan la energía suficiente para compensar la demanda energética que respalde los procesos anabólicos necesarios para el mantenimiento y la proliferación celular. Se calculó el porcentaje de potencial metabólico *OCR* y el porcentaje de potencial metabólico *ECAR* de los linfoblastos tumorales de cada paciente, de acuerdo a las fórmulas descritas en la tabla 5 (**Tablas 10 y 11**). Se evidenció que los linfoblastos tumorales tienen un estado de quiescencia, y a su vez suple los requerimientos mínimos de energía de las células a través de las rutas metabólicas principales: la glucólisis y la fosforilación oxidativa. Sin embargo, en la respuesta a la demanda energética inducida se observó que, si bien se siguen utilizando las dos vías principales para la producción de energía y el potencial metabólico tanto para *OCR* como para *ECAR* es similar (Figura 15.A), si se evidencia que las células pueden resolver la necesidad energética de manera preferencial por alguna de las dos vías principales (Figura 15.B). Se compararon los resultados y se encontraron dos grupos con potencial metabólico diferencial: el primer grupo, representado por seis pacientes que favorecen un mayor porcentaje del potencial *OCR* sobre el potencial *ECAR*; mientras que, el segundo grupo se encontró relacionado con un mayor porcentaje del potencial *ECAR* en comparación con el valor del porcentaje del potencial *OCR*, el cuál incluyó la línea celular NALM-6 y siete muestras (Figura 15). Lo anterior, sugiere que el potencial metabólico de los linfoblastos tumorales provenientes de pacientes con LLA-B no es único; y, por el contrario, sugiere una plasticidad metabólica en respuesta a la demanda energética requerida por las células.

Cabe señalar que las características dadas por el potencial metabólico son dependientes de varios factores tales como el tipo de célula (en este caso particular son los linfoblastos tumorales

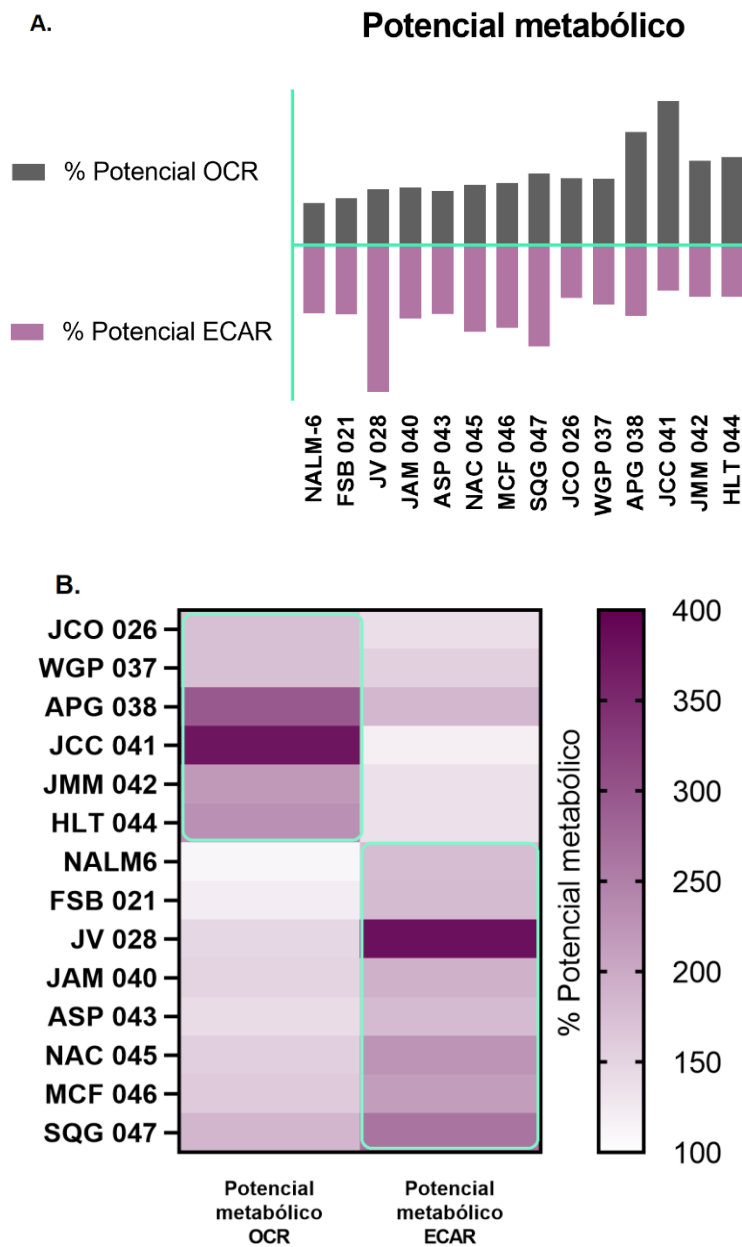
de células B), su estado fisiológico, los nutrientes disponibles, el genotipo propio de cada individuo, y las condiciones ambientales (por ejemplo, un estado inflamatorio). Cada tipo de célula tiene un conjunto específico de enzimas y vías metabólicas que determinan su capacidad para procesar diferentes sustratos, y llevar a cabo funciones especializadas.

El potencial metabólico también puede variar según el estado fisiológico de la célula. Por ejemplo, las células en reposo tienen una tasa metabólica más baja en comparación con las células en estado activo o en crecimiento. Además, las células pueden ajustar su metabolismo en respuesta a señales externas, como cambios en la disponibilidad de nutrientes o la presencia de hormonas.

Figura 15.

Las células tumorales de pacientes con LLA-B a pesar de la quiescencia presentan un potencial metabólico diferencial.

A. Porcentaje de potencial metabólico OCR y ECAR de la línea celular NALM-6 y linfoblastos tumorales de pacientes. B. Heatmap.



Adicionalmente, se evaluaron las diferentes variables metabólicas relacionadas con los ensayos de estrés mitocondrial y la tasa glucolítica, en las cuales se observaron diferencias significativas entre los dos grupos con potencial metabólico diferencial. En el caso del grupo con mayor potencial metabólico *OCR* (en las figuras se relaciona como Grupo *OCR*), se evidenció que tenía aumento de la glucólisis basal, el porcentaje de la tasa de flujo de protones (*PER*, por sus siglas en inglés, *Proton Efflux Rate*) y el porcentaje de la capacidad respiratoria de reserva (Figura. 16). Por su parte, el grupo con potencial metabólico *ECAR* (en las figuras se relaciona como Grupo *ECAR*), mostró diferencias significativas al presentar mayor respiración basal, mayor producción de ATP y Mito *OCR/GlycoPER* (Basal) (Figura. 17). Es decir, que aquellos pacientes con potencial metabólico *ECAR*, presentan un metabolismo energético basal relacionado con la respiración mitocondrial, en contraste con aquellos pacientes con metabolismo energético basal glucolítico que tienen un potencial metabólico *OCR*.

Por otro lado, se calculó la relación *OCR/ECAR* de referencia como un marcador de disposición que compromete los valores obtenidos en *ECAR* por la influencia de la actividad mitocondrial al producir CO₂. Según la guía del fenotipo energético celular (*Agilent Seahorse - Cell Energy Phenotype*) (Agilent Technologies, 2017), los valores menores a 4 están relacionados a una contribución insignificante del CO₂ en los valores de *ECAR* calculados, mientras que, los valores mayores de 4 podrían incluir tanto la actividad glucolítica como la actividad mitocondrial. De acuerdo con los datos obtenidos, la mayoría de las muestras analizadas, exceptuando dos, sugiere una posible contribución de la actividad mitocondrial a los niveles de *ECAR* reportados (Tabla 12).

Tabla 12.*Ratio OCR/ECAR de los linfoblastos tumorales de los pacientes con LLA-B evaluados.*

Células del paciente	Ratio OCR/ECAR
NALM6	8,7
FSB 021	11,5
JCO 026	3,8
JV 028	15,5
WGP 037	6,1
APG 038	5,7
JAM 040	11,4
JCC 041	2,1
JMM 042	4,3
ASP 043	6,6
HLT 044	4,6
NAC 045	11,3
MCF 046	13,1
SQG 047	12,7

Figura 16.

El aumento de la actividad glucolítica basal se encuentra relacionada con el grupo con potencial metabólico OCR.

*Mann Whitney Test, ns: No significancia, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, (n=11).*

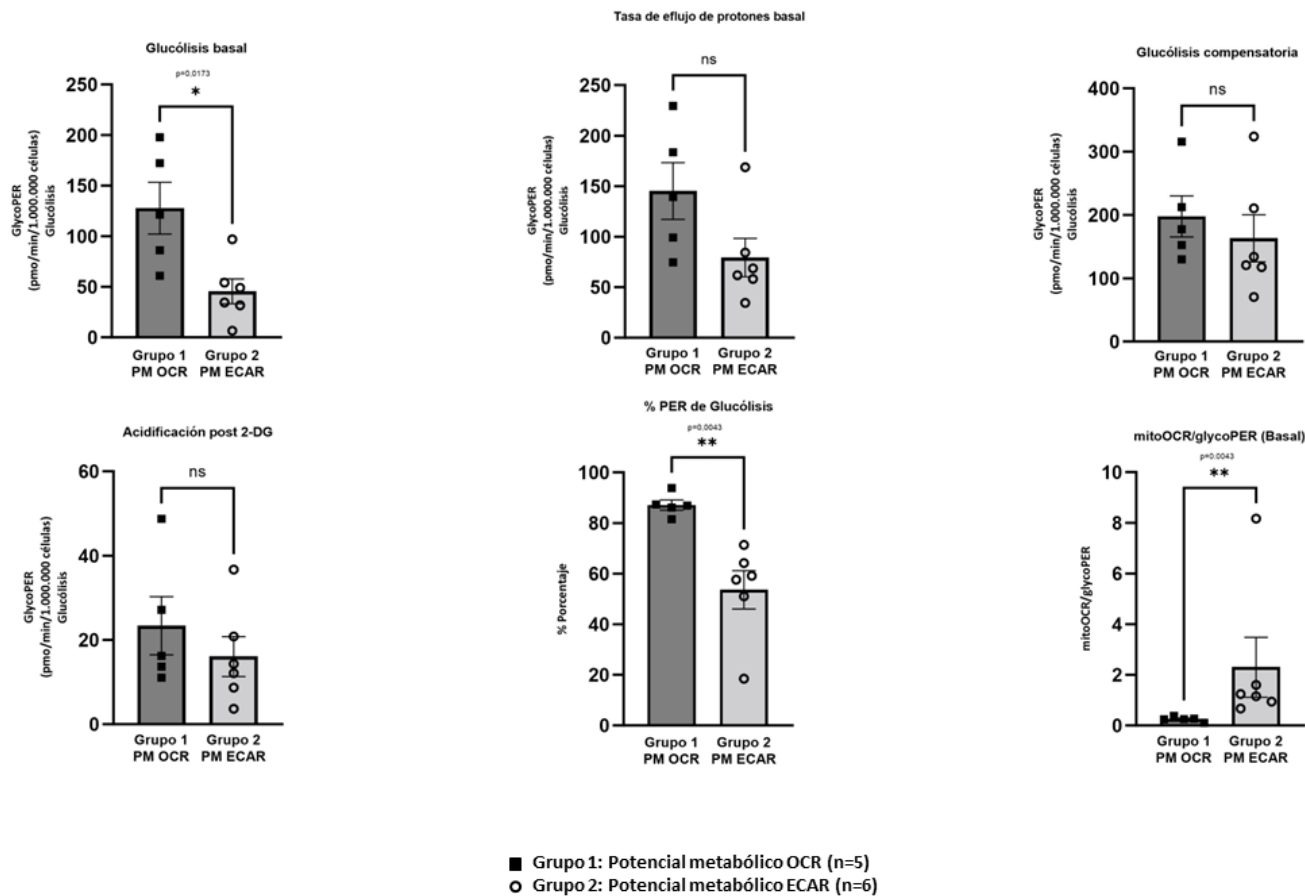
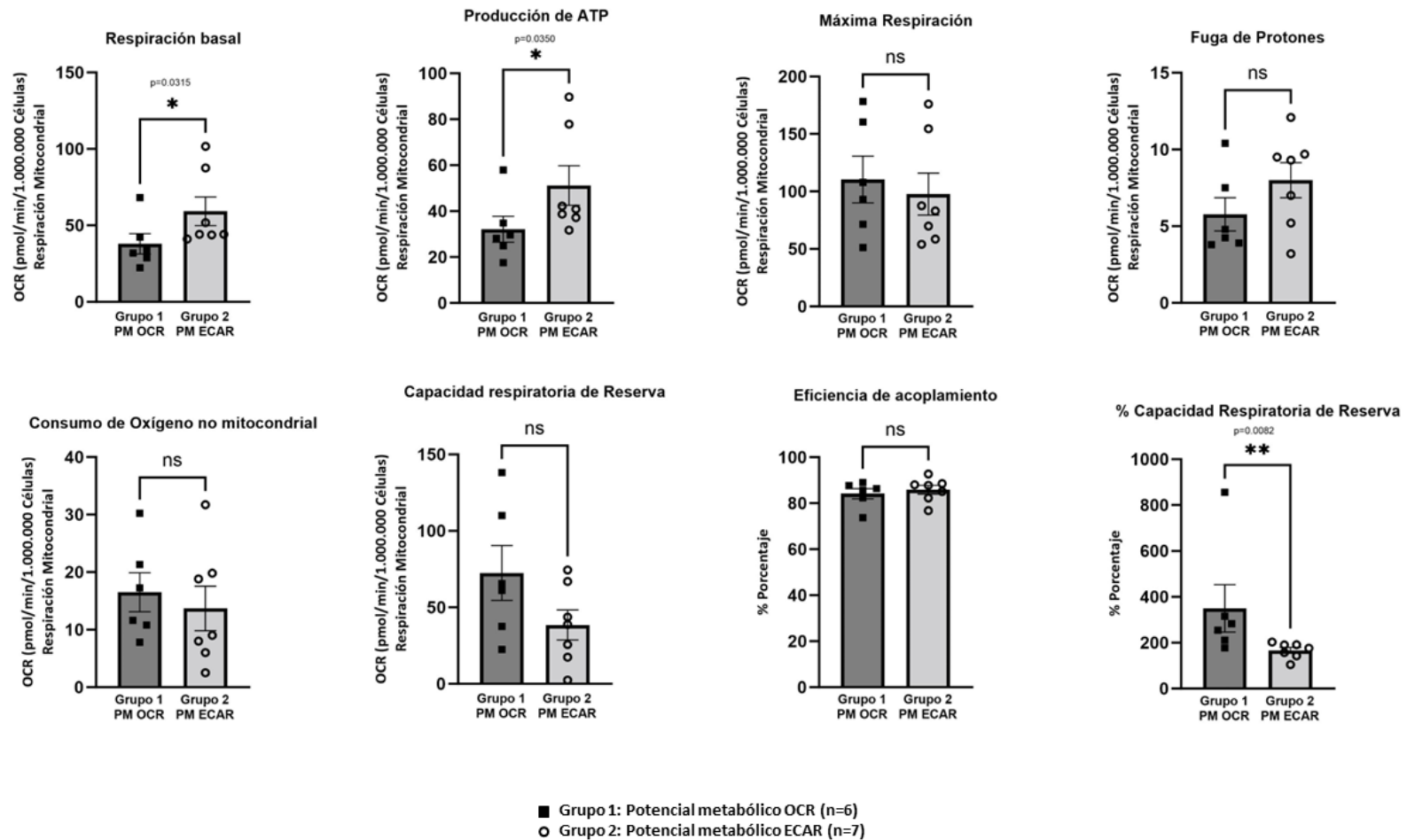


Figura 17.

El aumento de la actividad mitocondrial basal se encuentra relacionada con el grupo con potencial metabólico ECAR. .

*Mann Whitney Test, ns: No significancia, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, (n=13).*



5.4 Comparación de las características metabólicas en relación con las variables clínicas y biológicas de la enfermedad.

Teniendo en cuenta que el estudio reveló dos grupos con potencial metabólico diferencial, se realizó un análisis comparativo de estos grupos con diversas variables biológicas y clínicas de la enfermedad así como los genes *ID1*, *ID3* e *IGJ*. A continuación, se describen las características de las población de los dos grupos con potencial metabólico diferencial (Tabla 13).

Tabla 13.

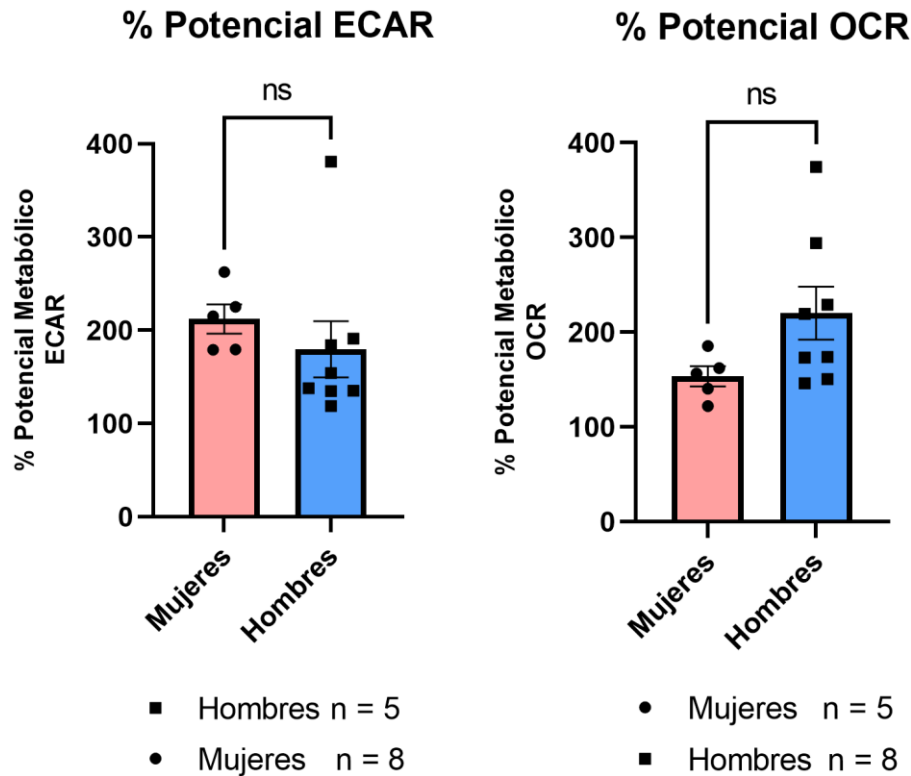
Características demográficas de la población en relación con el grupo metabólico.

Grupo	Rango de edad	Sexo	
		Hombre	Mujer
Potencial metabólico <i>OCR</i> n=6	2 - 34 años	6	0
Potencial metabólico <i>ECAR</i> n=7	2 – 50 años	2	5

Debido a que el grupo con potencial metabólico *OCR* podría presentar un sesgo en el muestreo en cuanto al sexo de los individuos, ya que todos son hombres, se realizó una prueba *Mann Whitney* con el fin de evaluar la heterogeneidad de las muestras y las diferencias entre estos, en relación con las medidas del porcentaje de potencial metabólico, y se evidenció que no había diferencias significativos entre los dos sexos (mujeres y hombres) (Figura. 18).

Figura 18.

El sexo de los pacientes no representa un sesgo entre los dos grupos metabólicos evaluados.



La mayoría de las características evaluadas tales como la edad, el recuento de leucocitos en el momento de diagnóstico o las EMR no revelaron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes con potencial metabólico diferencial (Figura 19). Sin embargo, se observó que el grupo con potencial metabólico ECAR presentaba un aumento significativo, de hasta 88 %, de la expresión del gen *IGJ* en comparación con el promedio de la expresión del grupo con potencial metabólico *OCR* (Figura 20). La importancia del *IGJ* en la LLA-B es que se ha relacionado con resistencia al tratamiento y mal pronóstico de la enfermedad en pacientes colombianos. Por lo que abre una interesante línea de estudio sobre la relación que tiene el aumento de la expresión del gen *IGJ* en el proceso leucemogénico.

Figura 19.

Los grupos con potencial metabólico diferencial no tienen correlación con variables clínicas de la LLA-B.

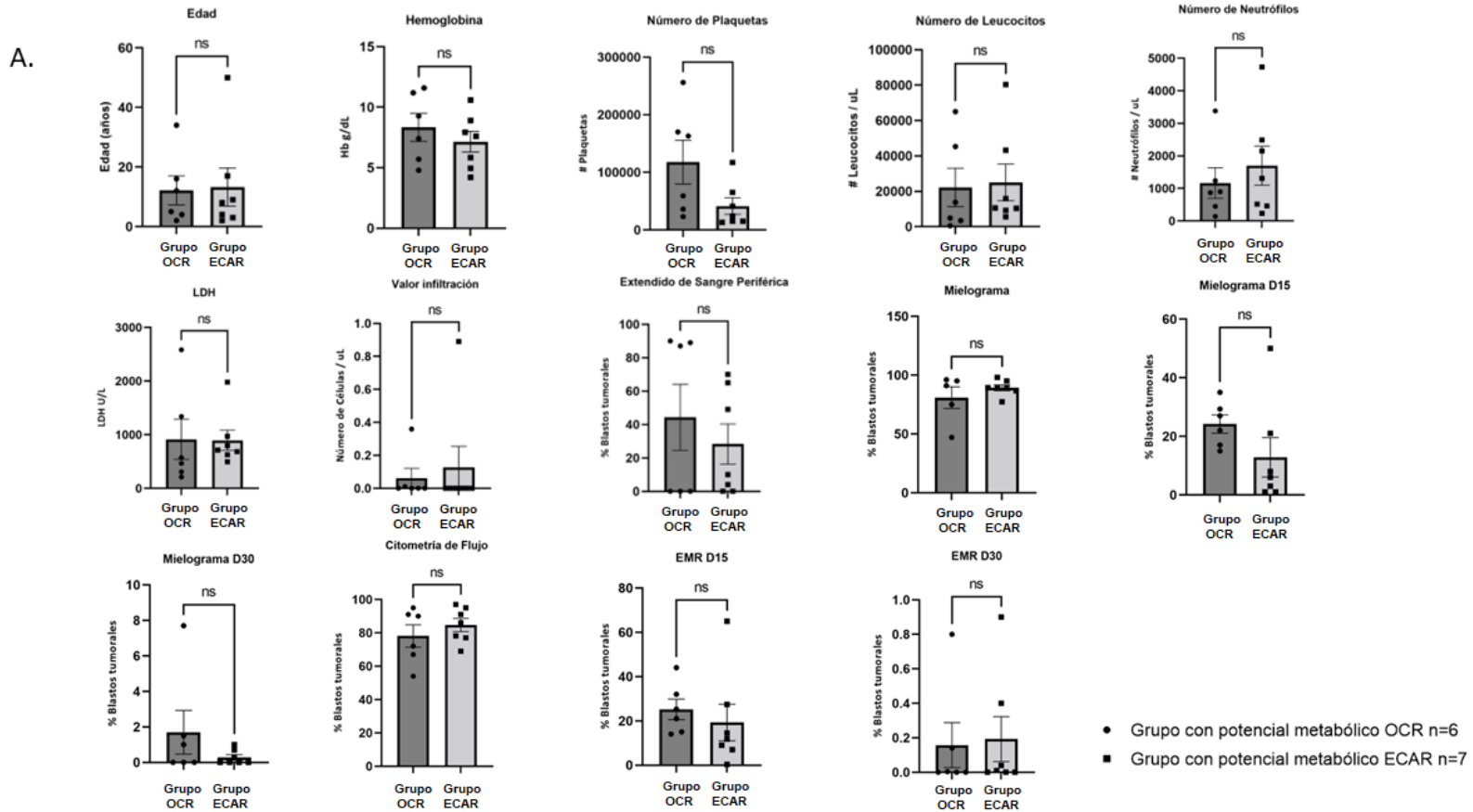
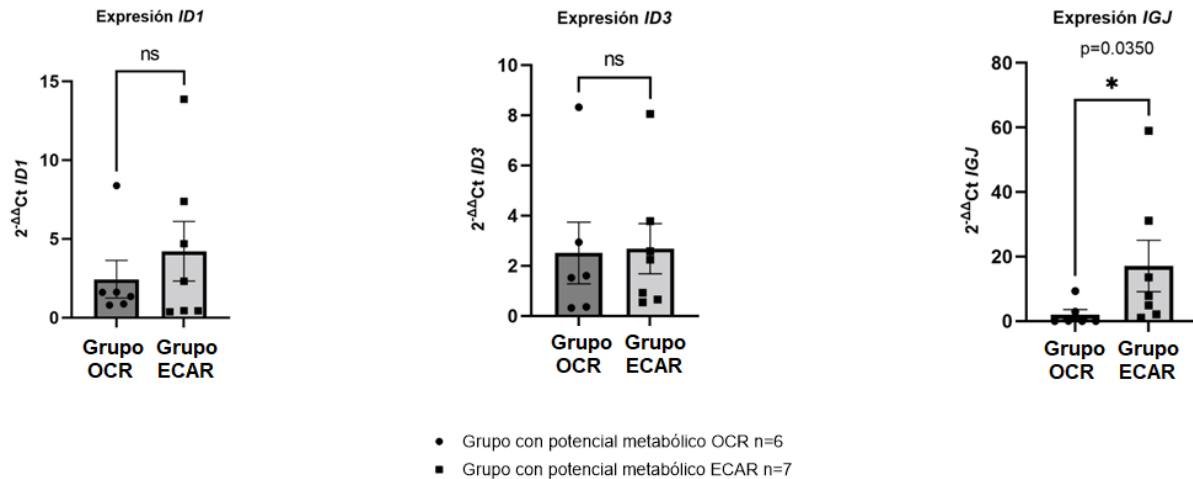


Figura 20.

El grupo con potencial metabólico ECAR tiene mayor expresión del gen IGJ.



Por otro lado, no se evaluó la Supervivencia Global (SG) y la Supervivencia Libre de Evento (SLE) entre los dos grupos con potencial metabolismo diferencial a través de las curvas de *Kaplan Meier* ya que de los 13 casos evaluados de metabolismo solo un paciente (HTL 044) falleció a los 38 días, el cual pertenecía al grupo con aumento del potencial metabólico *OCR*. Mientras que, un paciente con potencial metabólico *ECAR* (JAM 040) recayó en el día 78. Es relevante destacar que el seguimiento de los eventos (recaídas y/o fallecimientos) se limitó a 420 días para los pacientes evaluados. Normalmente, en enfermedades de este tipo, se emplea un seguimiento de al menos tres a cinco años para calcular las tasas de supervivencia, dado que el tratamiento tiene una duración promedio de dos años. Es importante tener en cuenta que, al momento del análisis de los datos, los pacientes aún no habían completado la totalidad de su esquema de quimioterapia. En consecuencia, de lo anteriormente descrito y teniendo en cuenta el número de muestras para

evaluar el efecto metabólico relacionado con la supervivencia, se evidencia una limitación de la información.

Seguidamente, para establecer la relación significativa entre las diferentes variables cualitativas y cuantitativas con los porcentajes del potencial *OCR* y *ECAR* medidos, y las diferentes variables metabólicas de los ensayos de *Mito Stress Test* y *Glycolytic Rate Assay*, se calculó el *Coefficiente de Correlación de Spearman (CS)* para medir la fuerza y la dirección de la asociación entre dos variables, para lo que se tiene en cuenta que entre más cerca se encuentre a 1 o -1, representa mayor correlación positiva o inversa respectivamente. Asimismo, se evaluó con *Mann Whitney Test* las diferencias entre los grupos y su nivel de significancia a través del valor $p < 0,05$ (Tabla 14).

Tabla 14.

Interpretación del Coeficiente de Correlación de Spearman.

Valor rs (Coeficiente de Spearman)	Interpretación
1	Correlación perfecta.
0 a 1	Las dos variables tienden a aumentar o disminuir juntas.
0	Las dos variables no varían juntas en absoluto.
-1 a 0	Una variable aumenta a medida que la otra disminuye.
-1	Correlación inversa o negativa perfecta.

En el análisis de los datos se encontró que el potencial metabólico *OCR* se encontraba relacionado significativamente con la EMR menor de 0,01% al día 30 al finalizar el esquema quimioterapéutico de inducción (Tabla 15) (Figura. 21). Seguidamente, se evaluó de manera

individual las variables y se evidenció que la presencia de la EMR se encontraba relacionada significativamente con la disminución del porcentaje del potencial metabólico *OCR* al aplicar el test de *Mann Whitney*, para muestras no paramétricas, con valor de significancia $p < 0,033$ (Figura 22). Lo anterior conlleva a sugerir que el grupo de pacientes con EMR positiva tienen linfoblastos tumorales con hasta un 35% menos de capacidad de respuesta por respiración mitocondrial ante la demanda energética que se pueda presentar en condición de estrés celular con respecto al grupo de pacientes con EMR negativa.

La EMR en LLA-B es un término que se utiliza para describir la presencia de células leucémicas en la médula ósea o en la sangre después del tratamiento inicial. El objetivo del tratamiento es lograr una remisión completa, lo que significa que no se detecte ninguna célula leucémica en la médula ósea o en la sangre. Sin embargo, incluso después de alcanzar una remisión completa, es posible que queden células leucémicas en niveles tan bajos que no se puedan detectar mediante métodos convencionales. La EMR positiva tiene implicaciones en el pronóstico y el plan de tratamiento, ya que los niveles altos EMR se han asociado con un mayor riesgo de recaída de la enfermedad.

Tabla 15.

Coefficiente de variación de Spearman de los potenciales metabólicos OCR y ECAR en relación con las variables clínicas cualitativas.

Variables	Spearman r		p Value	
	Potencial Metabólico OCR	Potencial Metabólico ECAR	Potencial Metabólico OCR	Potencial Metabólico ECAR
Sexo	-0,477	0,239	0,099	0,432
EMR CMF día 30 corte 0,1	0,344	0,270	0,249	0,372
EMR CMF día 30 corte 0,01	0,592	-0,153	0,033	0,617
Infiltración SNC	-0,031	-0,204	0,919	0,504
Cariotipo alterado	0,213	-0,251	0,554	0,483
Tipo de alteración - Cariotipo	-0,429	0,536	0,216	0,110
BCR-ABL1 t(9;22)(q34;q11)	0,263	-0,479	0,408	0,115
ETV6 RUNX1 TEL-AML1 t(12;21)(p13;q22)	0,516	-0,491	0,127	0,149
Recayó	0,187	0,004	0,541	0,991
Falleció	-0,148	0,244	0,630	0,422

Figura 21.

El potencial metabólico OCR se encuentra positivamente relacionado con la EMR.

Heatmap del coeficiente de variación de Spearman de los potenciales metabólicos OCR y ECAR en relación con las variables clínicas cualitativas.

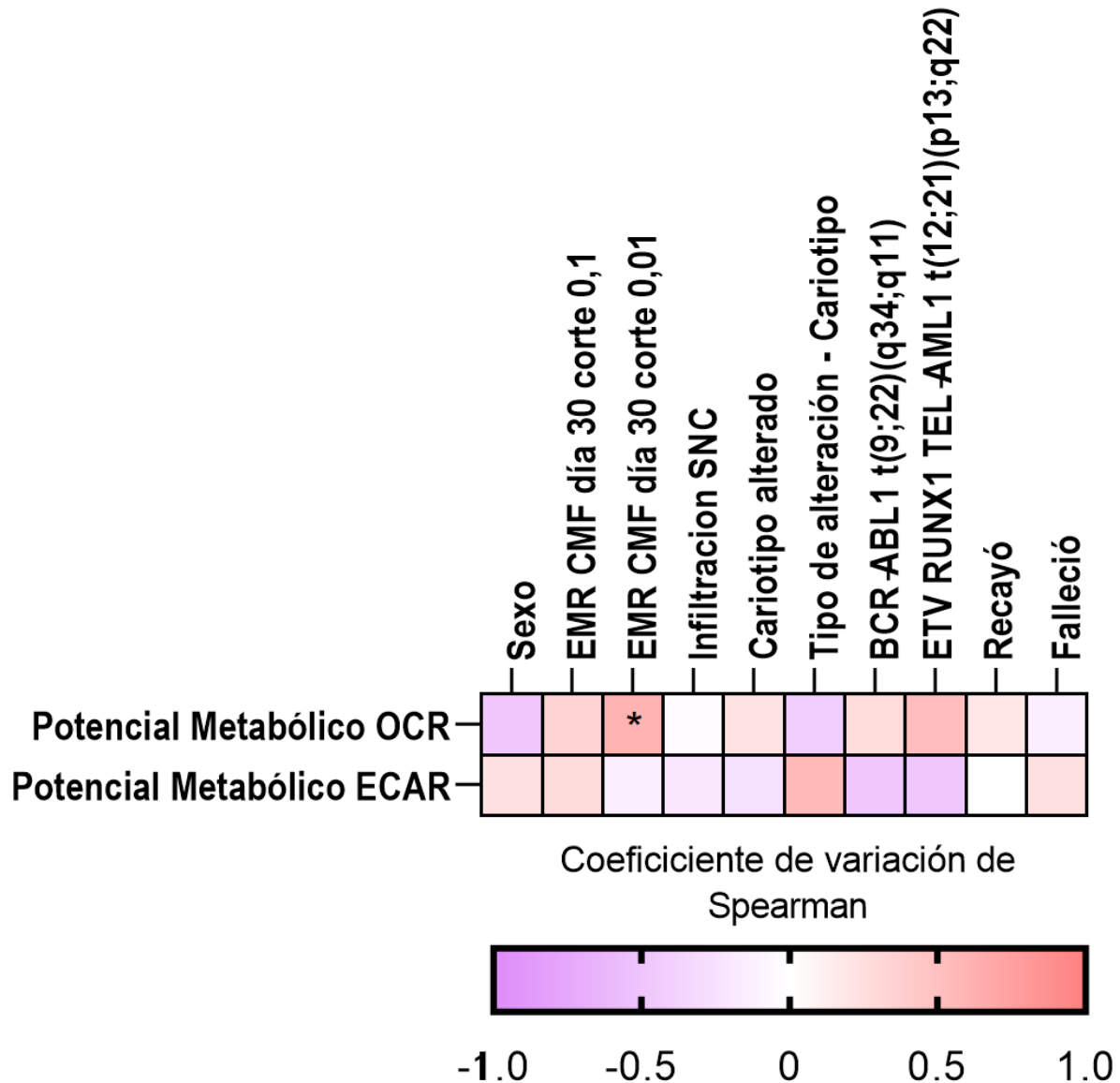
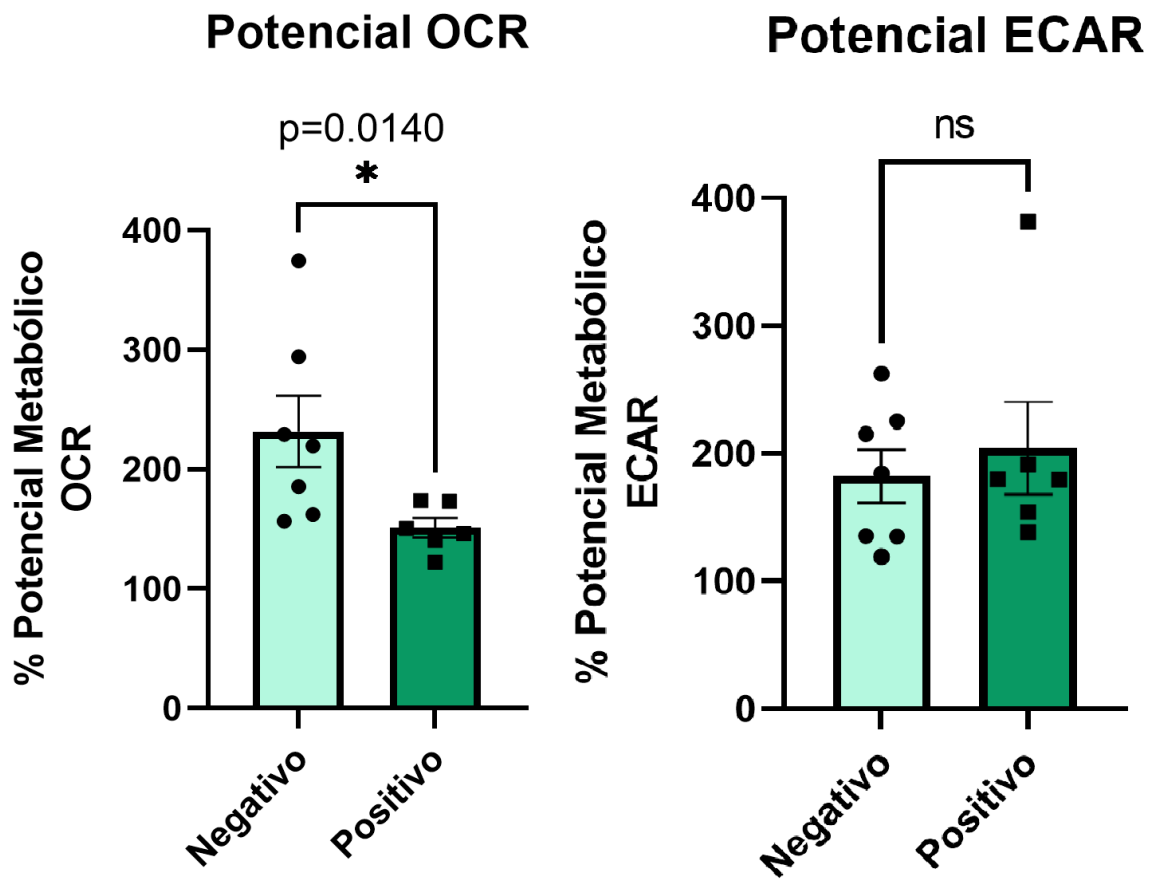


Figura 22.

La EMR se encuentra relacionada significativamente con la disminución del potencial metabólico OCR.

Porcentaje Potencial metabólico OCR relacionadas con la EMR de los pacientes al finalizar el tratamiento de inducción; EMR negativa (n=7) y EMR positiva (n=6). Prueba Mann Whitney

Test U * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Negativo n = 7

Positivo n = 6

De igual manera, se realizó el análisis de *Spearman* para correlacionar las variables cuantitativas en relación con los dos grupos con potencial metabólico diferencial, y se encontró que los valores de los porcentajes del potencial ECAR están relacionados con los valores de la EMR y el mielograma del día 15 de seguimiento de tratamiento de inducción (Figura 23 y Tabla 16). De manera interesante, se encontró que el grupo con potencial metabólico ECAR tenía una correlación significativa con la expresión del gen *IGJ* que presenta un coeficiente de *Spearman* de 0,457, que significa que las dos variables tienden a aumentar o disminuir juntas, y un *p value* de 0,040 que soporta la probabilidad de la coexistencia de la relación. Además, como se puede visualizar en la Figura 20 se observa un aumento de expresión del gen *IGJ* en el grupo de pacientes con potencial metabólico ECAR.

El potencial metabólico del ECAR puede variar entre diferentes tipos celulares y condiciones fisiológicas. Por ejemplo, las células cancerosas a menudo muestran un mayor potencial metabólico ECAR en comparación con las células normales, lo que refleja su alta tasa de metabolismo anaeróbico, y dependencia de la glucólisis para obtener energía en condiciones de estrés celular. Relacionar este fenotipo metabólico con variables de mal pronóstico de la LLA-B, como lo es la expresión del gen *IGJ* y la EMR es evidencia que la modulación metabólica es necesaria y determina el desarrollo leucemogénico.

Tanto las variables clínicas como biológicas de la enfermedad con valor pronóstico son una herramienta fundamental en las personas afectadas con LLA-B para la estratificación e identificación de los grupos de pacientes con mayor riesgo de recaída, lo que es importante para el ajuste del tratamiento con el fin de mejorar los resultados clínicos. Por ejemplo, se ha descrito que según el tipo de tumor y el estadio, algunos pacientes suelen presentar recaídas de la

enfermedad metastásica dentro de los 5 años posteriores al tumor primario a pesar de que inicialmente no presentaban metástasis detectables (Pantel & Alix-Panabières, 2019).

Los datos obtenidos en el presente estudio son claves para sugerir la importancia del metabolismo celular de los linfoblastos tumorales como un factor pronóstico de la enfermedad y abre camino a estudios futuros que permitan la comprensión de las rutas metabólicas y los metabolitos que intervienen y favorecen el proceso leucemogénico, así como opciones terapéuticas encaminadas a mejorar el pronóstico de la enfermedad.

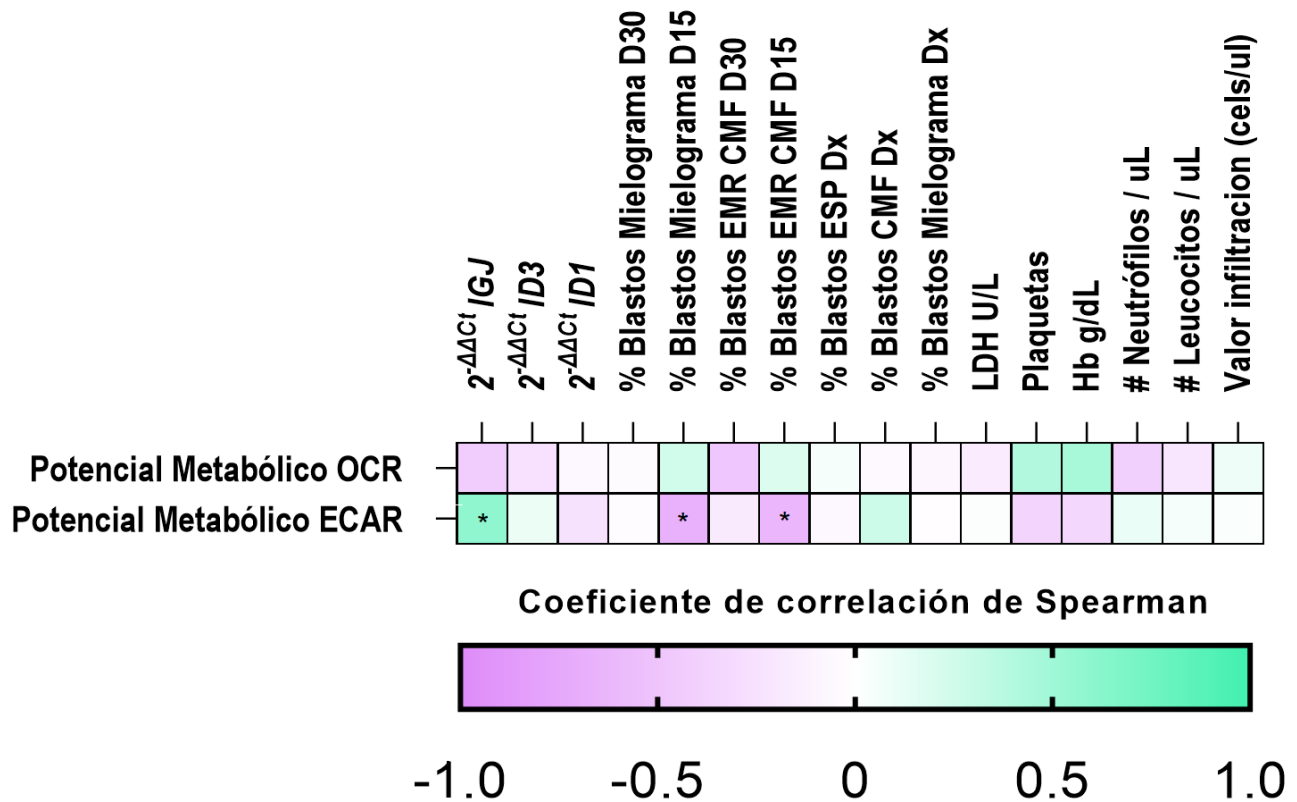
Tabla 16.

Coeficiente de variación de Spearman de los potenciales metabólicos OCR y ECAR en relación con las variables clínicas cuantitativas.

Variables	Spearman <i>r</i>		<i>p</i> Value	
	Potencial Metabólico OCR	Potencial Metabólico ECAR	Potencial Metabólico OCR	Potencial Metabólico ECAR
Edad (Años)	1,000	0,192	0,975	0,537
Valor infiltración (cels/ul)	0,192	1,000	0,784	0,939
# Leucocitos / uL	-0,058	0,108	0,459	0,892
# Neutrófilos / uL	0,187	-0,134	0,163	0,723
Hb g/dL	-0,267	0,015	0,120	0,247
Plaquetas	0,388	0,037	0,171	0,204
LDH U/L	0,380	-0,163	0,579	0,978
% Blastos Mielograma Dx	-0,269	0,302	0,804	0,960
% Blastos CMF Dx	0,057	0,572	0,852	0,380
% Blastos ESP Dx	0,343	0,581	0,889	0,815
% Blastos EMR CMF D15	-0,022	0,059	0,554	0,024
% Blastos EMR CMF D30	0,365	-0,211	0,088	0,541
% Blastos Mielograma D15	-0,084	0,017	0,422	0,011
% Blastos Mielograma D30	0,198	0,394	0,902	0,933
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ID1	-0,485	-0,175	0,835	0,394
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ID3	-0,212	0,201	0,383	0,751
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ IGJ	0,124	0,457	0,140	0,040

Figura 23.

El potencial metabólico ECAR se encuentra relacionado con la presencia de EMR y la expresión del gen IGJ.



Es importante mencionar que para el modelo multivariado se utilizó la regresión logística, la cual permitió analizar la relación entre múltiples variables predictoras (variables clínicas y biológicas de LLA-B) y una variable de respuesta categórica. Mientras que en la regresión logística univariada se considera una única variable predictora, en el caso multivariado se tienen múltiples variables predictoras, es decir, se modela la relación entre las variables predictoras y la probabilidad de ocurrencia de una categoría específica en la variable de respuesta, para este caso de estudio que perteneciera al grupo con potencial metabólico *OCR* o al grupo con potencial

metabólico ECAR. De igual forma, cada variable predictora se asocia con un coeficiente que indica la fuerza y dirección de su influencia en la probabilidad de pertenecer a una categoría determinada.

Al evaluar el impacto pronóstico de los grupos con potencial metabólico diferencial en modelos multivariados por regresión logística para variables cualitativas y cuantitativas no se evidenciaron resultados relevantes.

Tabla 17.

Resultados modelo multivariado para el potencial OCR.

Impacto pronóstico de la firma del potencial OCR en el contexto de otros parámetros clínicos y moleculares			
	Variables	Valor p	OR (IV 95%)
Grupo de variables 1	Potencial OCR	0,972	0,96 (0,13 - 6,60)
	Edad (Años)	0,929	0,99 (0,87 - 1,12)
	EMR D30 > 0,01	0,834	1,31 (0,08 - 19,72)
	Leucocitos/uL > 30.000	0,563	0,43 (0,01 - 7,01)
	Infiltración en el SNC	0,536	2,96 (0,11 - 243,70)
Grupo de variables 2	Potencial OCR	0,415	0,006 (6,281e-011 - 39,31)
	Hb g/dl	0,279	2,43 (0,85 - 32,64)
	LDH U/L	0,746	1,00 (0,99 - 1,00)
	$2^{-\Delta\Delta Ct} ID1 > 1$	0,957	0,97 (0,38 - 2,81)
	$2^{-\Delta\Delta Ct} IGJ > 1$	0,398	0,53 (0,05 - 0,96)

Tabla 18.

Resultados modelo multivariado para el potencial ECAR.

Impacto pronóstico de la firma del potencial ECAR en el contexto de otros parámetros clínicos y moleculares			
	Variables	Valor p	OR (IV 95%)
Grupo de variables 1	Potencial ECAR	0,972	1,03 (0,15 - 7,21)
	Edad (Años)	0,929	1,00 (0,89 - 1,14)
	EMR D30 > 0,01	0,834	0,76 (0,05 - 11,25)
	Leucocitos/uL > 30.000	0,563	2,32 (0,14 - 60,62)
	Infiltración en el SNC	0,536	0,33 (0,004 - 8,42)
Grupo de variables 2	Potencial ECAR	0,415	165,30 (0,025 - 15920856560)
	Hb g/dl	0,279	0,41 (0,99 - 1,00)
	LDH U/L	0,746	0,99 (0,35 - 2,62)
	$2^{-\Delta\Delta C_t} ID1 > 1$	0,957	1,02 (0,35 - 2,62)
	$2^{-\Delta\Delta C_t} IGJ > 1$	0,398	1,86 (1,03 - 18,85)

A continuación, se analizaron cada una de las variables cualitativas en comparación con las variables metabólicas calculadas a través de los ensayos de estrés mitocondrial y tasa glucolítica (Figuras 24 y 25). Los resultados del coeficiente de correlación de *Spearman* sugirieron que la EMR del día 30 tiene una correlación directa con variables metabólicas como la máxima respiración, la capacidad respiratoria de reserva, el porcentaje de la capacidad respiratoria de reserva y con la acidificación posterior a 2-DG, al tener un *p value* de significancia menor a 0,05 (Figura 26). En cuanto a la EMR se observa que los pacientes positivos presentan una disminución de hasta el 40% en la máxima respiración en comparación con los pacientes que no tienen EMR. De igual modo, se observó que los pacientes con EMR tienen la capacidad respiratoria de reserva 2,65 veces menos que los pacientes con EMR negativa, esto es relevante ya que la EMR es una de las variables predictoras del pronóstico para la LLA-B más importantes.

Adicionalmente se evidencian otras relaciones como por ejemplo que la capacidad respiratoria de reserva también tiene una correlación significativa con la alteración genética *ETV RUNX1 TEL-AML1 t(12;21)(p13;q22)*, alteración del cariotipo y el sexo.

Figura 24.

La EMR se relaciona con la máxima respiración y la capacidad respiratoria de reserva.

Evaluación del coeficiente de correlación de Spearman para las variables metabólicas de la prueba de estrés mitocondrial relacionada con variables cualitativas de interés de la LLA-B.

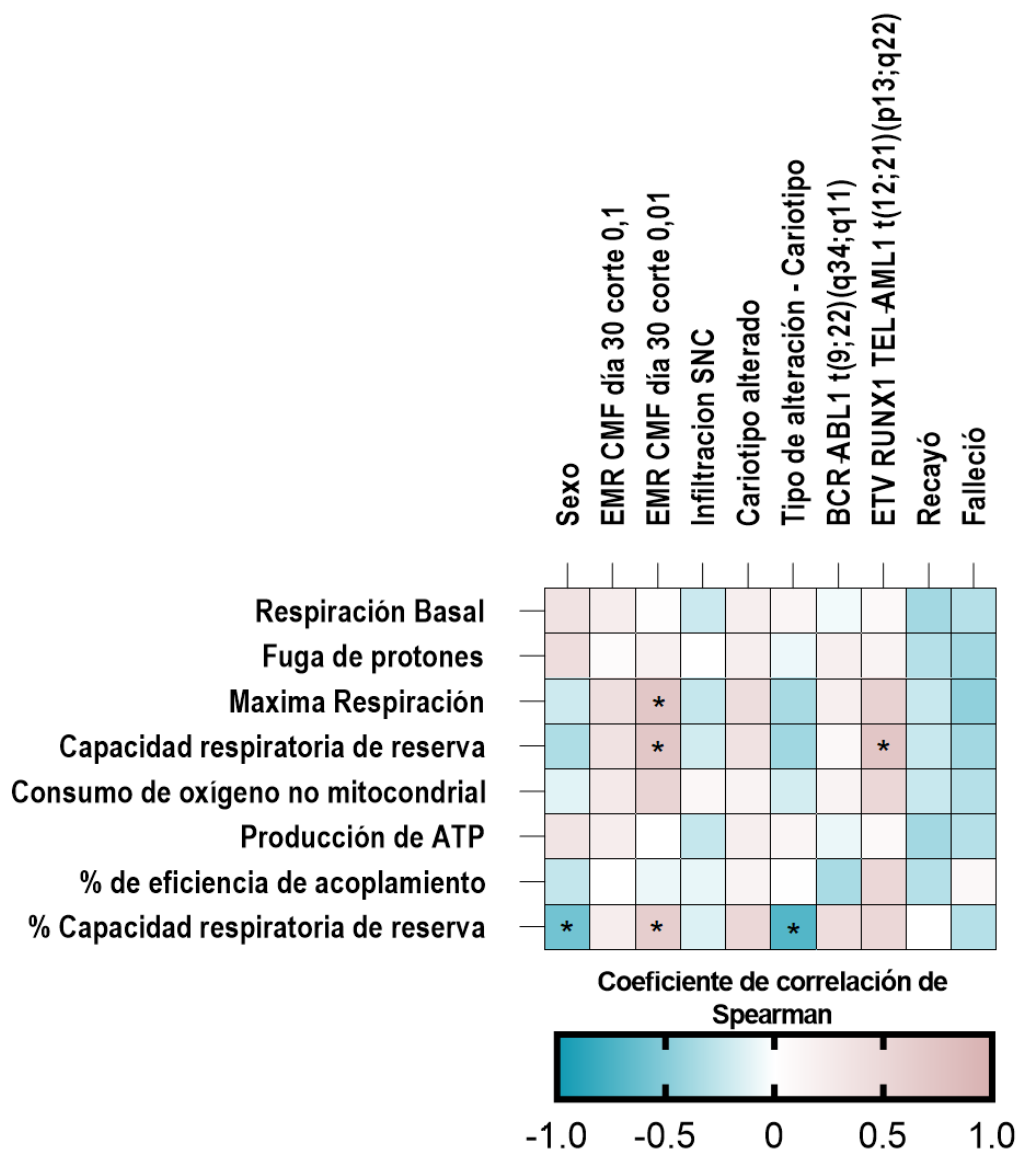


Tabla 19.

Correlación de Spearman entre las variables cualitativas y las variables metabólicas relacionadas con el estrés mitocondrial.

Variables	Respiración Basal		Respiración Basal		Máxima Respiración		Capacidad respiratoria de reserva	
	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value
Sexo	0,360	0,235	0,423	0,171	-0,211	0,524	-0,338	0,284
EMR CMF Día 30 (0,1%)	0,223	0,483	0,045	0,940	0,401	0,199	0,356	0,260
EMR CMF Día 30 (0,01%)	0,021	0,976	0,165	0,628	0,701	0,014	0,701	0,014
Infiltración SNC	-0,220	0,493	0,000	1,000	-0,244	0,469	-0,195	0,573
Cariotipo alterado	0,213	0,610	0,213	0,610	0,426	0,257	0,355	0,352
Tipo de alteración en el cariotipo	0,116	0,746	-0,077	0,833	-0,366	0,293	-0,398	0,253
<i>BCR-ABL1 t(9;22)(q34;q11)</i>	-0,056	0,895	0,195	0,600	0,195	0,600	0,084	0,864
<i>ETV6 RUNX1 TEL-AML1 t(12;21)(p13;q22)</i>	0,071	0,914	0,142	0,762	0,569	0,114	0,711	0,038
Recayó	-0,386	0,308	-0,309	0,462	-0,231	0,615	-0,231	0,615
Falleció	-0,309	0,462	-0,386	0,308	-0,463	0,154	-0,386	0,308

Variables	Consumo de oxígeno no mitocondrial		Producción de ATP		% de eficiencia de acoplamiento		% Capacidad respiratoria de reserva	
	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value
Sexo	-0,127	0,724	0,338	0,284	-0,254	0,435	-0,592	0,045
EMR CMF Día 30 (0,1%)	0,267	0,414	0,223	0,503	0,000	1,000	0,223	0,503
EMR CMF Día 30 (0,01%)	0,536	0,073	0,000	1,000	-0,082	0,836	0,619	0,035
Infiltración SNC	0,098	0,811	-0,244	0,469	-0,098	0,811	-0,146	0,692
Cariotipo alterado	0,142	0,762	0,213	0,610	0,142	0,762	0,497	0,171
Tipo de alteración en el cariotipo	-0,186	0,602	0,116	0,746	0,006	0,994	-0,719	0,026
<i>BCR-ABL1 t(9;22)(q34;q11)</i>	0,139	0,727	-0,084	0,864	-0,362	0,282	0,418	0,209
<i>ETV6 RUNX1 TEL-AML1 t(12;21)(p13;q22)</i>	0,497	0,171	0,071	0,914	0,497	0,171	0,497	0,171
Recayó	-0,231	0,615	-0,386	0,308	-0,309	0,462	0,000	1,000
Falleció	-0,309	0,462	-0,309	0,462	0,077	0,923	-0,309	0,462

Figura 25.

La EMR se relaciona con la acidificación post 2-DG.

Evaluación del coeficiente de correlación de Spearman para las variables metabólicas del ensayo de tasa glucolítica con variables cualitativas de interés de la LLA-B.

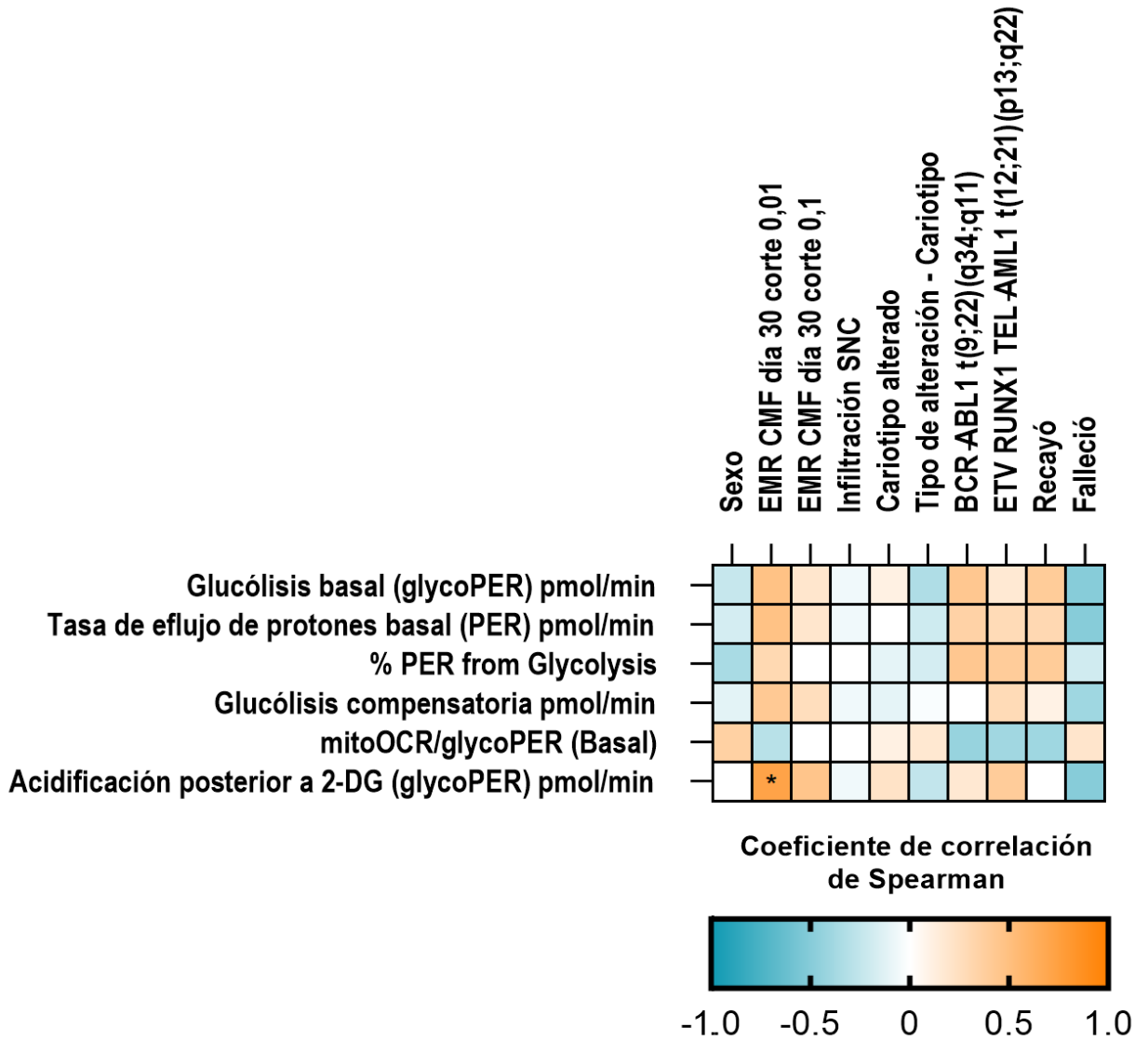


Tabla 20.

Correlación de Spearman entre las variables cualitativas y las variables metabólicas relacionadas con la glucólisis.

Variables	Glucólisis basal (glycoPER) pmol/min		Tasa de flujo de protones basal (PER) pmol/min		% PER from Glycolysis	
	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value
Sexo	-0,239	0,527	-0,179	0,648	-0,359	0,315
EMR CMF Día 30 (0,1%)	0,194	0,630	0,194	0,630	0,000	1,000
EMR CMF Día 30 (0,01%)	0,478	0,164	0,478	0,164	0,299	0,412
Infiltración SNC	-0,065	0,921	-0,065	0,921	0,000	1,000
Cariotipo alterado	0,109	0,886	0,000	1,000	-0,109	0,886
Tipo de alteración en el cariotipo	-0,334	0,424	-0,206	0,643	-0,180	0,686
<i>BCR-ABL1 t(9;22)(q34;q11)</i>	0,435	0,267	0,348	0,400	0,435	0,267
<i>ETV6 RUNX1 TEL-AML1 t(12;21)(p13;q22)</i>	0,169	0,786	0,282	0,571	0,394	0,393
Recayó	0,400	0,364	0,300	0,545	0,400	0,364
Falleció	-0,500	0,182	-0,500	0,182	-0,200	0,727

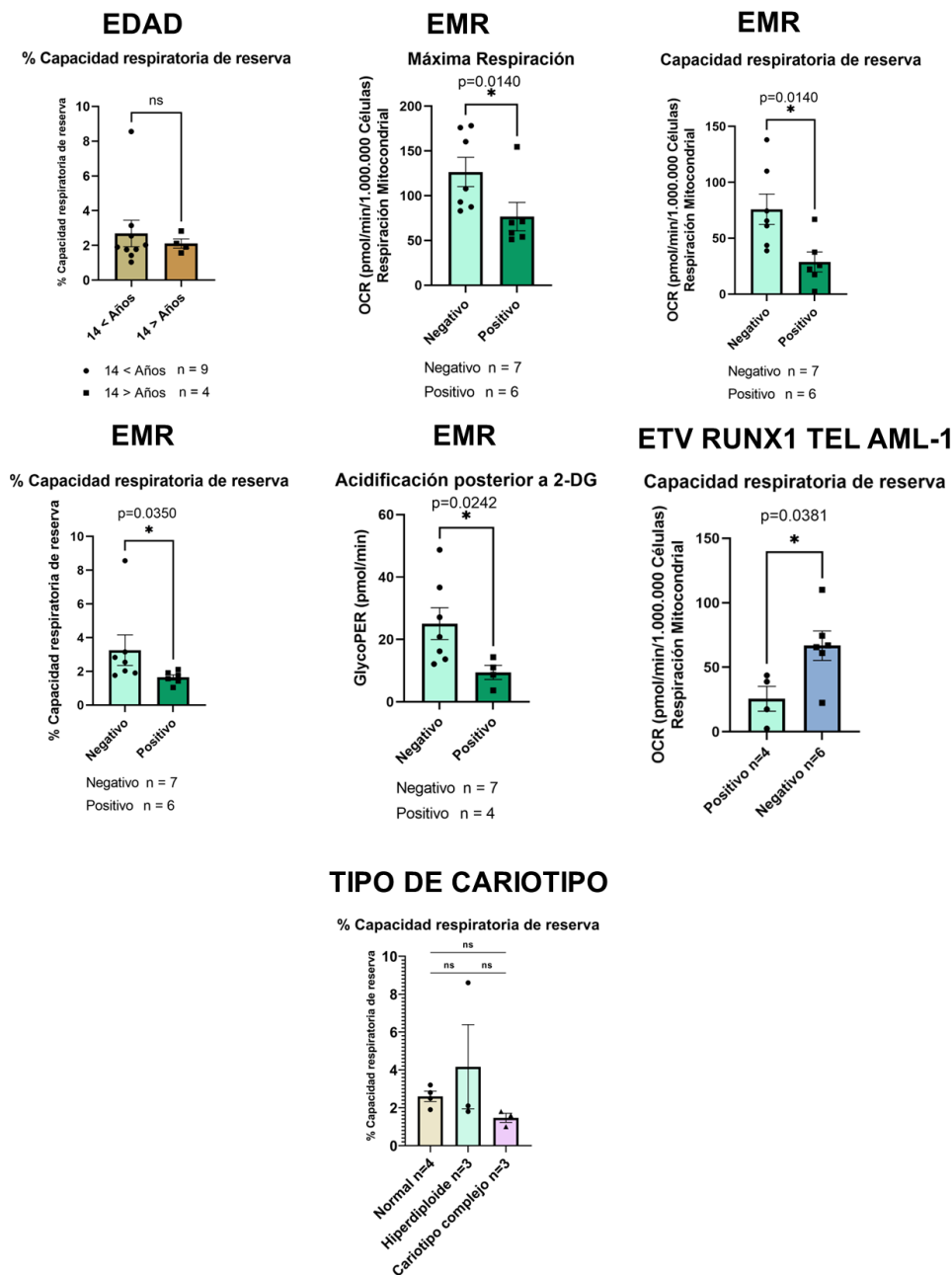
Variables	Glucólisis compensatoria pmol/min		mitoOCR/glycoPER (Basal)		Acidificación posterior a 2- DG (glycoPER) pmol/min	
	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value
Sexo	-0,120	0,788	0,359	0,315	0,000	1,000
EMR CMF Día 30 (0,1%)	0,258	0,497	0,000	1,000	0,452	0,194
EMR CMF Día 30 (0,01%)	0,418	0,230	-0,299	0,412	0,717	0,024
Infiltración SNC	-0,065	0,921	0,000	1,000	-0,065	0,921
Cariotipo alterado	-0,109	0,886	0,109	0,886	0,218	0,686
Tipo de alteración en el cariotipo	-0,026	0,962	0,180	0,686	-0,257	0,543
<i>BCR-ABL1 t(9;22)(q34;q11)</i>	0,000	1,000	-0,435	0,267	0,174	0,711
<i>ETV6 RUNX1 TEL-AML1 t(12;21)(p13;q22)</i>	0,282	0,571	-0,394	0,393	0,394	0,393
Recayó	0,100	0,909	-0,400	0,364	0,000	1,000
Falleció	-0,400	0,364	0,200	0,727	-0,500	0,182

Figura 26.

La enfermedad mínima residual (EMR) está relacionada con variables metabólicas.

Variables metabólicas relacionadas con la edad, la EMR y alteraciones citogenéticas. Se

compararon los grupos a través de la prueba Mann Whitney Test U * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



De igual modo, se analizaron las variables cuantitativas con respecto a las variables metabólicas del estrés mitocondrial y función glucolítica (Tabla 21 y Tabla 22), y se observó que la respiración basal, la fuga de protones y la producción de ATP se correlacionan significativamente con los valores de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y con el número de plaquetas según el test de correlación de *Spearman*.

Por otra parte, los resultados obtenidos evidenciaron que los niveles de hemoglobina están asociados con las diferentes variables metabólicas, de hecho aquellos pacientes con hemoglobina menor a 11 g/dL en el momento del diagnóstico presentaron un mayor porcentaje de potencial metabólica ECAR en condición de estrés celular, y menores valores relacionados con la máxima respiración, la capacidad respiratoria de reserva, el consumo de oxígeno no mitocondrial, la glucólisis basal y la tasa de flujo de protones (Figura 27 y 30), lo que se soporta la importancia de la hemoglobina para permitir la disponibilidad del oxígeno en el microambiente de la médula ósea. De hecho, se ha publicado que aproximadamente el 75 % de los niños con LLA-B tendrán anemia significativa con hemoglobina inferior a 10 g/dL (Steele & Narendran, 2012), por lo que la contribución de la hemoglobina en el desarrollo de la enfermedad es relevante.

También, se encontró que la expresión del gen *IGJ* se encuentra relacionado con otras variables metabólicas como la respiración basal, la producción de ATP, la glucólisis basal, el porcentaje PER y el coeficiente *MitoOCR/GlycoPER* (Figura 28 y 30); lo que sugiere un papel directo o indirecto en la modulación del metabolismo.

En consecuencia, se estableció que la expresión del perfil genético de *IGJ* por sí solo, sin la condición de la expresión génica de los otros genes de mal pronóstico *ID1* e *ID3*, es un potencial biomarcador de LLA-B en la población colombiana, ya que el aumento de la expresión del génica de *IGJ* en linfoblastos tumorales se relaciona con un mayor porcentaje del potencial ECAR, y

modular diferentes variables metabólicas. Por su parte, el análisis de los genes *ID1* e *ID3* no evidenciaron relación con el metabolismo energético de las células tumorales.

Otros hallazgos encontrados en el análisis de los datos revelaron que el porcentaje de eficiencia de acoplamiento se encuentra vinculado con la edad de los pacientes (Figura 28 y Apéndice H), y que el porcentaje de blastos del mielograma en el momento del diagnóstico está relacionado con la glucólisis compensatoria (Figura 29).

Figura 27.

Correlación de Spearman entre las variables cuantitativas y las variables metabólicas relacionadas con el estrés mitocondrial.

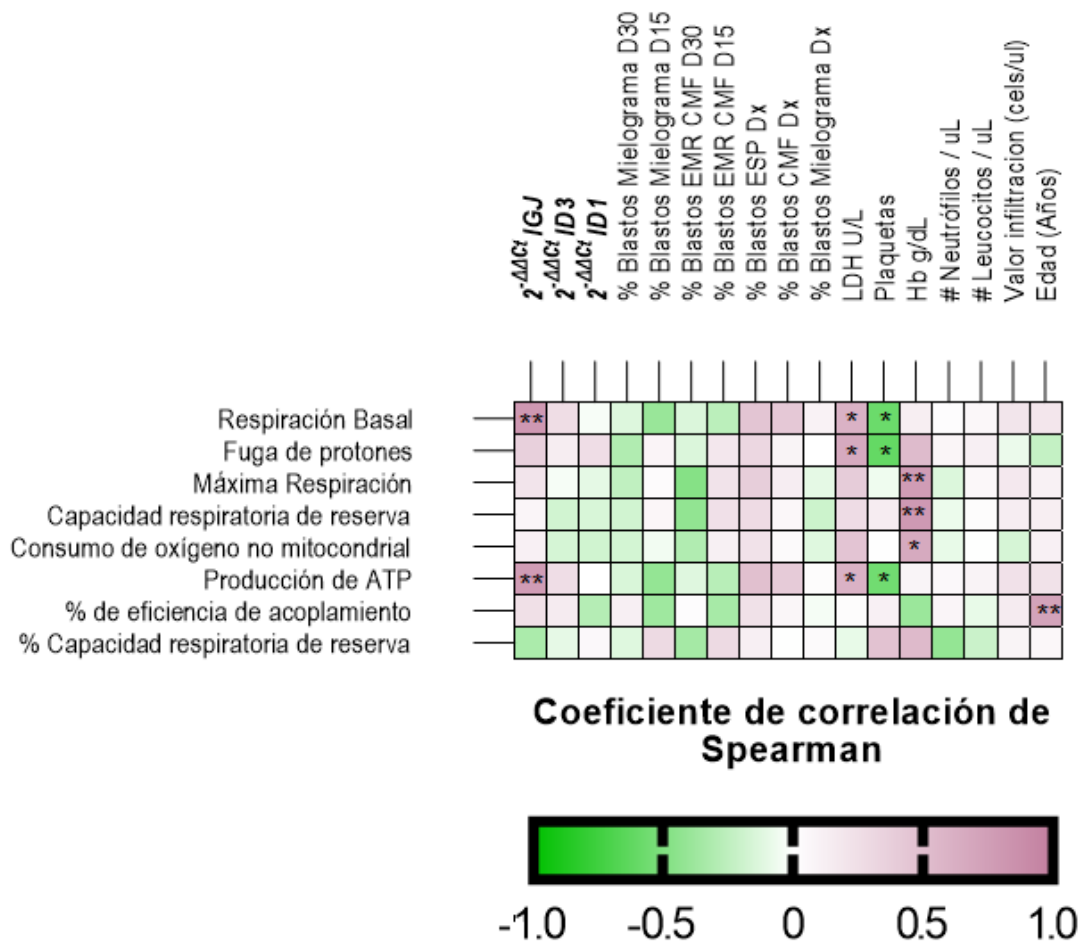


Tabla 21.

Correlación de Spearman entre las variables cuantitativas y las variables metabólicas relacionadas con el estrés mitocondrial.

Variables	Respiración Basal		Fuga de protones		Máxima Respiración		Capacidad respiratoria de reserva	
	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value
Valor infiltración (cels/ul)	0,199	0,518	-0,082	0,794	0,175	0,571	0,134	0,666
Edad (Años)	0,189	0,532	-0,231	0,444	0,105	0,733	0,129	0,672
# Leucocitos / uL	0,058	0,853	0,121	0,696	0,060	0,849	0,022	0,949
# Neutrófilos / uL	0,019	0,953	0,077	0,806	-0,137	0,656	-0,077	0,806
Hb g/dL	0,127	0,679	0,527	0,067	0,769	0,003	0,791	0,002
Plaquetas	-0,581	0,040	-0,608	0,030	-0,063	0,838	0,146	0,633
LDH U/L	0,597	0,034	0,659	0,017	0,396	0,182	0,269	0,373
% Blastos Mielograma Dx	0,095	0,767	0,000	1,000	-0,105	0,745	-0,204	0,523
% Blastos CMF Dx	0,426	0,146	0,085	0,781	0,135	0,658	0,055	0,859
% Blastos ESP Dx	0,453	0,121	0,305	0,310	0,379	0,202	0,277	0,358
% Blastos EMR CMF D15	-0,267	0,375	0,181	0,554	0,214	0,482	0,236	0,437
% Blastos EMR CMF D30	-0,143	0,636	-0,144	0,635	-0,477	0,101	-0,431	0,142
% Blastos Mielograma D15	-0,401	0,173	0,080	0,796	0,028	0,931	0,063	0,838
% Blastos Mielograma D30	-0,136	0,652	-0,308	0,303	-0,248	0,409	-0,182	0,547
2^{-ΔΔCt} ID1	-0,033	0,917	0,258	0,394	-0,104	0,737	-0,154	0,617
2^{-ΔΔCt} ID3	0,261	0,386	0,137	0,656	-0,038	0,906	-0,181	0,554
2^{-ΔΔCt} IGJ	0,801	0,002	0,363	0,224	0,203	0,505	0,071	0,821

Variables	Consumo de oxígeno no mitocondrial		Producción de ATP		% de eficiencia de acoplamiento		% Capacidad respiratoria de reserva	
	<i>Spearman r</i>	<i>p Value</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p Value</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p Value</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p Value</i>
Valor infiltración (cels/ul)	-0,163	0,598	0,227	0,458	0,149	0,636	0,085	0,784
Edad (Años)	0,110	0,719	0,226	0,455	0,714	0,008	0,055	0,859
# Leucocitos / uL	-0,005	0,993	0,088	0,778	-0,093	0,765	-0,209	0,493
# Neutrófilos / uL	-0,093	0,765	0,049	0,878	0,071	0,821	-0,423	0,152
Hb g/dL	0,659	0,017	0,082	0,793	-0,396	0,182	0,533	0,064
Plaquetas	0,006	0,989	-0,558	0,050	0,113	0,713	0,470	0,106
<i>LDH U/L</i>	0,456	0,120	0,599	0,034	0,022	0,949	-0,093	0,765
% Blastos Mielograma Dx	-0,126	0,695	0,021	0,952	-0,042	0,899	0,039	0,908
% Blastos CMF Dx	0,036	0,909	0,402	0,173	0,069	0,824	-0,006	0,989
% <i>Blastos ESP Dx</i>	0,226	0,456	0,492	0,091	0,232	0,444	0,119	0,701
% Blastos EMR CMF D15	0,115	0,710	-0,280	0,353	-0,346	0,247	0,286	0,344
% Blastos EMR CMF D30	-0,306	0,305	-0,127	0,676	0,017	0,958	-0,355	0,231
% Blastos Mielograma D15	-0,052	0,867	-0,421	0,153	-0,380	0,200	0,286	0,340
% Blastos Mielograma D30	-0,174	0,567	-0,153	0,616	0,123	0,688	-0,126	0,680
2^{-ΔΔCt} ID1	-0,187	0,541	0,000	1,000	-0,291	0,334	0,049	0,878
2^{-ΔΔCt} ID3	-0,165	0,591	0,258	0,394	0,154	0,617	-0,099	0,751
2^{-ΔΔCt} IGJ	0,110	0,723	0,769	0,003	0,242	0,426	-0,330	0,271

Figura 28.

Variables metabólicas de la respiración mitocondrial se encuentran relacionadas con variables clínicas y biológicas de diagnóstico de la LLA-B.

Variables metabólicas relacionadas con la expresión del gen IGJ, el número de plaquetas y la concentración de hemoglobina. Se compararon los grupos a través de la prueba Mann Whitney

*Test U * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.*

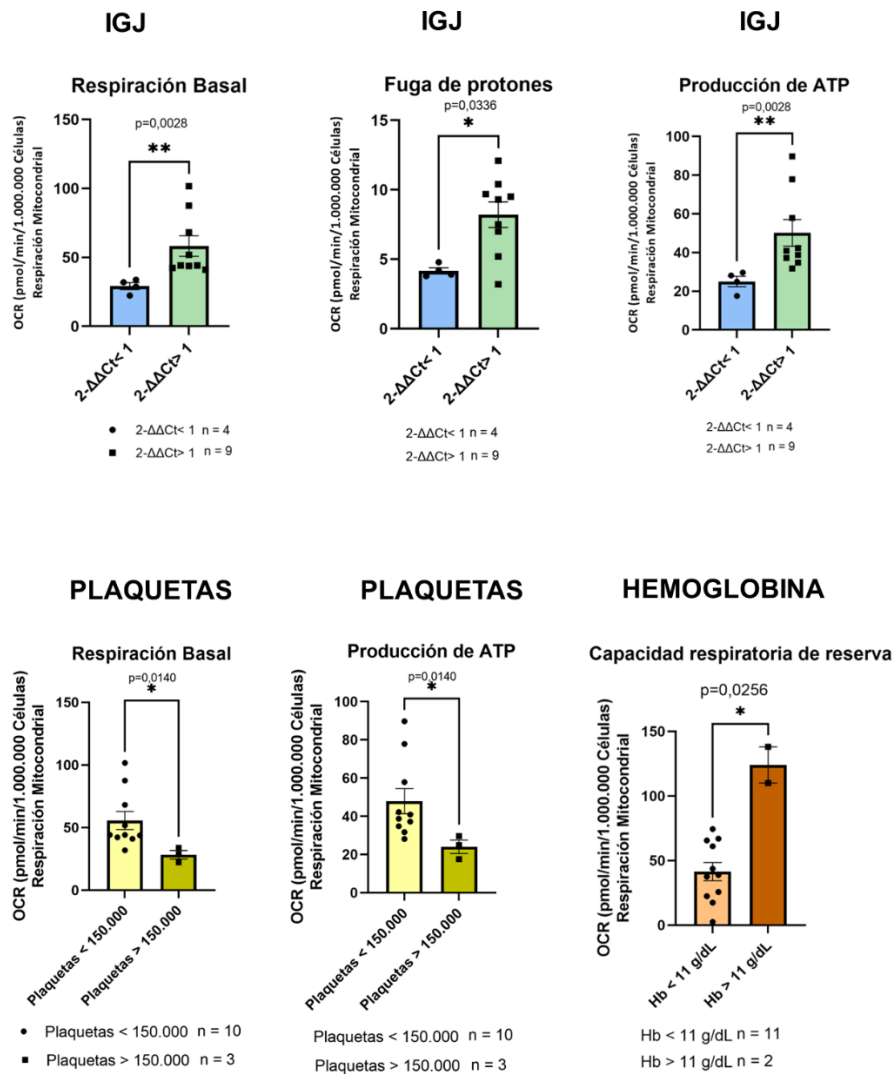


Figura 29.

Correlación de Spearman entre las variables cuantitativas y las variables metabólicas relacionadas con la tasa glucolítica.

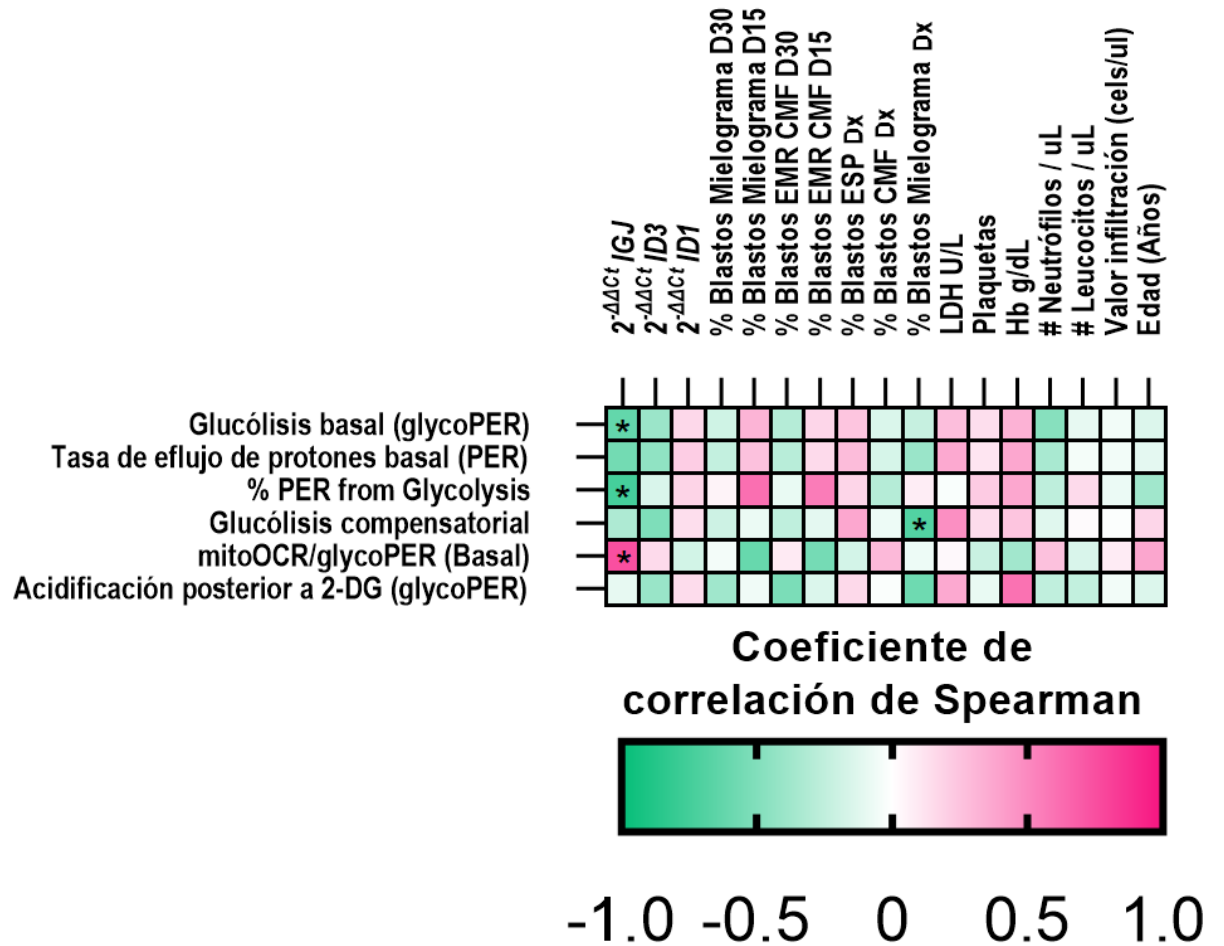


Tabla 22.

Correlación de Spearman entre las variables cuantitativas y las variables metabólicas relacionadas con la glucólisis.

Variables	Glucólisis basal (glycoPER)		Tasa de flujo de protones basal (PER)		% PER from Glycolysis	
	<i>Spearman r</i>	<i>p Value</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p Value</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p Value</i>
Valor infiltración (cels/ul)	-0,052	0,879	-0,052	0,879	-0,081	0,824
Edad (Años)	-0,141	0,678	-0,109	0,749	-0,378	0,251
# Leucocitos / uL	-0,100	0,776	-0,045	0,903	0,155	0,654
# Neutrófilos / uL	-0,482	0,138	-0,345	0,299	-0,264	0,435
Hb g/dL	0,327	0,327	0,373	0,261	0,373	0,261
Plaquetas	0,136	0,694	0,109	0,755	0,218	0,521
LDH U/L	0,273	0,418	0,364	0,273	-0,027	0,946
% Blastos Mielograma Dx	-0,231	0,519	-0,407	0,242	0,073	0,845
% Blastos CMF Dx	-0,151	0,657	-0,164	0,628	-0,297	0,373
% Blastos ESP Dx	0,247	0,460	0,284	0,393	0,177	0,600
% Blastos EMR CMF D15	0,173	0,615	0,155	0,654	0,555	0,082
% Blastos EMR CMF D30	-0,297	0,370	-0,287	0,387	-0,089	0,794
% Blastos Mielograma D15	0,318	0,342	0,264	0,435	0,609	0,052
% Blastos Mielograma D30	-0,194	0,564	-0,244	0,467	0,050	0,889
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ID1	0,164	0,634	0,209	0,539	0,182	0,595
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ID3	-0,400	0,225	-0,445	0,173	-0,155	0,654
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ IGJ	-0,627	0,044	-0,564	0,076	-0,745	0,011

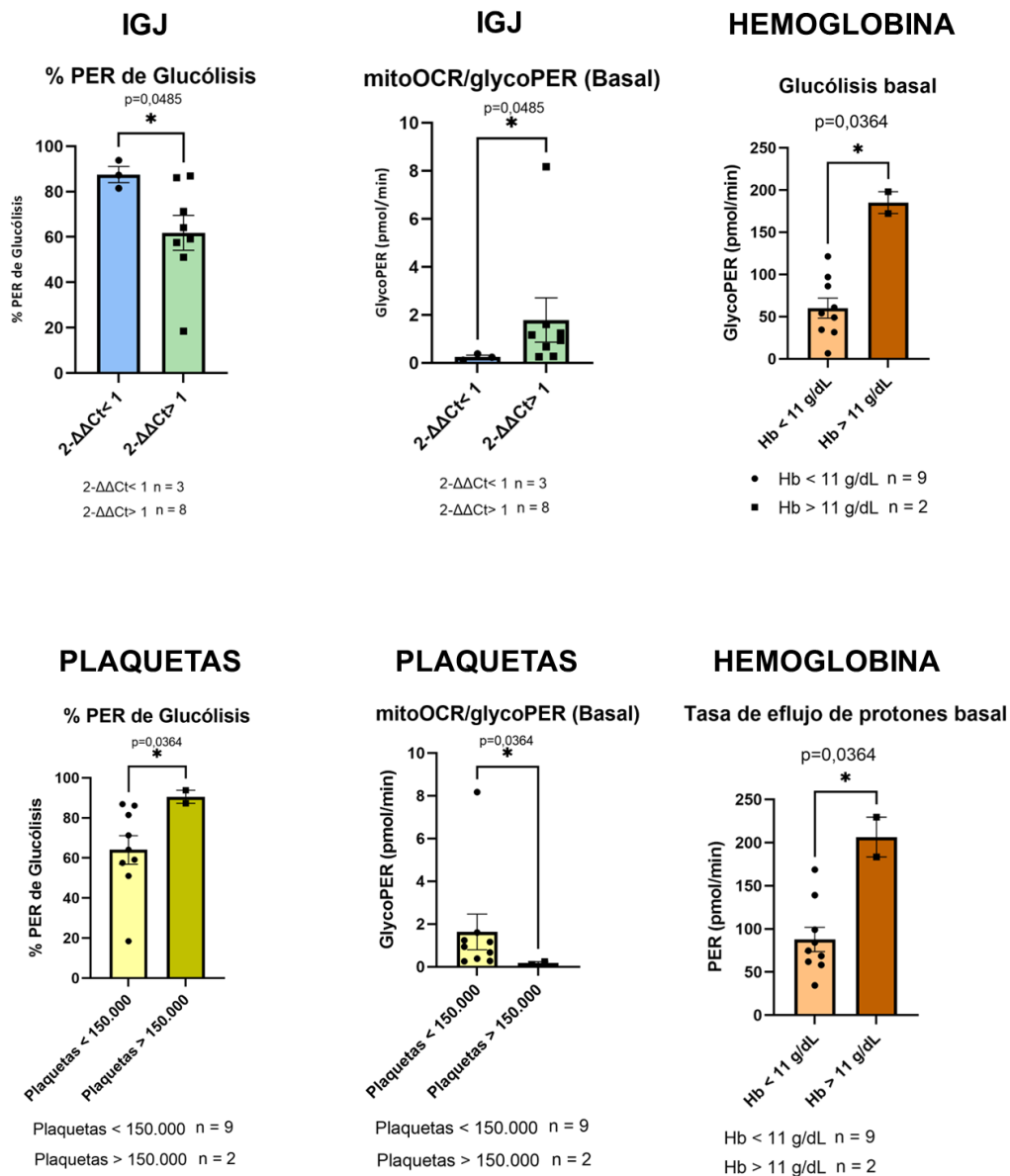
Variables	Glucólisis compensatoria		<i>mitoOCR/glycoPER</i> (Basal)		Acidificación posterior a 2-DG (<i>glycoPER</i>)	
	<i>Spearman r</i>	<i>p Value</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p Value</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p Value</i>
Valor infiltración (cels/ul)	-0,017	0,968	0,081	0,824	-0,052	0,879
Edad (Años)	0,173	0,608	0,378	0,251	-0,141	0,678
# Leucocitos / uL	0,018	0,967	-0,155	0,654	-0,245	0,468
# Neutrófilos / uL	-0,127	0,714	0,264	0,435	-0,255	0,451
Hb g/dL	0,245	0,468	-0,373	0,261	0,600	0,056
Plaquetas	0,145	0,673	-0,218	0,521	-0,091	0,796
LDH U/L	0,473	0,146	0,027	0,946	0,364	0,273
% Blastos Mielograma Dx	-0,693	0,031	-0,073	0,845	-0,584	0,082
% Blastos CMF Dx	-0,073	0,833	0,297	0,373	-0,023	0,951
% Blastos ESP Dx	0,372	0,257	-0,177	0,600	0,158	0,640
% Blastos EMR CMF D15	-0,109	0,755	-0,555	0,082	-0,145	0,673
% Blastos EMR CMF D30	-0,258	0,440	0,089	0,794	-0,530	0,096
% Blastos Mielograma D15	-0,082	0,818	-0,609	0,052	-0,064	0,860
% Blastos Mielograma D30	-0,204	0,545	-0,050	0,889	-0,383	0,244
<i>2-^{ACt} ID1</i>	0,136	0,694	-0,182	0,595	0,145	0,673
<i>2-^{ACt} ID3</i>	-0,518	0,107	0,155	0,654	-0,409	0,214
<i>2-^{ACt} IGJ</i>	-0,327	0,327	0,745	0,011	-0,100	0,776

Figura 30.

VARIABLES METABÓLICAS DE LA GLUCÓLISIS SE ENCUENTRAN RELACIONADAS CON VARIABLES CLÍNICAS Y BIOLÓGICAS DE DIAGNÓSTICO DE LA LLA-B.

VARIABLES METABÓLICAS RELACIONADAS CON LA EXPRESIÓN DEL GEN IGJ, EL NÚMERO DE PLAQUETAS Y LA CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA. SE COMPARARON LOS GRUPOS A TRAVÉS DE LA PRUEBA MANN WHITNEY TEST U

p < 0,05, **p < 0,01, *p < 0,001.*



5.5 Comparación de la expresión génica de *ID1*, *ID3* e *IDJ* en relación con variables clínicas de la LLA-B

A su vez, se evaluó el impacto entre la expresión génica de *ID1*, *ID3* e *IGJ* de manera independiente con cada una de las diferentes variables clínicas (Tabla 26). Es importante señalar, que en el momento de realizar el análisis de la expresión génica de *ID1*, *ID3* e *IGJ* se tuvieron en cuenta los diferentes grupos al establecer el percentil 25, el percentil 50 y la expresión $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mayor a 1 para cada uno de estos genes.

En cuanto a la expresión génica de *IGJ* mostró asociación con variables clínicas como la edad, la SLE y la SG al presentar p value de 0,0335 (*), 0,0004 (***) y 0,0031 (**) respectivamente, que son aspectos determinantes de la enfermedad (Tabla 26) (Figura 31 y 34). Es decir, nuevamente se confirma la calidad pronóstica de la expresión del gen *IGJ*, y su relevancia en el desarrollo de la leucemogénesis en pacientes colombianos diagnosticados con LLA-B.

Por su parte, se encontró que la expresión de gen *ID1* estaba relacionada con la presencia de *ETV6-RUNX1* (Figura 31). Sin embargo, la expresión del gen *ID1* no mostró relación con otras variables importantes del desarrollo de la enfermedad (Figura 32).

También, se identificó que el grupo del percentil 25 con menor expresión de *ID3* estaba relacionado con mayor número de plaquetas en el momento de diagnóstico de los pacientes (Figura 31 y Apéndice I). También se evaluaron otras características clínicas en relación con la expresión del gen *ID3* pero no se encontraron hallazgos importantes (Figura 33).

En consecuencia, la evaluación de la relación de la expresión génica de los genes con las variables clínicas sugiere que solo el gen *IGJ* tiene relevancia en la supervivencia, mientras que *ID1* y *ID3* no evidencian la relación.

Figura 31.

La expresión génica de IGJ es un factor pronóstico determinante en la LLA-B.

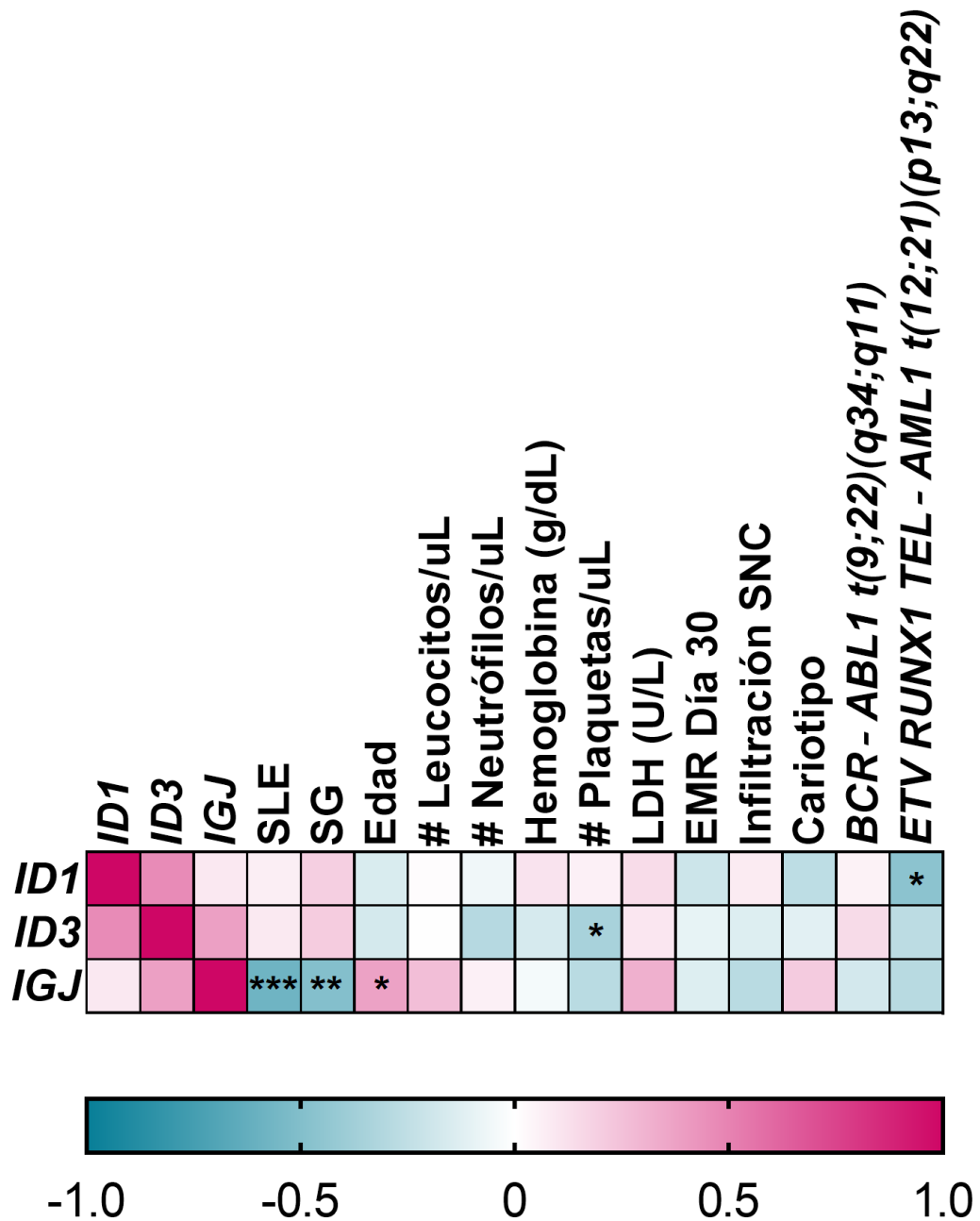


Tabla 23.

Correlación de Spearman entre la expresión génica de ID1, ID3 e IGJ y variables clínicas de la LLA-B.

Variables	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ID1		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ID3		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ IGJ	
	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value	Spearman r	p Value
SLE	0,0676	0,7087	0,0858	0,6350	-0,5836	0,0004
SG	0,1926	0,2830	0,2033	0,2566	-0,4997	0,0031
Edad	-0,1550	0,3892	-0,1771	0,3241	0,3712	0,0335
# Leucocitos/uL	0,0104	0,9544	0,0027	0,9882	0,2584	0,1466
# Neutrófilos/uL	-0,0635	0,7255	-0,2978	0,0923	0,0572	0,7521
Hemoglobina (g/dL)	0,1103	0,5412	-0,1664	0,3546	-0,0465	0,7974
# Plaquetas/uL	0,0582	0,7478	-0,3544	0,0430	-0,2859	0,1068
LDH (U/L)	0,1380	0,4436	0,0973	0,5903	0,3148	0,0743
EMR Día 30	-0,2069	0,2560	-0,0983	0,5923	-0,1390	0,4479
<i>Infiltración SNC</i>	0,0780	0,6712	-0,1387	0,4489	-0,2862	0,1123
<i>Cariotipo</i>	-0,2675	0,1961	-0,1184	0,5730	0,2061	0,3229
BCR-ABL1 t(9;22)(q34;q11)	0,0519	0,7929	0,1443	0,4638	-0,1789	0,3623
ETV6 RUNX1 TEL-AML1 t(12;21)(p13;q22)	-0,4665	0,0286	-0,2735	0,2181	-0,2896	0,1912

Figura 32.

Expresión génica de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ID1 > 1 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.

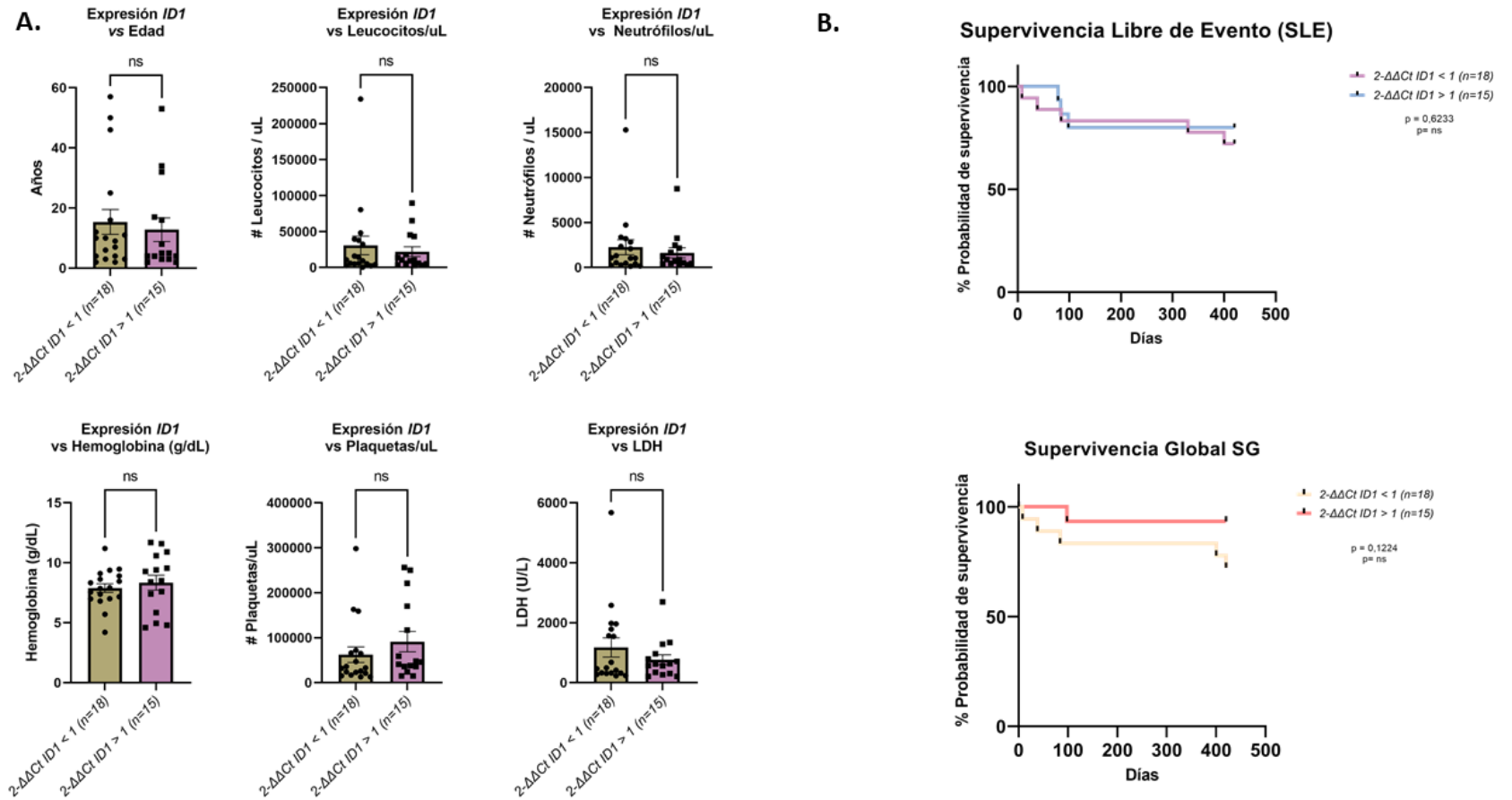


Figura 33.

Expresión génica de $2^{-\Delta\Delta Ct} ID3 > 1$ en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.

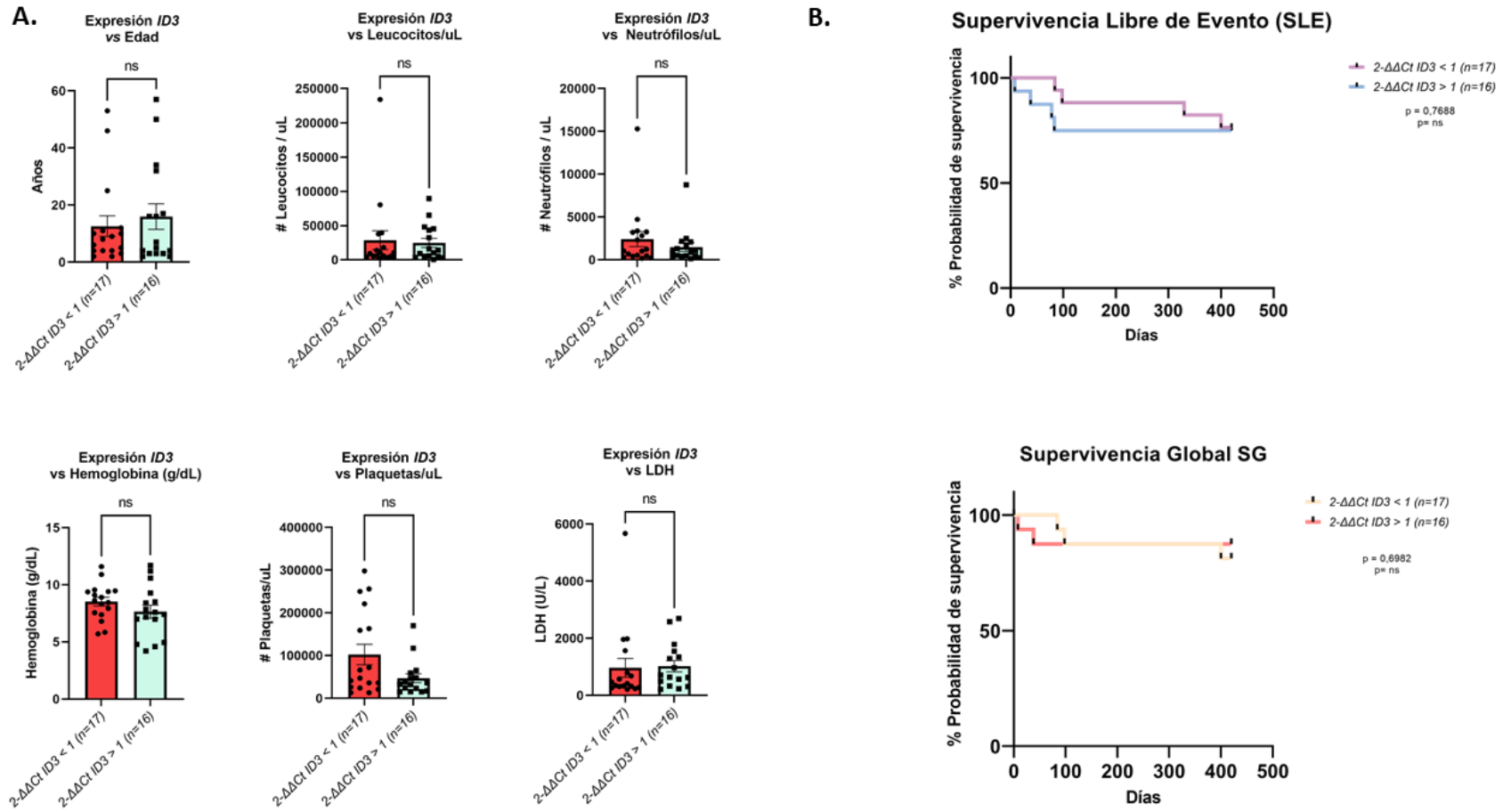
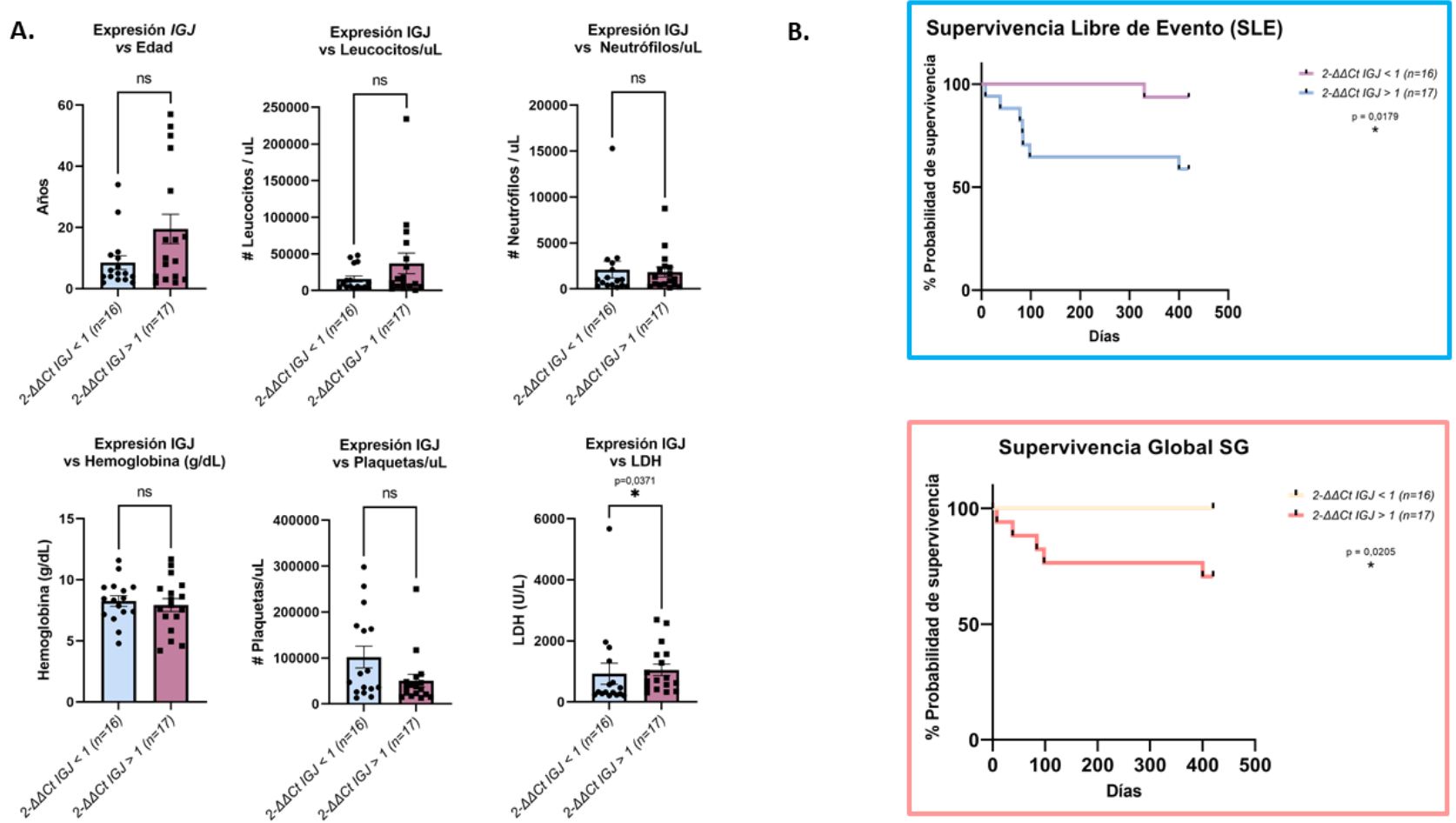


Figura 34.

El aumento de la expresión génica de IGJ se relaciona directamente con la disminución de la SLE y la SG en la LLA-B.



Finalmente, se realizó la regresión lineal multivariada que es una técnica estadística utilizada para analizar la relación entre varias variables independientes (o predictoras) y una variable dependiente continua. En este tipo de modelo busca explicar la relación entre las variables predictoras y la variable de respuesta que para este caso fueron usadas las SLE y la SG. Los análisis realizados en nuestro estudio mostraron que el modelo multivariado determinó que la edad de los pacientes, la concentración de hemoglobina en el momentos del diagnóstico, la presencia de la translocación BCR-ABL1 y la expresión del gen *IGJ* eran variables predictoras relacionadas con la SLE. Asimismo, se determinó que la edad tenía impacto pronóstico en la SG (Tabla 24 y 25). Todo lo anteriormente descrito, justifica la importancia del gen *IGJ* como variable de impacto pronóstico de la LLA-B, y que es capaz de modelar el metabolismo de la enfermedad para favorecer los procesos leucemogénicos.

Tabla 24.

Resultados modelo multivariado con regresión lineal para la SLE.

Impacto pronóstico de la expresión génica de <i>ID1</i>, <i>ID3</i> e <i>IGJ</i> en el contexto de otros parámetros clínicos y moleculares para el evento de la Supervivencia Libre de Evento (SLE)		
Variable	Valor p	OR (IV 95%)
Edad (años)	0,0071 (**)	1,52 (-8,16 a -1,57)
# Leucocitos / uL	0,1345	0,0004 (-0,0002 a 0,0016)
# Neutrófilos / uL	0,1024	0,013 (-0,051 a 0,005)
Hemoglobina g/dL	0,0085 (**)	10,09 (-53,05 a -9,44)
# Plaquetas / uL	0,512	0,0004 (-0,0011 a 0,0006)
LDH U/L	0,847	0,02 (-0,04 a 0,05)
Sexo [Hombre]	0,923	47,16 (-97,23 a 106,50)
Infiltración SNC [SI]	0,9959	48,87 (-105,80 a 105,30)
EMR CMF DIA 30 (>0,01%)[Positivo]	0,6649	42,30 (-110,10 a 72,64)
BCR-ABL1 t(9;22)(q34;q11)[Positiva]	0,0338 (*)	62,17 (13,12 a 281,70)
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ <i>ID1</i> > 1	0,3105	47,41 (-152,50 a 52,39)
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ <i>ID3</i> > 1	0,4881	53,05 (-76,76 a 152,50)
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ <i>IGJ</i> > 1	0,0345 (*)	43,51 (8,74 a 196,70)

Tabla 25.

Resultados modelo multivariado con regresión lineal para la SG.

Impacto pronóstico de la expresión génica de <i>ID1</i>, <i>ID3</i> e <i>IGJ</i> en el contexto de otros parámetros clínicos y moleculares para el evento de la Supervivencia Global (SG)		
Variable	Valor p	OR (IV 95%)
Edad (años)	0,0229 (*)	1,69 (-8,04 a -0,71)
# Leucocitos / uL	0,5604	0,0004 (-0,0007 a 0,0013)
# Neutrófilos / uL	0,5372	0,01 (-0,02 a 0,04)
Hemoglobina g/dL	0,166	11,22 (-40,72 a 7,77)
# Plaquetas / uL	0,7053	0,0004 (-0,0011 a 0,0008)
LDH U/L	0,6199	0,02 (-0,06 a 0,04)
Sexo [Hombre]	0,5316	52,45 (-79,60 a 147,00)
infiltración SNC [SI]	0,5154	54,35 (-153,80 a 81,07)
EMR CMF DIA 30 (>0,01%)[Positivo]	0,4743	47,05 (-66,98 a 136,30)
BCR-ABL1 t(9;22)(q34;q11)[Positiva]	0,4685	69,15 (-97,75 a 201,00)
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ <i>ID1</i> > 1	0,6971	52,74 (-134,90 a 92,94)
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ <i>ID3</i> > 1	0,9676	59,0 (-129,9 a 125,0)
$2^{-\Delta\Delta Ct}$ <i>IGJ</i> > 1	0,2651	48,39 (-48,18 a 160,90)

6. Discusión

El estudio de las condiciones metabólicas como determinante biológico del cáncer es un punto clave en la investigación desde la década de los 50's cuando Otto Warburg expone el comportamiento metabólico diferencial entre las células normales y las células tumorales (Warburg, 1956). Para lo cual, se evaluó el metabolismo de los linfoblastos tumorales de pacientes diagnosticados por primera vez con LLA-B a través de dos ensayos experimentales: el ensayo de estrés mitocondrial y el ensayo de la tasa glucolítica.

Es interesante notar que los ensayos demostraron una actividad metabólica menos energética y con signos de quiescencia en los linfoblastos tumorales de los pacientes en

comparación con la línea celular de referencia NALM-6. A pesar de esto, se observó una actividad metabólica similar entre la glucólisis y la respiración mitocondrial (Figura 15.A). Esto resalta la importancia crucial que tienen para los linfoblastos tumorales el mantener activas estas vías metabólicas fundamentales para la generación de energía. A pesar de su estado metabólico menos energético, la similitud en la actividad entre la glucólisis y la respiración mitocondrial sugiere una estrategia adaptativa en estos linfoblastos para garantizar un suministro continuo de energía.

El ensayo de estrés mitocondrial fue fundamental para identificar y caracterizar el fenotipo energético metabólico de los linfoblastos tumorales en términos de sus capacidades metabólicas tanto en condiciones basales como bajo estrés. Esta metodología proporcionó información valiosa sobre cómo estas células responden y se comportan en términos de su metabolismo energético cuando se enfrentan a condiciones anormales, lo que permite comprender mejor sus características metabólicas basales y su capacidad de adaptación ante situaciones desafiantes, como lo puede llegar a ser la respuesta a tratamientos quimioterapéuticos.

Dicho ensayo permite medir la Tasa de Consumo de Oxígeno (OCR) y la Tasa de Acidificación Extracelular (ECAR), antes y después de la administración del protonóforo FCCP (carbocianina trifluorometoxifenilhidrazona) que propició un estado de estrés celular. A través de estas mediciones, también se pudo calcular el porcentaje del potencial metabólico, el cual se refiere a la capacidad de las células para cumplir con una demanda energética en condiciones de estrés. Este potencial se evaluó tanto para la respiración mitocondrial mediante la medición de *OCR*, como para la glucólisis a través del *ECAR*.

Los hallazgos revelaron que, a pesar de que todos los linfoblastos tumorales de pacientes con LLA-B emplean tanto la vía metabólica de la respiración como la glucolítica, se pudo identificar un comportamiento metabólico diferenciado entre dos grupos: El grupo 1 presentaba

una mayor actividad respiratoria bajo estrés, mientras que el grupo 2 respondía a la demanda energética con un incremento en la actividad glucolítica. Esta distinción en la respuesta metabólica sugiere una variabilidad en cómo estas células abordan las exigencias energéticas, lo que podría tener implicaciones importantes en la comprensión del comportamiento de la enfermedad y en el diseño de enfoques terapéuticos más específicos.

Por ejemplo, en el ensayo de estrés mitocondrial, se registraron inicialmente los niveles de consumo de oxígeno celular para determinar la respiración basal, la cual está vinculada a la cantidad de oxígeno que las células necesitan naturalmente para producir ATP. Los resultados revelaron que un incremento en la respiración basal estaba asociado al grupo 2, caracterizado por el potencial metabólico con aumento de la actividad glucolítica. Después, se administró oligomicina, un agente que inhibe la ATPasa sintetasa o complejo V de la Cadena de Transporte de Electrones (CTE), lo que resultó en una considerable reducción tanto de la actividad respiratoria como de la producción de energía en forma de ATP por parte de las células. Al contrastar la producción de ATP como variable metabólica entre los dos grupos, se determinó que el Grupo 2 mostraba una producción de ATP superior a la del grupo 1. Este hallazgo sugiere que el grupo 2 exhibe una mayor eficiencia energética.

Posteriormente, se procedió a la administración del FCCP, un compuesto químico capaz de transportar protones a través del desacoplamiento de las membranas mitocondriales, lo que conlleva a la disipación del gradiente de protones. Esta acción induce estrés celular, simulando una mayor demanda energética fisiológica en las células, lo que obligó a un incremento en la tasa máxima de consumo de oxígeno a través de la CTE, y que fue evidenciada como la máxima respiración medida. Asimismo, se calculó la capacidad respiratoria de reserva al restar la respiración basal de la máxima respiración, lo cual representa la habilidad de la célula para

satisfacer un aumento en la demanda de energía. Los resultados revelaron que el grupo 2 exhibió una disminución en el porcentaje de la capacidad respiratoria de reserva, y un aumento en su potencial glucolítico bajo condiciones de estrés.

Para concluir con este ensayo, se administraron Rotenona y Antimicina A, inhibidores del complejo I y III de la CTE. Estos inhibidores interrumpen completamente la transferencia de electrones en la CTE, lo que conlleva a la eliminación de la captación de oxígeno para la producción de ATP. Cabe señalar que la captación de oxígeno posterior a esta inhibición resulta en un consumo de oxígeno que no está vinculado a la respiración mitocondrial.

Para el ensayo de la tasa glucolítica, el sistema realiza cálculos automáticos de las medidas de *OCR* y la tasa de liberación de protones (*PER*, por sus siglas en inglés, Proton *Efflux Rate*). Esta última, que se presenta como la medida cuantitativa de la acidificación extracelular (*ECAR*). En cuanto a la unidad de medida "*GlycoPER*" utilizada para presentar la mayoría de las variables metabólicas relacionadas con la glucólisis, hace referencia a la tasa de liberación de protones vinculada al aumento de lactato en el medio como producto de la glucólisis. A diferencia de *PER*, la medida de *GlycoPER* descuenta la contribución del CO_2 procedente de la respiración mitocondrial. Este cálculo es realizado por el equipo directamente a través de la detección del valor del factor de amortiguamiento, el cual fue cuantificado en ensayos anteriores de estandarización del método.

El ensayo de la tasa glucolítica comienza midiendo las condiciones basales asociadas con la glucólisis utilizando la unidad de medida *GlycoPER* para calcular la actividad basal de la glucólisis. Posteriormente, se administra Rotenona/Antimicina A para bloquear *OXPHOS*, que normalmente contribuye significativamente a la producción de energía en forma de ATP. Al inhibir esta vía, se evalúa la capacidad de la glucólisis para compensar la falta de producción de

energía a través de *OXPHOS*. Esto proporciona información valiosa sobre cómo las células se adaptan y ajustan su metabolismo ante la interrupción de una de sus principales vías de generación de energía. Después, se introduce 2-DG para inhibir por completo la glucólisis y comprender el impacto de esta interrupción total en el metabolismo celular. Al seguir estos pasos sucesivos, desde la evaluación de las condiciones basales hasta la inhibición completa de la glucólisis, se obtiene una comprensión detallada de cómo las células responden y se adaptan a diferentes condiciones metabólicas, lo que ayuda a elucidar el funcionamiento de su sistema glucolítico en diversas situaciones y condiciones de estrés metabólico.

Inicialmente, el análisis metabólico realizado evidenció que tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés celular los linfoblastos tumorales de pacientes presentaron menor actividad energética en relación con las células LLA-B de referencia, NALM-6. Este tipo de actividad metabólica quiescente también ha sido descrita tanto para las Células Madre Hematopoyéticas (CMH) como para las Células Madre Leucémicas (CML), y se encuentra relacionado con la preservación del agotamiento por la proliferación celular y el mantenimiento a largo plazo (Liang et al., 2020; Mantel et al., 2015). Por otro lado, se ha descrito que el metabolismo es un punto de control del mantenimiento de las CMH, a través de la glucólisis anaeróbica para generar energía, disminuir las especies reactantes de oxígeno (*ROS*, por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*), y mantener la quiescencia celular (Morganti et al., 2022; Mullighan et al., 2008a). En efecto, se ha observado que la exposición de las CMH al oxígeno atmosférico aumenta los niveles de *ROS*, genera disfunción en estas células y reduce su número (Mantel et al., 2015). Otro rasgo de relevancia es que las CMH expresan altos niveles de *Hif-1 α* para mantener su metabolismo funcional en estados hipóxicos, por ejemplo, se puede inducir un cambio metabólico de la glucólisis a la respiración mitocondrial al eliminar *Meis Homeobox 1*

(*Meis1*) (Kocabas et al., 2012), el cual es un activador transcripcional de *Hif-1*, lo que favorece el aumento de la producción de *ROS*, la activación de las CMH y al fracaso de la repoblación de la médula ósea después de un trasplante (Simsek et al., 2010; Takubo et al., 2010). También, se ha especificado que el aumento de Piruvato Deshidrogenasa Quinasa (*PDK*) disminuye el metabolismo aeróbico, esto debido a que inhibe la conversión de piruvato en acetil-CoA mediada por la Piruvato Deshidrogenasa (*PDH*). También, se ha descrito que el estado metabólico glucolítico es un punto de control del ciclo celular que modula la quiescencia y el potencial de las CMH (Morganti et al., 2022; Takubo et al., 2013). De igual modo, se conoce que las CMH suelen tener un metabolismo inactivo debido a que tienen menor tasa de captación de la glucosa, en comparación con células progenitoras más diferenciadas en la médula ósea que se encuentran activas y tienen un mayor requerimiento energético, por lo que aumenta la ingesta de glucosa con el fin de realizar procesos vitales como el ingreso al ciclo celular (Jun et al., 2021; Liang et al., 2020). Adicionalmente, se ha detallado que el cambio de metabolismo glucolítico anaeróbico a OXPHOS está relacionado con la diferenciación celular en las CMH (Morganti et al., 2022). Además hay que mencionar, que en un modelo de Leucemia Mieloide Crónica (LMC) se han encontrado que las CML CD34⁺ aumentan el flujo del Ciclo del Ácido Tricarboxílico (CAT) y la respiración mitocondrial en comparación con sus contrapartes CD34⁻ (Kuntz et al., 2017), también se conoce que las CML más primitivas CD34⁺ CD38⁻ dependen de OXPHOS, mientras que las CMH no leucémicas tienen un perfil metabólico glucolítico (de Beauchamp et al., 2022; Simsek et al., 2010).

Para describir el contenido celular tanto de los tumores sólidos como líquidos, se tiene que la población celular aberrante no se genera a partir de un único clon, lo que implica que existen poblaciones celulares heterogéneas con requerimientos energéticos diversos que pueden

determinar el metabolismo general, de acuerdo con la población celular predominante, y que es particular para cada el tipo de cáncer, en adición a la suma de las otras poblaciones celulares presentes en el tumor (Batlle & Clevers, 2017; Catherine Adell O'Brien et al., 2009). Para el caso específico de la LLA-B, predominan células menos diferenciadas próximas en la jerarquía a las CMH. Asimismo, se resalta que dentro de esta población tumoral se encuentra un porcentaje relevante de CML que suelen ser las causantes de las recaídas en la enfermedad (Ishikawa et al., 2007; Pollyea & Jordan, 2017), e incluso se ha evidenciado que las CML son capaces adaptar su metabolismo para evadir el sistema inmunológico (Ye et al., 2016a). Más aún, se ha señalado que las CML heredan de las CMH la quiescencia a corto o largo plazo, esta última se conoce también como dormancia, la cual es una característica determinante en la resistencia a la quimioterapia antiproliferativa y la autorrenovación de la población celular (Ebinger et al., 2016; Holyoake et al., 1999).

La leucemogénesis es un proceso complejo en el cual las células sanguíneas normales adquieren mutaciones genéticas que les confieren ventajas de crecimiento descontrolado y evitan la muerte celular programada (Corces-Zimmerman et al., 2014; Jan et al., 2012). Algunas CMH inactivas tienen una capacidad de reparación defectuosa del ADN que propicia la acumulación de mutaciones adicionales durante la división celular, lo que aumenta el riesgo de transformación maligna y desarrollo de la leucemia (Liran I Shlush et al., 2014; W. Zhang et al., 2019). Por esta razón, es importante comprender los mecanismos de reparación del ADN y su impacto en las células madre hematopoyéticas para desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas para el tratamiento de enfermedades hematológicas (Liran I Shlush et al., 2014; W. Zhang et al., 2019).

Se han propuesto estrategias tanto endógenas como exógenas para reparar el ADN y reducir los efectos negativos causados por el estrés oxidativo y la replicación del ADN, que son

mayormente causados por *ROS*. Estas estrategias buscan proteger la integridad de las células madre hematopoyéticas (CMH) y minimizar el daño en su ADN, algunas de estas incluyen mantener una fase inactiva del ciclo celular, la cual influye en la quiescencia metabólica, aprovechar los nichos protectores, y activar las vías de reparación del ADN, así como el uso de agentes antioxidantes o la terapia génica (Walter et al., 2015; Wilson et al., 2008).

En otros estudios realizados en líneas celulares de precursoras B de origen humano (*BCP-ALL; TOM-1, HB11;19, RS4;11, UOC-B6, REH, SUP-B15, NALM6*) se evidenció que los valores de *OCR* y *ECAR* eran bajos en comparación con líneas celulares de otros tipos de leucemias como la LLA-T, LMA y LMC, es decir, que las células de LLA-B son energéticamente menos activas (Hlozkova et al., 2020). En cuanto a la relación de las células de linaje B y el metabolismo, se conoce que durante el desarrollo y la diferenciación, las células B experimentan cambios drásticos en su fisiología, que van acompañados de alteraciones en el fenotipo metabólico y las propiedades funcionales de las células (Raza & Clarke, 2021).

De manera general, se conoce que la quiescencia es un mecanismo de homeostasis tisular que tiene la finalidad de regular la actividad proliferativa de las células (Hanahan, 2022). En consecuencia, la programación quiescente o de latencia celular provoca cambios en la morfología y el metabolismo celular, que involucra la liberación de proteínas bioactivas, como lo son las quimiocinas, citocinas y proteasas cuya identidad depende del tipo de célula del cual provenga (Birch & Gil, 2020; Faget et al., 2019). La inducción de la quiescencia es provocada por una variedad de condiciones, que incluyen el estrés microambiental, la privación de nutrientes, el daño del ADN, el daño a los orgánulos y la infraestructura celular, y los desequilibrios en las redes de señalización celular (Faget et al., 2019; Gorgoulis et al., 2019). Sin embargo, en el contexto oncológico, la información vinculada a la quiescencia celular es contrastante, por un lado, hay

casos que describen los beneficios protectores de la quiescencia para limitar la progresión maligna (He & Sharpless, 2017; Kowald et al., 2020); pero también, hay evidencia reveladora en los cuales las células quiescentes estimulan el desarrollo tumoral y la progresión maligna (Kowald et al., 2020; Wang et al., 2020). Todas estas observaciones, han demostrado que las células tumorales quiescentes contribuyen de diversas formas a la señalización proliferativa para evitar la apoptosis, inducir la angiogénesis, estimular la invasión, generar la metástasis y suprimir la inmunidad tumoral (Birch & Gil, 2020; Faget et al., 2019; Gorgoulis et al., 2019; Lee & Schmitt, 2019).

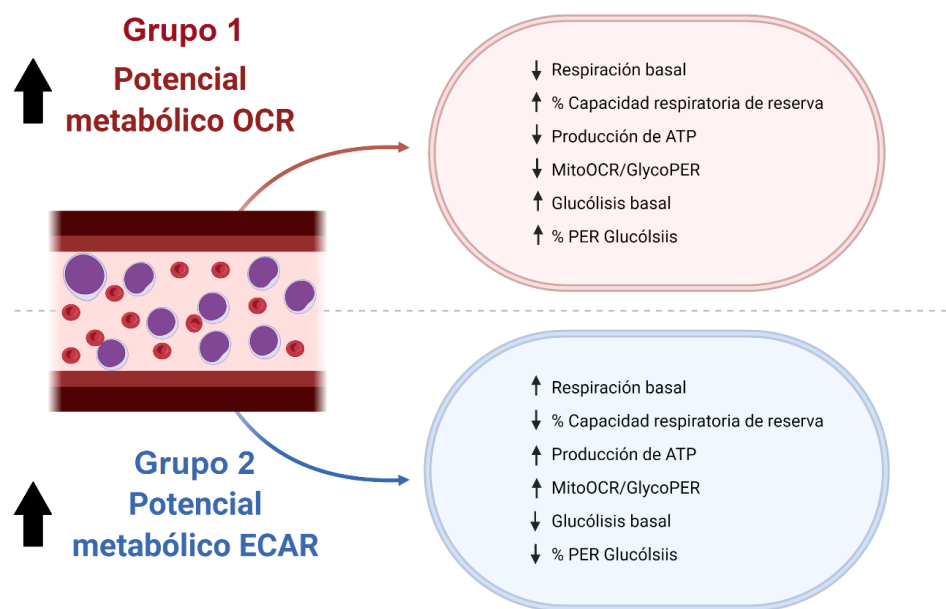
Los análisis metabólicos permitieron identificar dos grupos de pacientes cuyos linfoblastos tumorales presentaban potenciales metabólicos diferenciales. Si bien el cáncer es una enfermedad metabólica relacionada con el efecto Warburg, se pueden presentar fenotipos metabólicos sustancialmente variables, que podrían servir como predictores críticos de la progresión y proliferación de las células tumorales, así como evidenciar las vulnerabilidades de la enfermedad y las resistencias a los fármacos.

Se encontró de manera general, que los linfoblastos tumorales de los pacientes tienen un estado metabólico tendiente a la quiescencia, sin embargo, dentro de este mismo estado se encuentran dos grupos de linfoblastos con comportamiento diferencial relacionada con la respuesta metabólica producida en condiciones de estrés celular. Si bien, las células pueden realizar tanto glucólisis como respiración mitocondrial, se evidenció que el primer grupo tiene mayor capacidad energética para responder a una situación de estrés con un aumento del metabolismo glucolítico, mientras que, el segundo grupo tiene mayor competencia para responder a esta misma crisis con un aumento de la actividad mitocondrial para soportar el requerimiento energético demandado, lo que a su vez coincide con diferencias importantes relacionadas a las variables metabólicas analizadas (Figura. 35). Lo anterior, lleva a sugerir que el metabolismo de los linfoblastos

tumorales es dinámico, como consecuencia de alteraciones celulares que le permiten depender de cualquiera de las dos vías metabólicas energéticas principales (glucólisis y/o respiración oxidativa) según el requerimiento. Incluso, se ha estudiado que la capacidad que tienen estas células de cambiar de una vía metabólica a otra es una estrategia clave para impulsar el crecimiento celular y la farmacorresistencia. Por lo cual, adquieren la capacidad de adaptarse y sobrevivir mediante la plasticidad metabólica.

Figura 35 .

Características metabólicas de los grupos con potencial metabólico diferencial identificados en el presente estudio.



La plasticidad fenotípica, identificada por Hanahan (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011), representa uno de los rasgos distintivos del cáncer. Esta plasticidad se asocia estrechamente con la diferenciación terminal, como se ha mencionado previamente (Hanahan, 2022; Wang et al., 2020; Waters et al., 2018). Además, se ha investigado que desbloquear la

capacidad normalmente limitada de plasticidad fenotípica para escapar o evadir el estado de diferenciación terminal es un componente crítico en la aparición del cáncer (Lee & Schmitt, 2019). Es necesario resaltar que esta plasticidad fenotípica seguramente es una propiedad intrínseca de las CMH, ya que la adaptabilidad metabólica es esencial en su proceso de desarrollo, se tiene que inicialmente las CMH residentes en los nichos hipóxicos utilizan principalmente la glucólisis para la producción de energía, además utilizan el metabolismo de los ácidos grasos para la división asimétrica asociada a la autorrenovación, y luego cambian a la fosforilación oxidativa mitocondrial para satisfacer la fuerte demanda de energía requerida para la diferenciación celular (Geldenhuis et al., 2021; Michon, 2002).

Un ejemplo de la importancia del fenotipo metabólico en cáncer es la resistencia a fármacos. Por ejemplo, se ha descrito que el fenotipo metabólico en las células de LLA puede predecir la respuesta al tratamiento con L-asparaginasa (ASNase), en el cual los pacientes resistentes al fármaco muestran una acción glucolítica alta en comparación con los pacientes más sensibles que tienen una baja actividad glucolítica. Estos datos respaldan el papel del metabolismo del cáncer y abren nuevos caminos potenciales en el diagnóstico y manejo del tratamiento de pacientes con leucemia resistente (Walter et al., 2015). Notablemente, en un modelo de LMC, la plasticidad metabólica es clave en la resistencia adquirida a los medicamentos inhibidores de la tirosina quinasa como el Imatinib (Wellmann et al., 2004). En consecuencia, las células leucémicas independiente del linaje de origen muestran una apreciable plasticidad metabólica que les permite adaptarse a diferentes estímulos celulares y fuentes metabólicas (Inthal et al., 2008).

De manera interesante, se ha descrito que esta capacidad metabólica puede ser incluso adquirida por las células tumorales a través de canales de membrana similares a los nanotubos canalizantes (*TNT*, por sus siglas en inglés, *Tunneling nanotubes*) para transferir información entre

ellas o con el medio tumoral. Incluso utilizan *TNT* para transferir diferentes tipos de elementos como iones, mitocondrias, microvesículas, exosomas, lisosomas, proteínas y microARN (Shuno et al., 2010). Como resultado, las células tumorales adquieren nuevas capacidades, tales como el aumento de la capacidad de metástasis, la plasticidad metabólica, la aptitud angiogénica y la quimiorresistencia lo que favorece la severidad del tumor (Shuno et al., 2010).

Es interesante, como la plasticidad metabólica se vuelve una cualidad tumoral permitiéndole a las células malignas adaptarse a los desafíos metabólicos al alternar entre la glucólisis y *OXPHOS*. Pero esto no queda solo ahí, ya que se han impulsado diversas investigaciones con el fin de eliminar los desafíos presentados por la plasticidad metabólica. Por ejemplo, un grupo de expertos diseñaron un ensayo en el cual expusieron ratones a 24 horas de ayuno intermitente, y en el período de hipoglucemia se les administró metformina, que es un inhibidor de *OXPHOS*, y se halló una afectación del crecimiento tumoral a través de la activación de la glucógeno sintasa quinasa 3β ($GSK3\beta$) aguas abajo de la proteína fosfatasa 2A ($PP2A$), lo que provocó una disminución de la proteína prosupervivencia MCL-1 y la muerte celular (Mern et al., 2010)).

Una vez determinados los dos grupos con potencial metabólico diferencial, se analizó si estos tenían relación con otras características importantes de la LLA-B, y se encontró que tanto la EMR como la expresión del gen *IGJ*, se encontraban vinculados con el potencial metabólico. Sin embargo, al detallar minuciosamente las diferentes variables metabólicas asociadas a glucólisis y *OXPHOS* se encontraron otras relaciones de interés con variables clínicas de la enfermedad (Figura 36 y 37).

Por otro lado, estudios han evidenciado como características metabólicas como la capacidad respiratoria de reserva es utilizada como un parámetro clave que determina el perfil bionérgico metabólico, predice la resistencia al estrés de la células no transformadas, y predice la agresividad de las células tumorales, así como la adquisición de resistencias a fármacos (Fovez et al., 2020).

Figura 36.

Variables clínicas y biológicas de la LLA-B relacionadas con el metabolismo de OXPHOS.

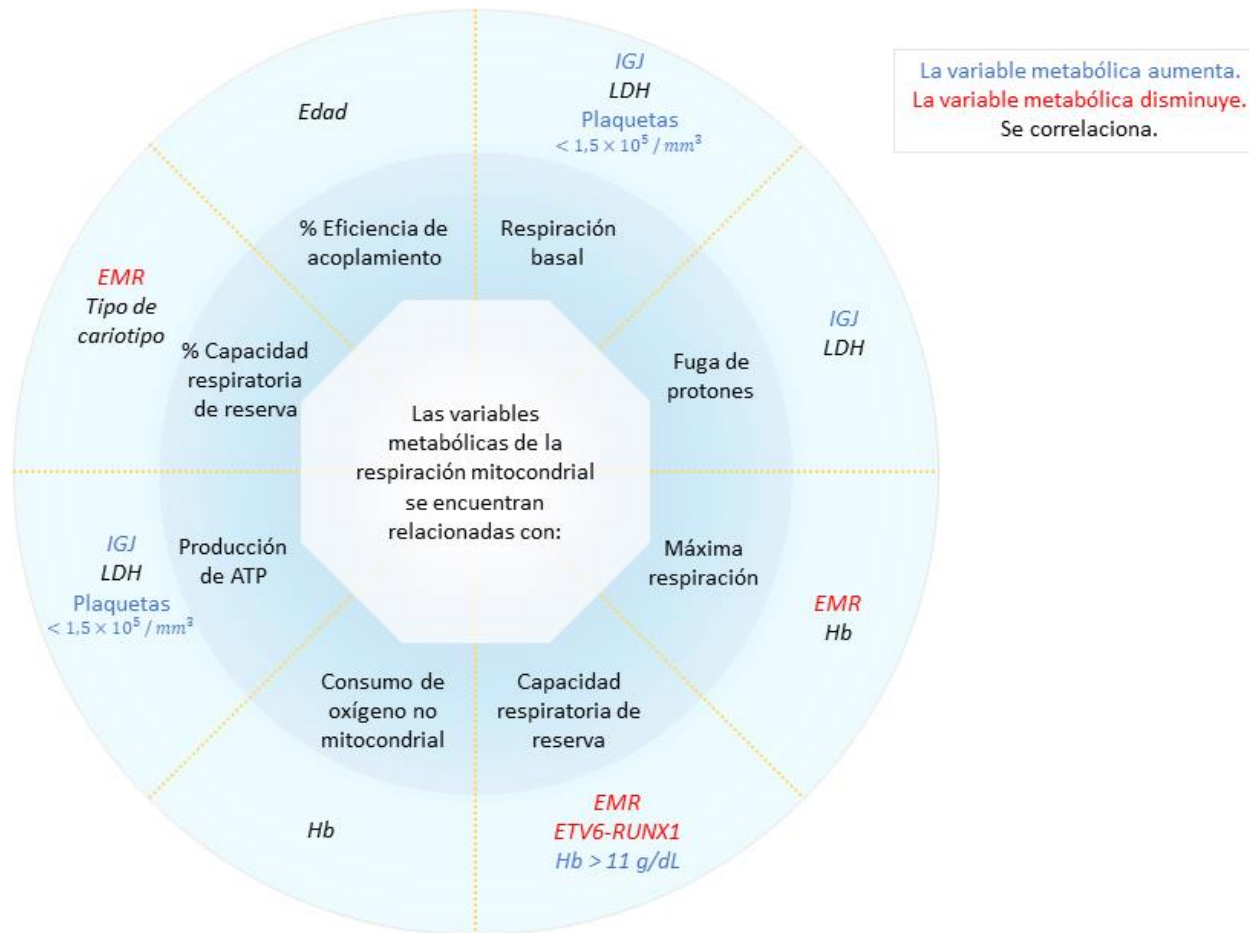
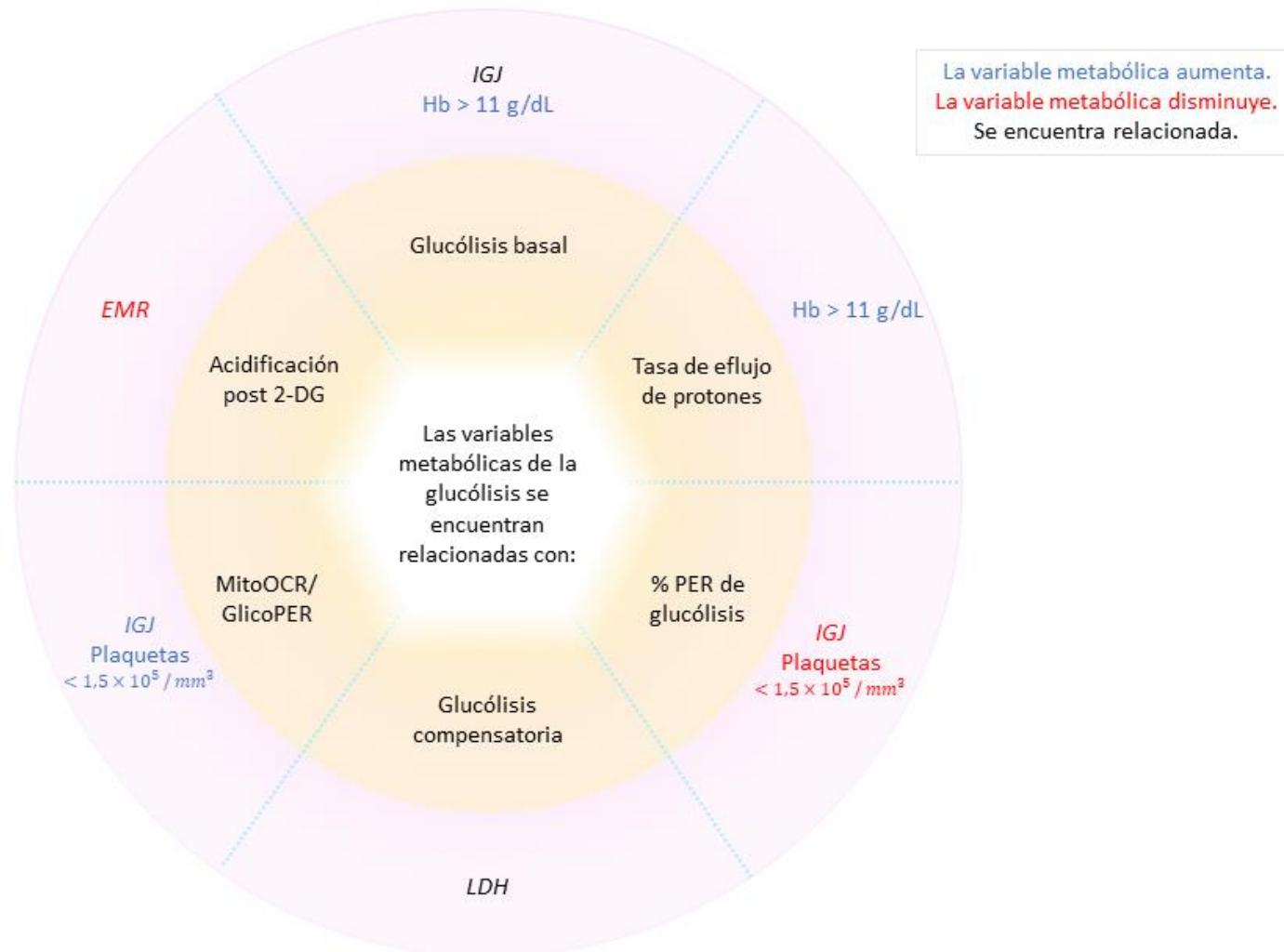


Figura 37.

Variables clínicas y biológicas de la LLA-B relacionadas con el metabolismo glucolítico.



La EMR no solo es un control de la respuesta al tratamiento quimioterapéutico, sino que en sí misma aporta información predictiva sobre las posibles recaídas de la enfermedad y/o fallecimiento de los pacientes. En consecuencia, tenemos que la EMR es una de las características pronósticas más relevantes descritas por la literatura para la LLA-B, y según nuestros resultados se encuentra estrechamente relacionada con la conducta metabólica de los linfoblastos tumorales. De hecho, se estableció que la EMR se encuentra asociada a la disminución del porcentaje del potencial metabólico *OCR*, la máxima respiración, la capacidad respiratoria de reserva y acidificación posterior a 2-DG, en comparación con el grupo de pacientes que no presentan EMR (Apéndice H.G). Un estudio en células de LLA-B mostró que la interrupción de la función mitoNEET (una proteína de la membrana mitocondrial) afecta la bioenergética celular, y proporciona un posible enfoque novedoso para el tratamiento de la EMR refractaria (Geldenhuis et al., 2021).

La hemoglobina está asociada a la LLA-B ya que el diagnóstico en niños suele estar acompañado de anemia y se considera una de las complicaciones clínicas más comunes de la enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las poblaciones de células madre requeridas y los mecanismos de crecimiento eritropoyético permanecen intactos en la leucemia, pero la presencia de niveles bajos de hemoglobina suele causar cansancio y otros síntomas asociados que provocan un deterioro en la calidad de vida (Michon, 2002). En la leucemia los niveles de eritropoyetina (EPO) de los pacientes a menudo son apropiados para los niveles de hemoglobina observados, pero en los exámenes de médula ósea se observa un deterioro grave de la eritropoyesis en estos pacientes (Steele & Narendran, 2012). Adicionalmente, la hemoglobina también se asocia con otros factores pronósticos como *ETV6-RUNX1*, interacción en la cual se destaca que los niveles de hemoglobina son significativamente más bajos en los niños positivos para esta

translocación (Inthal et al., 2008). Como resultado del presente estudio, se halló que la disminución de la hemoglobina en los pacientes con LLA-B se asocia con una menor actividad glucolítica en características relacionadas como la glucólisis basal y la tasa de flujo de protones. Es de resaltar que, todos los cambios relacionados con la disponibilidad de oxígeno y nutrientes van afectar el microambiente tumoral, lo que a su vez soporta los cambios metabólicos. Por esta razón, los estudios actuales que se enfocan en los mecanismos de la anemia en la LLA también pueden ofrecer conocimientos clave sobre el microambiente maligno en la médula ósea, y la regulación de las CML que dependen de manera crítica de tales nichos especializados para el soporte y desarrollo de la leucemogénesis.

Por otra parte, las translocaciones cromosómicas son eventos genéticos que pueden desempeñar un papel importante en la leucemogénesis, ya que implican el intercambio de material genético entre cromosomas no homólogos. En el caso de la leucemia, las translocaciones cromosómicas pueden afectar a las células madre hematopoyéticas en la médula ósea alterando la producción normal de células sanguíneas, e incluso algunas translocaciones cromosómicas específicas se han asociado con diferentes tipos de leucemia, por ejemplo la presencia de *BCR-ABL1* suele estar presente hasta en el 15% de los pacientes diagnosticados con LLA-B, y llega a estar presente aproximadamente en el 90% de los casos de LMC (Kantarjian et al., 2006). En relación con los pacientes positivos para *ETV6-RUNX1*, se evidenció que las células tumorales presentaron disminución de la capacidad respiratoria de reserva. De la misma manera otras variables como la LDH, el número de plaquetas en el momento del diagnóstico, el cariotipo, la edad y el sexo también se vieron involucradas en la modulación metabólica de los linfoblastos tumorales provenientes de pacientes diagnosticados con LLA-B captados para este estudio.

Además de eso el modelo multivariado analizó cuatro variables de impacto pronóstico relacionadas con la SLE las cuales fueron la edad, los niveles de hemoglobina en el momento del diagnóstico, la presencia de la translocación *BCR-ABL1* y la expresión génica de *IGJ* en los linfoblastos tumorales de pacientes de *novo* para LLA-B que no habían recibido tratamiento quimioterapéutico. Lo anterior aportó información en relación con uno de nuestros objetivos que pretendía determinar la importancia de los perfiles transcripcionales en la modulación del metabolismo leucémico, y se confirmó la importancia de la expresión de *IGJ* como variable pronóstico de la enfermedad.

Determinar el perfil de expresión génica es una estrategia que se utiliza para identificar las características moleculares distintivas de los subtipos de leucemia, así como puede apoyar con información para la clasificación y el diagnóstico preciso de los pacientes. También, puede proporcionar datos relevantes que aporten a nuevas alternativas terapéuticas específicas y personalizadas para cada subtipo de LLA-B. En este estudio en particular se analizaron las expresiones génicas de *IDI*, *ID3* e *IGJ*, obteniendo resultados interesantes relacionados con la expresión del gen *IGJ*.

En relación con la expresión de *IDI* e *ID3* no se evidenció relación con el comportamiento metabólico de los linfoblastos tumorales de LLA-B. Sin embargo, otros estudios han expuesto que se encuentran vinculados a diferentes modelos relacionados con el cáncer, por ejemplo, en el carcinoma de células escamosas oral (Panahipour et al., 2020), con el aumento de la severidad en el cáncer de próstata (Sharma et al., 2012), se han correlacionado directamente con el potencial metastásico en el cáncer de páncreas (Shuno et al., 2010), la apoptosis en células de cáncer de mamá (Mern et al., 2010), la capacidad de autorrenovación en las células iniciadoras de cáncer de colon (Catherine A. O'Brien et al., 2012), promueven la tumorigénesis en el cáncer de pulmón de

células pequeñas (D. Chen et al., 2014), el desarrollo de linfomas (Jia Li et al., 2017), entre otras alteraciones oncológicas. Asimismo, se ha descrito que los genes *ID* son necesarios para la supervivencia y regeneración de médula ósea durante la homeostasis y el estrés para mantener el desarrollo de las CMH (Gadomski et al., 2020), se han relacionado con el mantenimiento de la repoblación a largo plazo de las CMH (Perry et al., 2007), dirigen el compromiso de la diferenciación de células T reguladoras y las células B (Hidaka et al., 2022), así como, se ha evidenciado que los genes *IDI* e *ID3* son indispensables en el proceso de desarrollo del linaje eritropoyético (Zhao et al., 2016).

Por su parte la proteína IGJ, también conocida como cadena de unión o segmento de unión (J), juega un papel fundamental en la estructura y función de ciertos tipos de inmunoglobulinas, como IgA e IgM. Esta proteína facilita el ensamblaje de los monómeros de IgA e IgM para formar las estructuras diméricas y pentaméricas, lo que resulta en la generación de formas maduras, estables y funcionales de estas inmunoglobulinas. Estas formas maduras de IgA e IgM son producidas por las células plasmáticas en respuesta a la presencia de agentes extraños, como bacterias o virus. Además, son esenciales para la inmunidad de las mucosas, al proporcionar una protección crucial en áreas como las vías respiratorias y gastrointestinales.

El estudio actual reveló una correlación entre un aumento en la expresión del gen *IGJ* y condiciones basales con aumento de la actividad respiratoria para la producción de ATP, y una respuesta metabólica más pronunciada hacia la glucólisis en condiciones de estrés celular en los linfoblastos de pacientes con LLA-B. Además, se identificó que el aumento de la expresión de este gen está asociado con una menor supervivencia libre de evento (SLE), cabe señalar que el seguimiento se realizó por 420 días en la cohorte de pacientes ingresados al estudio. Es importante destacar que investigaciones previas han sugerido que el gen *IGJ* es un factor predictivo de mal

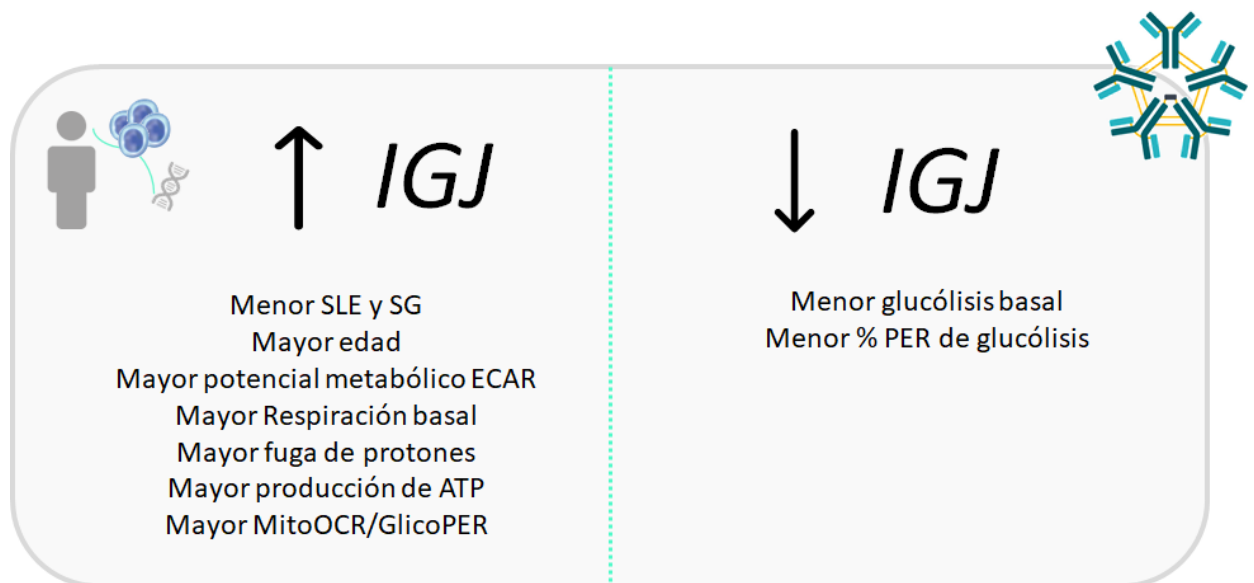
pronóstico en la población adulta colombiana. Estos hallazgos resaltan la relevancia de la expresión del gen *IGJ* en la respuesta metabólica, y el pronóstico en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de fenotipo B. (Cruz-Rodríguez et al., 2016, 2017); igualmente, se reportó en población pediátrica hispana/latina que el gen estaba relacionado con una baja SLE a los 4 años y EMR positiva (Harvey et al., 2010).

La LLA-B tiene diferentes subtipos entre los cuales se encuentra la leucemia linfoblástica B similar a Filadelfia (*LLA-B Ph-like*) que es un subtipo de alto riesgo y comparte características de expresión génica con la LLA-B positiva para Filadelfia (*Ph+*), aunque no presenta la fusión *BCR-ABL1* característica de esta última, comparten algunas vías y genes específicos que se encuentran activados de manera similar en ambos subtipos, como por ejemplo, la sobreexpresión del gen *IGJ* a nivel de ARNm en LLA-B, lo que sugiere que este gen puede desempeñar un papel relevante hasta el momento que no ha sido identificado en la patogénesis de la enfermedad (Gestrich & Oduro, 2020). En un estudio hematopatológico con técnicas de inmunohistoquímica, la proteína IGJ fue empleada para detectar células neoplásicas en el linfoma de Hodgkin con predominio de linfocitos nodulares. Este enfoque permitió distinguir esta enfermedad de otras con apariencias morfológicas similares. Los resultados indicaron que la expresión de IGJ se presenta en un subgrupo de leucemia linfoblástica aguda de tipo B (B-ALL), particularmente observado en casos positivos para la presencia del cromosoma Filadelfia (*Ph+*) y aquellos con un perfil similar *Ph-like*. (Gestrich & Oduro, 2020). En particular, se conoce que la LLA-B *Ph-like* es un subtipo de alto riesgo, que representa aproximadamente el 15% de los niños con LLA-B, y se presenta con mayor frecuencia en adolescentes y adultos, con una incidencia de hasta el 27 % de los adultos jóvenes con LLA entre 21 y 39 años.

Todo lo anterior, conlleva a sugerir que el gen *IGJ* se encuentra relacionado con metabolismo energético celular de los linfoblastos tumorales de pacientes con LLA-B, al presentar un fenotipo metabólico que se caracteriza por un aumento de la actividad mitocondrial en condiciones basales, y un aumento del potencial glucolítico en condiciones de estrés; asimismo, es un determinante de valor pronóstico para la enfermedad.

Figura 38.

Descripción del perfil metabólico y clínico relacionado con la expresión del gen IGJ.



Actualmente, se han desarrollado diferentes estudios con la finalidad de identificar dianas terapéuticas relacionadas con el metabolismo para controlar el aumento de la biomasa en los diferentes tipos de cáncer (Pavlova et al., 2022; Xia et al., 2021). En particular, en el caso de las CML se han considerado durante mucho tiempo como un objetivo terapéutico clave en la leucemia, e incluso se han diseñado estrategias terapéuticas enfocadas en la biología fundamental para la preservación de las CMH normales sobre las CML, y se ha evidenciado que esto mejora los resultados de las personas afectadas por la enfermedad (Jones et al., 2021).

Por las razones anteriormente expuestas, y en consideración con los resultados previamente obtenidos en nuestro grupo de investigación, se propuso realizar el presente estudio que evaluó las células leucémicas de pacientes con diagnóstico de *novo* de LLA-B, que no recibieron tratamiento quimioterapéutico previamente, con el fin de caracterizar la biología propia de la enfermedad en la población colombiana, y proporcionar información acerca de factores asociados e involucrados en la falta de respuesta al tratamiento que tienen los pacientes colombianos, a pesar de utilizar los actuales regímenes quimioterapéuticos internacionales.

Lo anterior, es relevante porque el diseño experimental permitió medir los cambios en los fenotipos metabólicos que determinan la susceptibilidad de la enfermedad, y relacionar los resultados metabólicos con otras variables clínicas y biológicas de valor pronóstico. Por otro lado, se resalta el tipo y la calidad de las muestras, ya que los linfoblastos tumorales a los cuales se les realizaron los ensayos experimentales procedían de muestras de médula ósea con menos de 24 horas de haber sido extraídas, y se les garantizó condiciones similares a las del nicho de origen, es decir, que los resultados obtenidos reflejan el comportamiento nativo de los linfoblastos tumorales de forma cercana a lo que puede estar sucediendo en el nicho original.

Los resultados obtenidos identificaron una relación significativa entre la expresión del gen de mal pronóstico *IGJ* y el metabolismo energético de los linfoblastos tumorales de LLA-B de pacientes colombianos. Definitivamente, los hallazgos presentados ofrecen información novedosa y relevante. Esta evidencia hasta ahora desconocida sobre la relación entre el gen *IGJ* y el metabolismo proporciona una base sólida para futuras investigaciones. Estos estudios podrían enfocarse en comprender mejor la función específica del gen *IGJ* en los procesos metabólicos relacionados con la leucemia y podrían respaldar estrategias clínicas más precisas.

Con una comprensión más profunda de cómo el gen *IGJ* influye en el metabolismo, los médicos podrían tomar decisiones más informadas sobre los tratamientos con el objetivo de mejorar la respuesta de los pacientes y sus resultados en el futuro. Esta perspectiva puede abrir nuevas oportunidades para terapias más personalizadas y efectivas en el tratamiento de la leucemia y otras enfermedades relacionadas.

7. Limitaciones

Con el fin de garantizar los tiempos de procesamiento (iniciar el protocolo antes de las 24 horas), algunas muestras rescatadas se tuvieron que descartar, ya que no tenían las condiciones previamente estandarizadas y requeridas para el presente estudio. Asimismo, se tuvieron que descartar las muestras de los pacientes que no iban a ser tratados en IPS de la ciudad de Bucaramanga.

Para la realización de los estudios metabólicos se requería un número significativo de células tumorales que no fue posible obtener de todas las muestras, debido al volumen rescatado y la concentración de linfoblastos.

Algunos de los pacientes no presentaban la realización de pruebas como Cariotipo y FISH de la muestra de diagnóstico, por lo que dichas variables no pudieron ser analizadas para todos los pacientes. Asimismo, los paneles de FISH evaluados no eran los mismos para todos los pacientes.

Algunas de las personas afectadas por la enfermedad fueron trasladadas a otras ciudades del país para la continuación de su quimioterapia, por lo cual se perdió el seguimiento clínico de las mismas. Sin embargo, aquellos pacientes que eran remitidos a otras IPS que se encontraban en

Bucaramanga y se tenía aprobación del comité de ética por parte del proyecto, si se les pudo realizar el seguimiento clínico correspondiente.

Se limitó el tiempo de seguimiento a 420 días para verificar los eventos relacionados con recaídas y/o fallecimientos de los pacientes, sin embargo, no se pudo relacionar el perfil metabólico con la supervivencia de los pacientes debido al número de muestras ingresadas a los ensayos metabólicos.

8. Conclusiones

Las células tumorales obtenidas de la médula ósea de pacientes con LLA-B muestran un metabolismo energético menos activo en comparación con la línea celular de referencia NALM-6. Esta observación se alinea con el patrón general de células del linaje B, que tienden a presentar un metabolismo con una predisposición hacia la quiescencia.

A pesar de su menor actividad metabólica, los linfoblastos tumorales mantienen vías metabólicas esenciales para la generación de energía. Esto se refleja en una similitud en la actividad entre la glucólisis y la respiración mitocondrial, lo que sugiere una estrategia adaptativa para asegurar un suministro constante de energía a pesar de su estado metabólico menos activo.

El ensayo de estrés mitocondrial fue crucial para comprender la respuesta de estas células en condiciones anómalas, revelando una diversidad en cómo enfrentan las demandas energéticas. Se identificaron dos grupos con respuestas metabólicas distintas ante el estrés.

El primer grupo mostraba un incremento en el potencial metabólico de ECAR, relacionado con una mayor actividad respiratoria en condiciones normales. Esto se manifestaba en un aumento

en la respiración basal y la producción de ATP, con una reducción en la capacidad respiratoria de reserva.

Por otro lado, el segundo grupo metabólico presentaba un aumento en el potencial metabólico de OCR, indicando una mayor actividad glucolítica en condiciones normales. Esto se reflejaba en un incremento significativo en la glucólisis basal y la tasa de liberación de protones.

La plasticidad metabólica observada en este estudio es de gran relevancia. La capacidad de las células tumorales para cambiar su estrategia metabólica en respuesta a diferentes condiciones, como el estrés, evidencia una adaptabilidad notable. Esta plasticidad podría ser fundamental en la progresión de la enfermedad, la resistencia a tratamientos y la definición del pronóstico. La habilidad de estas células para modificar su metabolismo entre diferentes vías energéticas representa un área de interés significativa para comprender mejor el cáncer y desarrollar terapias más efectivas y específicas.

La presencia de Enfermedad Mínima Residual (EMR) se asocia con una disminución en diferentes aspectos del metabolismo celular, incluyendo el potencial metabólico OCR, la capacidad respiratoria y la acidificación posterior a la administración de 2-DG (2-deoxiglucosa). Estas diferencias metabólicas se observan en comparación con los pacientes que tienen EMR negativa. Esta relación sugiere que la EMR no solo está ligada a la respuesta al tratamiento, sino que también puede tener un impacto en los procesos metabólicos celulares, lo que podría influir en el pronóstico y desarrollo de la enfermedad.

Se evidencia una asociación entre la disminución de hemoglobina en pacientes con LLA-B y una menor actividad glucolítica, incluyendo la glucólisis basal y la tasa de flujo de protones.

Los pacientes con *ETV6-RUNX1* exhibieron una disminución en la capacidad respiratoria de reserva de las células tumorales. Además, factores como LDH, recuento de plaquetas, cariotipo, edad y sexo también influyen en la regulación metabólica de los linfoblastos tumorales en la LLA-B. Estos descubrimientos subrayan la complejidad de la interacción entre cambios genéticos y múltiples factores biológicos en la regulación del metabolismo celular en esta enfermedad.

Los hallazgos actuales indican una correlación entre el incremento en la expresión del gen *IGJ*, que se vincula con condiciones basales que promueven una mayor actividad respiratoria para la producción de ATP, así como un metabolismo glucolítico más elevado en situaciones de estrés celular.

También, se destacó que la expresión del gen *IGJ* tiene un impacto significativo como variable pronóstica para la SLE y la SG de la LLA-B.

Los estudios, tanto univariados como multivariados, demostraron que *IGJ* es una variable con un peso estadístico significativo en el pronóstico de la enfermedad.

Por otro lado, *ID1* como *ID3* no demostraron relación con los perfiles metabólicos identificados. Además, tanto en el análisis univariado como en el multivariado, no se identificaron como características de valor pronóstico en los pacientes examinados.

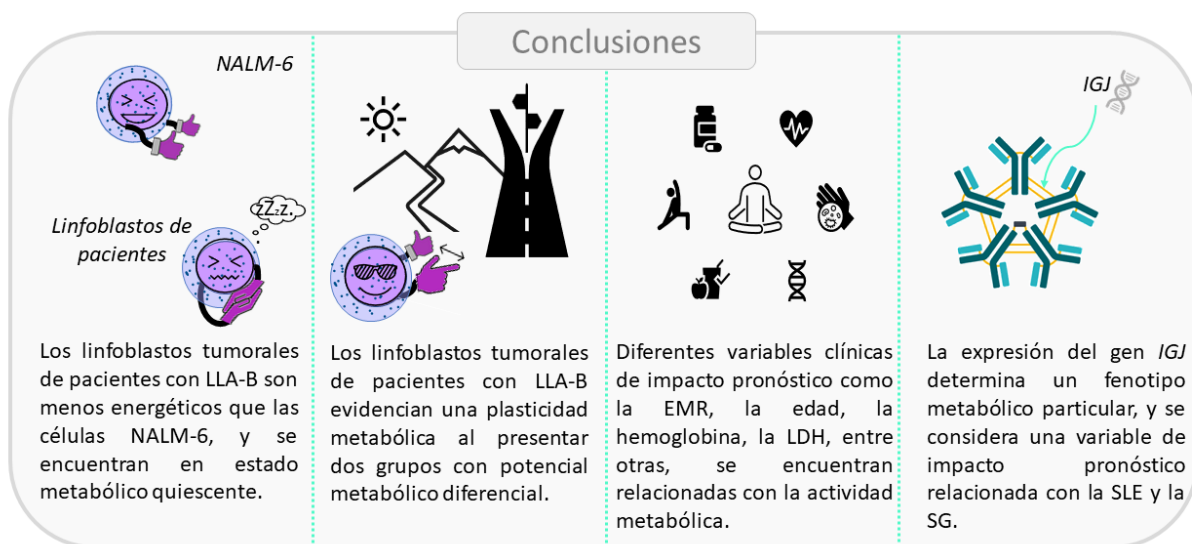
En síntesis, el estudio resalta la interacción compleja entre el metabolismo celular, su adaptación a diversas condiciones y el papel fundamental que desempeña esta dinámica en el comportamiento y tratamiento del cáncer.

Los resultados revelaron una asociación entre el gen *IGJ* de mal pronóstico y el metabolismo energético en los linfoblastos tumorales de pacientes con LLA-B. Estos descubrimientos inéditos brindan una base valiosa para investigaciones futuras, potencialmente permitiendo comprender mejor el papel específico del gen *IGJ* en los procesos metabólicos de la

leucemia. Esta comprensión más profunda podría impulsar estrategias clínicas más precisas, facilitando decisiones de tratamiento más informadas y abriendo la puerta a terapias personalizadas más efectivas.

Figura 39.

Conclusiones.



9. Recomendaciones y perspectivas

Considerando los resultados del presente trabajo, la descripción biológica de las características metabólicas de los linfoblastos tumorales sugieren información relevante que estaría relacionada al mal comportamiento del pronóstico de la LLA-B en Colombia, brindando información objetiva y de base para plantear nuevos estudios acerca de alternativas terapéuticas encaminadas a focos metabólicos para proporcionar herramientas a los especialistas en la consolidación de terapias personalizadas para las personas afectadas con este tipo de leucemia.

A su vez, sería interesante plantear nuevos estudios para profundizar en las condiciones metabólicas que tienen cada uno de los diferentes estadios celulares caracterizados fenotípicamente en la LLA-B.

Por otra parte, es importante detallar la información metabólica obtenida relacionada con la sobreexpresión del gen *IGJ* en estos pacientes. Cabe señalar que faltan estudios adicionales in vitro que permitan evaluar la relevancia de *IGJ* en la modulación del comportamiento metabólico en los linfoblastos tumorales y si este gen tiene funciones no descritas en el linaje celular.

La identificación de la sobreexpresión del gen *IGJ* en pacientes recién diagnosticados con LLA-B en Colombia podría aportar información como marcador pronóstico de la enfermedad.

Asimismo, cabe plantear nuevos estudios que permitan dilucidar la aptitud del gen *IGJ* como marcador de seguimiento a la respuesta quimioterapéutica actualmente utilizada en Colombia.

10. Consideraciones éticas

Este proyecto involucró la investigación de muestras de pacientes humanos con Leucemia Aguda, por esta razón, se garantizó los principios éticos de investigación de la beneficencia, el respeto y la justicia. Además, según la resolución 8430 Art 11, el presente estudio representó un riesgo mínimo, ya que se realizó a través de procedimientos de rutina para el diagnóstico de la enfermedad.

Adicionalmente, este trabajo se encontró amparado bajo los derechos de tratamiento de datos de la ley estatutaria 1581 de 2012, el decreto 1377 de 2013 y la resolución de rectoría de la UIS. N. 1227. También, se encuentra amparado bajo la reglamentación para la investigación como

el código de Núremberg, la Declaración de Helsinki (Corea 2008), el Informe Belmont, la legislación Colombiana Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, las Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud de los seres humanos elaboradas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Resolución 3492 de 1998, la Resolución 2935 de 2001 del Instituto Colombiano Agropecuario, la Decisión 391 de la Comunidad Andina de Naciones, el Decreto 309 del 2000 del Ministerio de Medio Ambiente y las Buenas prácticas de laboratorio (BPL). Finalmente, los procedimientos de tratamiento de desechos acogieron las normas generales de los aspectos ambientales y de salud ocupacional de la Universidad Industrial de Santander como lo es el programa de Implementación del Plan de Gestión Integral de Residuos en la Universidad Industrial de Santander (PGIR). (**Apéndice J.** Detalle de las consideraciones éticas y Normatividad interna disponible en Sistema de Gestión Integral de la Universidad).

11. Tratamiento de datos

Es de tener en cuenta lo reglamentado a nivel nacional en la ley estatutaria 1581 de 2012, el decreto 1377 de 2013 y la resolución de rectoría de la UIS No. 1227 de 2013 sobre el tratamiento de datos personales, los cuales tienen por objeto la protección de datos personales en Colombia, las muestras tomadas para el estudio y los análisis fueron identificadas con un número asignado completamente al azar de manera que no se pueda identificar quién es el dueño de cada muestra. Con ese mismo código, se identificó al paciente dentro de la base de datos donde se depositó la información correspondiente al desarrollo de su enfermedad y desenlace clínico. Esta información

fue de conocimiento exclusivo del investigador principal y de los directores del proyectos. A las muestras no se les realizó ningún procedimiento adicional a los análisis explicados en la metodología del presente proyecto (Apéndice J).

Únicamente el investigador principal, las personas del equipo de estudio designadas por el mismo y las personas asignadas por la Universidad verificaron que los datos registrados son verídicos, y tuvieron acceso al archivo donde se encuentran. Este archivo estuvo y estará bajo la custodia del investigador principal y reposará en la Universidad Industrial de Santander en un sitio seguro.

De acuerdo con lo anterior, dentro del consentimiento y asentimiento informado que se le explicó al paciente acerca de la confidencialidad de los datos, y quienes podrían acceder a dicha información, el párrafo estuvo redactado según lo plasmado en el título II capítulo I artículo 15 de la resolución 8430: “La seguridad que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad”.

Adicionalmente, con respecto a la confidencialidad, la identidad de los individuos participantes en el estudio se mantendrá en reserva y su identificación en las bases de datos fue codificada. Para garantizar la confidencialidad de los datos, en el momento de la inclusión de los pacientes al estudio se les asignó un código compuesto por un número y tres iniciales correspondientes al primer nombre y los dos apellidos. Tanto los formatos de recolección de datos como las muestras generadas de cada uno de los pacientes fueron marcados con la codificación mencionada anteriormente. Los datos obtenidos fueron manejados con absoluta confidencialidad y archivados bajo llave de manera que solo son conocidos por el Investigador principal y el coordinador del estudio. Adicionalmente, cada una de las personas que hicieron parte del equipo de investigación firmó el formato de acuerdo de confidencialidad.

Referencias Bibliográficas

- Abbas AK, Lichtman AH, P. S. (2021). *Cellular and Molecular Immunology*. (10th ed.).
- Agilent Technologies. (2017). *Agilent Seahorse XFp Cell Energy Phenotype Test Kit* (No. 103275–400).
- Andersen, J. L., & Kornbluth, S. (2013). The Tangled Circuitry of Metabolism and Apoptosis. *Molecular Cell*, 49(3), 399–410. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.026>
- Ariès, I. M., Bodaar, K., Karim, S. A., Chonghaile, T. N., Hinze, L., Burns, M. A., Pfirrmann, M., Degar, J., Landrigan, J. T., Balbach, S., Peirs, S., Menten, B., Isenhardt, R., Stevenson, K. E., Neuberg, D. S., Devidas, M., Loh, M. L., Hunger, S. P., Teachey, D. T., ... Gutierrez, A. (2018). PRC2 loss induces chemoresistance by repressing apoptosis in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*, 215(12), 3094–3114. <https://doi.org/10.1084/jem.20180570>
- Baccin, C., Al-Sabah, J., Velten, L., Helbling, P. M., Grünschläger, F., Hernández-Malmierca, P., Nombela-Arrieta, C., Steinmetz, L. M., Trumpp, A., & Haas, S. (2020). Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nature Cell Biology*, 22(1), 38–48. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0439-6>
- Bain, G., Cravatt, C. B., Loomans, C., Alberola-Ila, J., Hedrick, S. M., & Murre, C. (2001). Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nature Immunology*, 2(2), 165–171. <https://doi.org/10.1038/84273>
- Barton., K. M. C. W. L. B. G. (2022). *Immunobiology, Janeway's* (10th Editi). W.W. Norton & Company.
- Battle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*, 23(10), 1124–1134.

<https://doi.org/10.1038/nm.4409>

- Bendall, S. C., Davis, K. L., Amir, E. D., Tadmor, M. D., Simonds, E. F., Chen, T. J., Shenfeld, D. K., Nolan, G. P., & Pe'er, D. (2014). Single-Cell Trajectory Detection Uncovers Progression and Regulatory Coordination in Human B Cell Development. *Cell*, *157*(3), 714–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.005>
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., & van't Veer, M. B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, *9*(10), 1783–1786. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7564526>
- Bennett, J. H. (1980). Two Cases of Disease and Enlargement of the Spleen in Which Death Took Place from the Purulent Matter in the Blood. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *30*(1), 59–62. <https://doi.org/10.3322/canjclin.30.1.59>
- Bhattacharya, B., Mohd Omar, M. F., & Soong, R. (2016). The Warburg effect and drug resistance. *British Journal of Pharmacology*, *173*(6), 970–979. <https://doi.org/10.1111/bph.13422>
- Birch, J., & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes & Development*, *34*(23–24), 1565–1576. <https://doi.org/10.1101/gad.343129.120>
- Bost, F., Decoux-Poullot, A.-G., Tanti, J. F., & Clavel, S. (2016). Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? *Oncogenesis*, *5*(1), e188. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.46>
- Brognard, J., & Hunter, T. (2011). Protein kinase signaling networks in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, *21*(1), 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.10.012>
- Brown, P. A., Wieduwilt, M., Logan, A., DeAngelo, D. J., Wang, E. S., Fathi, A., Cassaday, R. D., Litzow, M., Advani, A., Aoun, P., Bhatnagar, B., Boyer, M. W., Bryan, T., Burke, P. W., Coccia, P. F., Coutre, S. E., Jain, N., Kirby, S., Liu, A., ... Shah, B. (2019). Guidelines

- Insights: Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 1.2019. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 17(5), 414–423. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.0024>
- Broxterman, H. J., Gotink, K. J., & Verheul, H. M. W. (2009). Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib. *Drug Resistance Updates*, 12(4–5), 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2009.07.001>
- Brunning, R. D. (2003). Classification of acute leukemias. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 20(3), 142–153. [https://doi.org/10.1016/S0740-2570\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0740-2570(03)00031-5)
- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(2), 85–95. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>
- Carmona, L. M., & Schatz, D. G. (2017). New insights into the evolutionary origins of the recombination-activating gene proteins and V(D)J recombination. *The FEBS Journal*, 284(11), 1590–1605. <https://doi.org/10.1111/febs.13990>
- Chan, L. N., Chen, Z., Braas, D., Lee, J.-W., Xiao, G., Geng, H., Cosgun, K. N., Hurtz, C., Shojaee, S., Cazzaniga, V., Schjerven, H., Ernst, T., Hochhaus, A., Kornblau, S. M., Konopleva, M., Pufall, M. A., Cazzaniga, G., Liu, G. J., Milne, T. A., ... Müschen, M. (2017). Metabolic gatekeeper function of B-lymphoid transcription factors. *Nature*, 542(7642), 479–483. <https://doi.org/10.1038/nature21076>
- Chandel, N. S. (2015). Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles. *Cell Metabolism*, 22(2), 204–206. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.013>
- Chang, C., Zhao, Q., Gonzalez, J. P., Kim, J. H., Alzahrani, K., Del Re, D., & Fraidenaich, D. (2017). Hematopoietic Id Deletion Triggers Endomyocardial Fibrotic and Vascular Defects in the Adult Heart. *Scientific Reports*, 7(1), 3079. [https://doi.org/10.1038/s41598-017-03160-](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03160-7)

- Chao, A.-C., Chen, C.-H., Wu, M.-H., Hou, B.-Y., & Yang, D.-I. (2020). Roles of Id1/HIF-1 and CDK5/HIF-1 in cell cycle reentry induced by amyloid-beta peptide in post-mitotic cortical neuron. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(4), 118628. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118628>
- Chen, D., Forootan, S. S., Gosney, J. R., Forootan, F. S., & Ke, Y. (2014). Increased expression of Id1 and Id3 promotes tumorigenicity by enhancing angiogenesis and suppressing apoptosis in small cell lung cancer. *Genes & Cancer*, 5(5–6), 212–225. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.20>
- Chen, H., Zhang, Y., Ye, A. Y., Du, Z., Xu, M., Lee, C.-S., Hwang, J. K., Kyritsis, N., Ba, Z., Neuberger, D., Littman, D. R., & Alt, F. W. (2020). BCR selection and affinity maturation in Peyer's patch germinal centres. *Nature*, 582(7812), 421–425. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2262-4>
- Chennamadhavuni, A., Lyengar, V., Mukkamalla, S. K. R., & Shimanovsky, A. (2022). Leukemia. In *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069254>
- Chi, X., Li, Y., & Qiu, X. (2020). V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology*, 160(3), 233–247. <https://doi.org/10.1111/imm.13176>
- Clark, M. R., Mandal, M., Ochiai, K., & Singh, H. (2014). Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 14(2), 69–80. <https://doi.org/10.1038/nri3570>
- Cohen, P., & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(10), 769–776. <https://doi.org/10.1038/35096075>
- Coombs, C. C., Zehir, A., Devlin, S. M., Kishtagari, A., Syed, A., Jonsson, P., Hyman, D. M.,

- Solit, D. B., Robson, M. E., Baselga, J., Arcila, M. E., Ladanyi, M., Tallman, M. S., Levine, R. L., & Berger, M. F. (2017). Therapy-Related Clonal Hematopoiesis in Patients with Non-hematologic Cancers Is Common and Associated with Adverse Clinical Outcomes. *Cell Stem Cell*, 21(3), 374-382.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.010>
- Corces-Zimmerman, M. R., Hong, W.-J., Weissman, I. L., Medeiros, B. C., & Majeti, R. (2014). Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), 2548–2553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324297111>
- Corradi, G., Baldazzi, C., Očadlíková, D., Marconi, G., Parisi, S., Testoni, N., Finelli, C., Cavo, M., Curti, A., & Ciciarello, M. (2018). Mesenchymal stromal cells from myelodysplastic and acute myeloid leukemia patients display in vitro reduced proliferative potential and similar capacity to support leukemia cell survival. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 271. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1013-z>
- Cosgrove, J., Hustin, L. S. P., de Boer, R. J., & Perié, L. (2021). Hematopoiesis in numbers. *Trends in Immunology*, 42(12), 1100–1112. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.10.006>
- Cruz-Rodríguez, N., Combata, A. L., Enciso, L. J., Quijano, S. M., Pinzon, P. L., Lozano, O. C., Castillo, J. S., Li, L., Bareño, J., Cardozo, C., Solano, J., Herrera, M. V., Cudris, J., & Zabaleta, J. (2016). 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 & Clinical Cancer Research*, 35(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0333-z>
- Cruz-Rodríguez, N., Combata, A. L., Enciso, L. J., Raney, L. F., Pinzon, P. L., Lozano, O. C., Campos, A. M., Peñaloza, N., Solano, J., Herrera, M. V., Zabaleta, J., & Quijano, S. (2017).

- Prognostic stratification improvement by integrating ID1/ID3/IGJ gene expression signature and immunophenotypic profile in adult patients with B-ALL. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0506-4>
- de Beauchamp, L., Himonas, E., & Helgason, G. V. (2022). Mitochondrial metabolism as a potential therapeutic target in myeloid leukaemia. *Leukemia*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01416-w>
- DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2020). We need to talk about the Warburg effect. *Nature Metabolism*, 2(2), 127–129. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2>
- Dorshkind, K., & Montecino-Rodríguez, E. (2007). Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nature Reviews Immunology*, 7(3), 213–219. <https://doi.org/10.1038/nri2019>
- Dreyer, W. J., & Bennett, J. C. (1965). The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 54(3), 864–869. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.3.864>
- Ebinger, S., Özdemir, E. Z., Ziegenhain, C., Tiedt, S., Castro Alves, C., Grunert, M., Dworzak, M., Lutz, C., Turati, V. A., Enver, T., Horny, H.-P., Sotlar, K., Parekh, S., Spiekermann, K., Hiddemann, W., Schepers, A., Polzer, B., Kirsch, S., Hoffmann, M., ... Jeremias, I. (2016). Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*, 30(6), 849–862. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.002>
- Ehninger, A., & Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: Mesenchymal stem cells and macrophages move in. *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 421–428. <https://doi.org/10.1084/jem.20110132>
- Faget, D. V., Ren, Q., & Stewart, S. A. (2019). Unmasking senescence: context-dependent effects

of SASP in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 19(8), 439–453. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>

Farmer, J. R., Allard-Chamard, H., Sun, N., Ahmad, M., Bertocchi, A., Mahajan, V. S., Aicher, T., Arnold, J., Benson, M. D., Morningstar, J., Barmettler, S., Yuen, G., Murphy, S. J. H., Walter, J. E., Ghebremichael, M., Shalek, A. K., Batista, F., Gerszten, R., & Pillai, S. (2019). Induction of metabolic quiescence defines the transitional to follicular B cell switch. *Science Signaling*, 12(604). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw5573>

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>

Fidler, M. M., Gupta, S., Soerjomataram, I., Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., & Bray, F. (2017). Cancer incidence and mortality among young adults aged 20–39 years worldwide in 2012: a population-based study. *The Lancet Oncology*, 18(12), 1579–1589. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30677-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30677-0)

Follini, E., Marchesini, M., & Roti, G. (2019). Strategies to Overcome Resistance Mechanisms in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3021. <https://doi.org/10.3390/ijms20123021>

Fovez, Q., Quesnel, B., Laine, W., Khamari, R., Berthon, C., Goursaud, L., Germain, N., Preudhomme, C., Marchetti, P., & Kluza, J. (2020). Mitochondrial Spare Reserve Capacity : A New Predictive Metabolic Biomarker for Aggressiveness of Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, 136(Supplement 1), 7–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-139510>

Gadomski, S., Singh, S. K., Singh, S., Sarkar, T., Klarmann, K. D., Berenschot, M., Seaman, S.,

- Jakubison, B., Gudmundsson, K. O., Lockett, S., & Keller, J. R. (2020). Id1 and Id3 Maintain Steady-State Hematopoiesis by Promoting Sinusoidal Endothelial Cell Survival and Regeneration. *Cell Reports*, *31*(4), 107572. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107572>
- Geldenhuis, W. J., Piktel, D., Moore, J. C., Rellick, S. L., Meadows, E., Pinti, M. V., Hollander, J. M., Ammer, A. G., Martin, K. H., & Gibson, L. F. (2021). Loss of the redox mitochondrial protein mitoNEET leads to mitochondrial dysfunction in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Free Radical Biology & Medicine*, *175*, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.09.003>
- Geretto, M., Pulliero, A., Rosano, C., Zhabayeva, D., Bersimbaev, R., & Izzotti, A. (2017). Resistance to cancer chemotherapeutic drugs is determined by pivotal microRNA regulators. *Am J Cancer Res* . , *7*(6):, 1350-1371.
- Gestrich, C. K., & Oduro, K. A. (2020). Restricted Immunoglobulin Joining Chain (IgJ) Protein Expression in B Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) Based on B-ALL Subtype. *Blood*, *136*(Supplement 1), 7–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-143201>
- Ghil, S.-H., Jeon, Y.-J., & Suh-Kim, H. (2002). Inhibition of BETA2/NeuroD by Id2. *Experimental & Molecular Medicine*, *34*(5), 367–373. <https://doi.org/10.1038/emm.2002.52>
- Gokbuget, N., Dombret, H., Ribera, J.-M., Fielding, A. K., Advani, A., Bassan, R., Chia, V., Doubek, M., Giebel, S., Hoelzer, D., Ifrah, N., Katz, A., Kelsh, M., Martinelli, G., Morgades, M., O'Brien, S., Rowe, J. M., Stieglmaier, J., Wadleigh, M., & Kantarjian, H. (2016). International reference analysis of outcomes in adults with B-precursor Ph-negative relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, *101*(12), 1524–1533. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.144311>
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J.,

- Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., ... Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Green, D. R. (2004). The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science*, 305(5684), 626–629. <https://doi.org/10.1126/science.1099320>
- Gu, L., Yi, Z., Zhang, Y., Ma, Z., Zhu, Y., & Gao, J. (2017). Low dose of 2-deoxy-D-glucose kills acute lymphoblastic leukemia cells and reverses glucocorticoid resistance via N-linked glycosylation inhibition under normoxia. *Oncotarget*, 8(19), 30978–30991. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16046>
- Guerra, F., Arbini, A. A., & Moro, L. (2017). Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), 686–699. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.012>
- Hamad, M., Mohammed, A. K., Hachim, M. Y., Mukhopadhy, D., Khalique, A., Laham, A., Dhaiban, S., Bajbouj, K., & Taneera, J. (2021). Heme Oxygenase-1 (HMOX-1) and inhibitor of differentiation proteins (ID1, ID3) are key response mechanisms against iron-overload in pancreatic β -cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 538, 111462. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111462>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harrison, C. J. (2009). Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia.

British Journal of Haematology, 144(2), 147–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07417.x>

Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Wang, X., Dobbin, K. K., Davidson, G. S., Bedrick, E. J., Chen, I.-M., Atlas, S. R., Kang, H., Ar, K., Wilson, C. S., Wharton, W., Murphy, M., Devidas, M., Carroll, A. J., Borowitz, M. J., Bowman, W. P., Downing, J. R., Relling, M., ... Willman, C. L. (2010). Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, 116(23), 4874–4884. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-239681>

He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*, 169(6), 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>

Hearne, A., Chen, H., Monarchino, A., & Wiseman, J. S. (2020). Oligomycin-induced proton uncoupling. *Toxicology in Vitro*, 67, 104907. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104907>

HEMOTERAPIA, S. E. D. H. Y. (2013). Protocolo Para El Tratamiento De La Leucemia Aguda Linfoblastica De Alto Riesgo Bcr/Abl Negativa En Adultos. *Programa Español Para El Tratamiento De Las Hemopatias Malignas Sociedad*, 1–46.

Herst, P. M., Howman, R. A., Neeson, P. J., Berridge, M. V., & Ritchie, D. S. (2011). The level of glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia blasts at diagnosis is prognostic for clinical outcome. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1), 51–55. <https://doi.org/10.1189/jlb.0710417>

Hidaka, R., Miyazaki, K., & Miyazaki, M. (2022). The E-Id Axis Instructs Adaptive Versus Innate Lineage Cell Fate Choice and Instructs Regulatory T Cell Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 13, 890056. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.890056>

- Hlozkova, K., Pecinova, A., Alquezar-Artieda, N., Pajuelo-Reguera, D., Simcikova, M., Hovorkova, L., Rejlova, K., Zaliova, M., Mracek, T., Kolenova, A., Sary, J., Trka, J., & Starkova, J. (2020). Metabolic profile of leukemia cells influences treatment efficacy of L-asparaginase. *BMC Cancer*, *20*(1), 526. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07020-y>
- Holyoake, T., Jiang, X., Eaves, C., & Eaves, A. (1999). Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*, *94*(6), 2056–2064. <https://doi.org/10477735>
- Huang, C.-H., Mandelker, D., Schmidt-Kittler, O., Samuels, Y., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Gabelli, S. B., & Amzel, L. M. (2007). The Structure of a Human p110/p85 Complex Elucidates the Effects of Oncogenic PI3K Mutations. *Science*, *318*(5857), 1744–1748. <https://doi.org/10.1126/science.1150799>
- Huang, W.-L., Abudurehman, T., Xia, J., Chu, L., Zhou, H., Zheng, W.-W., Zhou, N., Shi, R.-Y., Li, M.-H., Zhu, J.-M., Qing, K., Ji, C., Liang, K.-W., Guo, S., Yin, G., & Duan, C.-W. (2021). CDK9 Inhibitor Induces the Apoptosis of B-Cell Acute Lymphocytic Leukemia by Inhibiting c-Myc-Mediated Glycolytic Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.641271>
- Hui, C. M., Cheung, P. Y., Ling, M. T., Tsao, S. W., Wang, X., Wong, Y. C., & Cheung, A. L. M. (2006). Id-1 promotes proliferation of p53-deficient esophageal cancer cells. *International Journal of Cancer*, *119*(3), 508–514. <https://doi.org/10.1002/ijc.21874>
- Hulleman, E., Kazemier, K. M., Holleman, A., VanderWeele, D. J., Rudin, C. M., Broekhuis, M. J. C., Evans, W. E., Pieters, R., & Den Boer, M. L. (2009). Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, *113*(9), 2014–2021. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-157842>

- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015). Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood*, *125*(26), 3977–3987. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-580043>
- Inthal, A., Krapf, G., Beck, D., Joas, R., Kauer, M. O., Orel, L., Fuka, G., Mann, G., & Panzer-Grümayer, E. R. (2008). Role of the Erythropoietin Receptor in ETV6/RUNX1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Cancer Research*, *14*(22), 7196–7204. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5051>
- Ishibashi, K., Egami, R., Nakai, K., & Kon, S. (2018). An Anti-tumorigenic Role of the Warburg Effect at Emergence of Transformed Cells. *Cell Structure and Function*, *43*(2), 171–176. <https://doi.org/10.1247/csf.18018>
- Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., Nakamura, R., Tanaka, T., Tomiyama, H., Saito, N., Fukata, M., Miyamoto, T., Lyons, B., Ohshima, K., Uchida, N., Taniguchi, S., Ohara, O., Akashi, K., Harada, M., & Shultz, L. D. (2007). Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature Biotechnology*, *25*(11), 1315–1321. <https://doi.org/10.1038/nbt1350>
- Ito, K., Bonora, M., & Ito, K. (2019). Metabolism as master of hematopoietic stem cell fate. *International Journal of Hematology*, *109*(1), 18–27. <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2534-z>
- Ivanovs, A., Rybtsov, S., Welch, L., Anderson, R. A., Turner, M. L., & Medvinsky, A. (2011). Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(12), 2417–2427. <https://doi.org/10.1084/jem.20111688>
- Jaber, S. M., Yadava, N., & Polster, B. M. (2020). Mapping mitochondrial respiratory chain

- deficiencies by respirometry: Beyond the Mito Stress Test. *Experimental Neurology*, 328, 113282. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113282>
- Jan, M., Snyder, T. M., Corces-Zimmerman, M. R., Vyas, P., Weissman, I. L., Quake, S. R., & Majeti, R. (2012). Clonal Evolution of Preleukemic Hematopoietic Stem Cells Precedes Human Acute Myeloid Leukemia. *Science Translational Medicine*, 4(149). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004315>
- Jankovic, V., Ciarrocchi, A., Boccuni, P., DeBlasio, T., Benezra, R., & Nimer, S. D. (2007). Id1 restrains myeloid commitment, maintaining the self-renewal capacity of hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4), 1260–1265. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607894104>
- Jin, X., Yin, J., Kim, S.-H., Sohn, Y.-W., Beck, S., Lim, Y. C., Nam, D.-H., Choi, Y.-J., & Kim, H. (2011). EGFR-AKT-Smad Signaling Promotes Formation of Glioma Stem-like Cells and Tumor Angiogenesis by ID3-Driven Cytokine Induction. *Cancer Research*, 71(22), 7125–7134. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1330>
- Jones, C. L., Inguva, A., & Jordan, C. T. (2021). Targeting Energy Metabolism in Cancer Stem Cells: Progress and Challenges in Leukemia and Solid Tumors. *Cell Stem Cell*, 28(3), 378–393. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.013>
- Judge, A., & Dodd, M. S. (2020). Metabolism. *Essays in Biochemistry*, 64(4), 607–647. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>
- Jun, S., Mahesula, S., Mathews, T. P., Martin-Sandoval, M. S., Zhao, Z., Piskounova, E., & Agathocleous, M. (2021). The requirement for pyruvate dehydrogenase in leukemogenesis depends on cell lineage. *Cell Metabolism*, 33(9), 1777–1792.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.07.016>

- Kantarjian, H., Giles, F., Wunderle, L., Bhalla, K., O'Brien, S., Wassmann, B., Tanaka, C., Manley, P., Rae, P., Mietlowski, W., Bochinski, K., Hochhaus, A., Griffin, J. D., Hoelzer, D., Albitar, M., Dugan, M., Cortes, J., Alland, L., & Ottmann, O. G. (2006). Nilotinib in Imatinib-Resistant CML and Philadelphia Chromosome-Positive ALL. *New England Journal of Medicine*, 354(24), 2542–2551. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa055104>
- Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(7), 517–531. <https://doi.org/10.1038/nrm2438>
- Kierans, S. J., & Taylor, C. T. (2021). Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *The Journal of Physiology*, 599(1), 23–37. <https://doi.org/10.1113/JP280572>
- Kim, J., & Dang, C. V. (2006). Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect. *Cancer Research*, 66(18), 8927–8930. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1501>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Kocabas, F., Zheng, J., Thet, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., DeBerardinis, R. J., Zhang, C., & Sadek, H. A. (2012). Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood*, 120(25), 4963–4972. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-432260>
- Koury, M. J., & Lichtman, M. A. (2010). Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. *Williams Hematology*.
- Kowald, A., Passos, J. F., & Kirkwood, T. B. L. (2020). On the evolution of cellular senescence. *Aging Cell*, 19(12). <https://doi.org/10.1111/acel.13270>

- Kreslavsky, T., Wong, J. B., Fischer, M., Skok, J. A., & Busslinger, M. (2018). Control of B-1a cell development by instructive BCR signaling. *Current Opinion in Immunology*, *51*, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.01.001>
- Kuntz, E. M., Baquero, P., Michie, A. M., Dunn, K., Tardito, S., Holyoake, T. L., Helgason, G. V., & Gottlieb, E. (2017). Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nature Medicine*, *23*(10), 1234–1240. <https://doi.org/10.1038/nm.4399>
- Kurimoto, K., Hayashi, M., Guerrero-Preston, R., Koike, M., Kanda, M., Hirabayashi, S., Tanabe, H., Takano, N., Iwata, N., Niwa, Y., Takami, H., Kobayashi, D., Tanaka, C., Yamada, S., Nakayama, G., Sugimoto, H., Fujii, T., Fujiwara, M., & Kodera, Y. (2017). PAX5 gene as a novel methylation marker that predicts both clinical outcome and cisplatin sensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *Epigenetics*, *12*(10), 865–874. <https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1365207>
- Larson, R. A., Dodge, R. K., Linker, C. A., Stone, R. M., Powell, B. L., Lee, E. J., Schulman, P., Davey, F. R., Frankel, S. R., Bloomfield, C. D., George, S. L., & Schiffer, C. A. (1998). A randomized controlled trial of filgrastim during remission induction and consolidation chemotherapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: CALGB study 9111. *Blood*, *92*(5), 1556–1564. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9716583>
- Lasorella, A., Benezra, R., & Iavarone, A. (2014). The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nature Reviews Cancer*, *14*(2), 77–91. <https://doi.org/10.1038/nrc3638>
- Lee, S., & Schmitt, C. A. (2019). The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature Cell Biology*, *21*(1), 94–101. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2>

- Leni, Z., Ćwiek, P., Dimitrova, V., Dulcey, A. S., Zamboni, N., Simillion, C., Rossi, G., Leibundgut, K., & Arcaro, A. (2017). 2-Deoxy-D-glucose Restore Glucocorticoid Sensitivity in Acute Lymphoblastic Leukemia via Modification of N-Linked Glycosylation in an Oxygen Tension-Independent Manner. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2017/2487297>
- Li, Jia, Roy, S., Kim, Y.-M., Li, S., Zhang, B., Love, C., Reddy, A., Rajagopalan, D., Dave, S., Diehl, A. M., & Zhuang, Y. (2017). Id2 Collaborates with Id3 To Suppress Invariant NKT and Innate-like Tumors. *The Journal of Immunology*, 198(8), 3136–3148. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601935>
- Li, Juan, Williams, M. J., Park, H. J., Bastos, H. P., Wang, X., Prins, D., Wilson, N. K., Johnson, C., Sham, K., Wantoch, M., Watcham, S., Kinston, S. J., Pask, D. C., Hamilton, T. L., Sneade, R., Waller, A. K., Ghevaert, C., Vassiliou, G. S., Laurenti, E., ... Green, A. R. (2022). STAT1 is essential for HSC function and maintains MHCIIhi stem cells that resist myeloablation and neoplastic expansion. *Blood*, 140(14), 1592–1606. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014009>
- Liang, R., Arif, T., Kalmykova, S., Kasianov, A., Lin, M., Menon, V., Qiu, J., Bernitz, J. M., Moore, K., Lin, F., Benson, D. L., Tzavaras, N., Mahajan, M., Papatsenko, D., & Ghaffari, S. (2020). Restraining Lysosomal Activity Preserves Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Potency. *Cell Stem Cell*, 26(3), 359-376.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.013>
- Lin, S. G., Ba, Z., Alt, F. W., & Zhang, Y. (2018). *RAG Chromatin Scanning During V(D)J Recombination and Chromatin Loop Extrusion are Related Processes* (pp. 93–135). <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.07.001>
- Ling, M.-T., Wang, X., Ouyang, X.-S., Lee, T. K., Fan, T.-Y., Xu, K., Tsao, S.-W., & Wong, Y.

- C. (2002). Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. *Oncogene*, *21*(55), 8498–8505. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206007>
- Lucas, D. (2021). Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. In *Current opinion in hematology*. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000621>
- Lucas, D., Salomonis, N., & Grimes, H. L. (2020). Unraveling bone marrow architecture. *Nature Cell Biology*, *22*(1), 5–6. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0447-6>
- Ma, X., Jin, M., Cai, Y., Xia, H., Long, K., Liu, J., Yu, Q., & Yuan, J. (2011). Mitochondrial Electron Transport Chain Complex III Is Required for Antimycin A to Inhibit Autophagy. *Chemistry & Biology*, *18*(11), 1474–1481. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.08.009>
- Malard, F., & Mohty, M. (2020). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, *395*(10230), 1146–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1)
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, *129*(7), 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Mantel, C. R., O’Leary, H. A., Chitteti, B. R., Huang, X., Cooper, S., Hangoc, G., Brustovetsky, N., Srour, E. F., Lee, M. R., Messina-Graham, S., Haas, D. M., Falah, N., Kapur, R., Pelus, L. M., Bardeesy, N., Fitamant, J., Ivan, M., Kim, K.-S., & Broxmeyer, H. E. (2015). Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock. *Cell*, *161*(7), 1553–1565. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.054>
- Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*, *11*(1), 102. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
- Martínez-Reyes, I., Diebold, L. P., Kong, H., Schieber, M., Huang, H., Hensley, C. T., Mehta, M.

- M., Wang, T., Santos, J. H., Woychik, R., Dufour, E., Spelbrink, J. N., Weinberg, S. E., Zhao, Y., DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. *Molecular Cell*, *61*(2), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.002>
- Mayani, H., Flores, E., Pelayo, R., Montesinos, J. J., Flores, P., & Chávez, A. (2007). Hematopoyesis Cancerología 2. *Hematopoyesis*, *2*, 95–107.
- Mern, D. S., Hoppe-Seyler, K., Hoppe-Seyler, F., Hasskarl, J., & Burwinkel, B. (2010). Targeting Id1 and Id3 by a specific peptide aptamer induces E-box promoter activity, cell cycle arrest, and apoptosis in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, *124*(3), 623–633. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0810-6>
- Michon, J. (2002). Incidence of anemia in pediatric cancer patients in Europe: Results of a large, international survey. *Medical and Pediatric Oncology*, *39*(4), 448–450. <https://doi.org/10.1002/mpo.10183>
- Miles, L. A., Bowman, R. L., Merlinsky, T. R., Csete, I. S., Ooi, A. T., Durruthy-Durruthy, R., Bowman, M., Famulare, C., Patel, M. A., Mendez, P., Ainali, C., Demaree, B., Delley, C. L., Abate, A. R., Manivannan, M., Sahu, S., Goldberg, A. D., Bolton, K. L., Zehir, A., ... Levine, R. L. (2020). Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature*, *587*(7834), 477–482. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2864-x>
- Miller, L. H., Qu, C. K., & Pauly, M. (2018). Germline mutations in the bone marrow microenvironment and dysregulated hematopoiesis. *Experimental Hematology*, *66*, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.07.001>
- Miranda-Filho, A., Piñeros, M., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Monnereau, A., & Bray, F. (2018). Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *The Lancet*

- Haematology*, 5(1), e14–e24. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30232-6](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30232-6)
- Mirza, K. M. (2020). Hematopoiesis. *Rodak's Hematology*, 43–61. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-53045-3.00013-1>
- Montecino-Rodríguez, E., & Dorshkind, K. (2012). B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity*, 36(1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.11.017>
- Morgan, M. A., & Lawrence, T. S. (2015). Molecular Pathways: Overcoming Radiation Resistance by Targeting DNA Damage Response Pathways. *Clinical Cancer Research*, 21(13), 2898–2904. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3229>
- Morganti, C., Cabezas-Wallscheid, N., & Ito, K. (2022). Metabolic Regulation of Hematopoietic Stem Cells. *HemaSphere*, 6(7), e740. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000740>
- Mullighan, C. G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C. B., Coustan-Smith, E., Dalton, J. D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S. B., Su, X., Pui, C.-H., Relling, M. V., Evans, W. E., Shurtleff, S. A., & Downing, J. R. (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 446(7137), 758–764. <https://doi.org/10.1038/nature05690>
- Mullighan, C. G., Miller, C. B., Radtke, I., Phillips, L. A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T. P., Le Beau, M. M., Pui, C.-H., Relling, M. V., Shurtleff, S. A., & Downing, J. R. (2008a). BCR–ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*, 453(7191), 110–114. <https://doi.org/10.1038/nature06866>
- Mullighan, C. G., Miller, C. B., Radtke, I., Phillips, L. A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T. P., Le Beau, M. M., Pui, C.-H., Relling, M. V., Shurtleff, S. A., & Downing, J. R. (2008b). BCR–ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*, 453(7191), 110–114. <https://doi.org/10.1038/nature06866>

- Mushtaq, M., Darekar, S., Klein, G., & Kashuba, E. (2015). Different Mechanisms of Regulation of the Warburg Effect in Lymphoblastoid and Burkitt Lymphoma Cells. *PLOS ONE*, *10*(8), e0136142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136142>
- Myriam Campbell, et. a. (2009). *ALL IC-BFM 2009 A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia* (Issue May 2002).
- Nasri Nasrabadi, P., Martin, D., Gharib, E., & Robichaud, G. A. (2022). The Pleiotropy of PAX5 Gene Products and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(17). <https://doi.org/10.3390/ijms231710095>
- Nguyen, K., Devidas, M., Cheng, S.-C., La, M., Raetz, E. A., Carroll, W. L., Winick, N. J., Hunger, S. P., Gaynon, P. S., & Loh, M. L. (2008). Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia*, *22*(12), 2142–2150. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.251>
- Nieto Gutiérrez, W. C., Timana-Ruiz, R., Goicochea-Lugo, S., & Taype-Rondan, A. (2021). Guía de Práctica Clínica para el manejo de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Seguro Social del Perú (EsSalud). *ACTA MEDICA PERUANA*, *38*(1). <https://doi.org/10.35663/amp.2021.381.1038>
- Niles, M. J., Matsuuchi, L., & Koshland, M. E. (1995). Polymer IgM assembly and secretion in lymphoid and nonlymphoid cell lines: evidence that J chain is required for pentamer IgM synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(7), 2884–2888. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2884>
- Nørgaard, J. M., Olesen, L. H., & Hokland, P. (2004). Changing picture of cellular drug resistance in human leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *50*(1), 39–49. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(03\)00173-2](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(03)00173-2)

- O'Brien, Catherine A., Kreso, A., Ryan, P., Hermans, K. G., Gibson, L., Wang, Y., Tsatsanis, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2012). ID1 and ID3 Regulate the Self-Renewal Capacity of Human Colon Cancer-Initiating Cells through p21. *Cancer Cell*, 21(6), 777–792. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.036>
- O'Brien, Catherine Adell, Kreso, A., & Dick, J. E. (2009). Cancer Stem Cells in Solid Tumors: An Overview. *Seminars in Radiation Oncology*, 19(2), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2008.11.001>
- Pajak, B., Siwiak, E., Sołtyka, M., Priebe, A., Zieliński, R., Fokt, I., Ziemniak, M., Jaśkiewicz, A., Borowski, R., Domoradzki, T., & Priebe, W. (2019). 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010234>
- Palis, J., & Segel, G. B. (2016). Hematology of the fetus and newborn. *Williams Hematology*.
- Panahipour, L., Biasi, M. De, Bokor, T. S., Thajer, A., Haiden, N., & Gruber, R. (2020). Milk lactoperoxidase decreases ID1 and ID3 expression in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Scientific Reports*, 10(1), 5836. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62390-4>
- Pantel, K., & Alix-Panabières, C. (2019). Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(7), 409–424. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0187-3>
- Paraskevas, F. (2013). T Lymphocytes and natural killer cells. In *Wintrobe's Clinical Hematology: Thirteenth Edition*.
- Park, S. J., & Bejar, R. (2020). Clonal hematopoiesis in cancer. *Experimental Hematology*, 83, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.02.001>
- Park, S. Y., Chang, I., Kim, J.-Y., Kang, S. W., Park, S.-H., Singh, K., & Lee, M.-S. (2004).

- Resistance of Mitochondrial DNA-depleted Cells against Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7512–7520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307677200>
- Paul, S., Kantarjian, H., & Jabbour, E. J. (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(11), 1645–1666. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010>
- Pavlova, N. N., Zhu, J., & Thompson, C. B. (2022). The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell Metabolism*, 34(3), 355–377. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.01.007>
- Perry, S. S., Zhao, Y., Nie, L., Cochrane, S. W., Huang, Z., & Sun, X.-H. (2007). Id1, but not Id3, directs long-term repopulating hematopoietic stem-cell maintenance. *Blood*, 110(7), 2351–2360. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-069914>
- Pfanner, N., Warscheid, B., & Wiedemann, N. (2019). Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(5), 267–284. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0092-0>
- Pollyea, D. A., & Jordan, C. T. (2017). Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*, 129(12), 1627–1635. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696039>
- Pui, C.-H., Yang, J. J., Bhakta, N., & Rodríguez-Galindo, C. (2018). Global efforts toward the cure of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Child & Adolescent Health*, 2(6), 440–454. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(18\)30066-X](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(18)30066-X)
- Quách, T. D., Hopkins, T. J., Holodick, N. E., Vuyyuru, R., Manser, T., Bayer, R.-L., & Rothstein, T. L. (2016). Human B-1 and B-2 B Cells Develop from Lin – CD34 + CD38 lo Stem Cells. *The Journal of Immunology*, 197(10), 3950–3958. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600630>
- R, V. (1847). Weisses Blut und Milztumoren. *Medicale Zeitung*. ., 16.
- Raza, I. G. A., & Clarke, A. J. (2021). B Cell Metabolism and Autophagy in Autoimmunity.

- Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.681105>
- Rey-Caro, L., Pinzón, P., & Cruz Rodríguez, N. (2020). Mecanismos moleculares emergentes y células madre leucémicas en la quimiorresistencia de tumores hematológicos. *Salud UIS*, 129–144.
- Roschger, C., & Cabrele, C. (2017). The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways. *Cell Communication and Signaling*, 15(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0161-y>
- Rossmann, M. P., Orkin, S. H., & Chute, J. P. (2018). Hematopoietic Stem Cell Biology. In *Hematology: Basic Principles and Practice* (Seventh Ed). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00009-3>
- Rowe, J. M. (2010). Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08246.x>
- Sancho, J.-M., Ribera, J.-M., Xicoy, B., Morgades, M., Oriol, A., Tormo, M., del Potro, E., Debén, G., Abella, E., Bethencourt, C., Ortín, X., Brunet, S., Ortega-Rivas, F., Novo, A., López, R., Hernández-Rivas, J.-M., Sanz, M.-A., Feliu, E., & PETHEMA Group. (2007). Results of the PETHEMA ALL-96 trial in elderly patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Haematology*, 78(2), 102–110. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2006.00778.x>
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., & Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, 59(6), 1035–1048. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90760-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90760-5)
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., & Baltimore, D. (2008). Pillars article: the V(D)J recombination activating gene, RAG-1. 1989. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(1), 5–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096996>

- Sharma, P., Patel, D., & Chaudhary, J. (2012). Id1 and Id3 expression is associated with increasing grade of prostate cancer: Id3 preferentially regulates CDKN1B. *Cancer Medicine*, *1*(2), 187–197. <https://doi.org/10.1002/cam4.19>
- Shlush, L. I., & Feldman, T. (2021). The evolution of leukaemia from pre-leukaemic and leukaemic stem cells. *Journal of Internal Medicine*, *289*(5), 636–649. <https://doi.org/10.1111/joim.13236>
- Shlush, Liran I, Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W. C., Brandwein, J. M., Gupta, V., Kennedy, J. A., Schimmer, A. D., Schuh, A. C., Yee, K. W., McLeod, J. L., Doedens, M., Medeiros, J. J. F., Marke, R., Kim, H. J., Lee, K., McPherson, J. D., Hudson, T. J., HALT Pan-Leukemia Gene Panel Consortium, ... Dick, J. E. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*, *506*(7488), 328–333. <https://doi.org/10.1038/nature13038>
- Shuno, Y., Tsuno, N. H., Okaji, Y., Tsuchiya, T., Sakurai, D., Nishikawa, T., Yoshikawa, N., Sasaki, K., Hongo, K., Tsurita, G., Sunami, E., Kitayama, J., Tokunaga, K., Takahashi, K., & Nagawa, H. (2010). Id1/Id3 Knockdown Inhibits Metastatic Potential of Pancreatic Cancer. *Journal of Surgical Research*, *161*(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.10.031>
- Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., DeBerardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C., & Sadek, H. A. (2010). The Distinct Metabolic Profile of Hematopoietic Stem Cells Reflects Their Location in a Hypoxic Niche. *Cell Stem Cell*, *7*(3), 380–390. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.011>
- Solit, D. B., & Mellinghoff, I. K. (2010). Tracing cancer networks with phosphoproteomics. *Nature Biotechnology*, *28*(10), 1028–1029. <https://doi.org/10.1038/nbt1010-1028>
- SONG, K., LI, M., XU, X., XUAN, L., HUANG, G., & LIU, Q. (2016). Resistance to chemotherapy is associated with altered glucose metabolism in acute myeloid leukemia.

Oncology Letters, 12(1), 334–342. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4600>

Souza Silva, K., Spagnol, F., Granero Farias, M., Alegretti, A., Michalowski, M., & Esteves Daudt, L. (2019). Influence of minimal residual disease by multiparametric flow cytometry at day 15 of induction in risk stratification of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia treated at a referral hospital in southern Brazil. . *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 2531-1379., 2531–1379.

Spencer, J. A., Ferraro, F., Roussakis, E., Klein, A., Wu, J., Runnels, J. M., Zaher, W., Mortensen, L. J., Alt, C., Turcotte, R., Yusuf, R., Côté, D., Vinogradov, S. A., Scadden, D. T., & Lin, C. P. (2014). Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*, 508(7495), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature13034>

Spencer, N. Y., & Stanton, R. C. (2019). The Warburg Effect, Lactate, and Nearly a Century of Trying to Cure Cancer. *Seminars in Nephrology*, 39(4), 380–393. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2019.04.007>

Sary, J., Zimmermann, M., Campbell, M., Castillo, L., Dibar, E., Donska, S., Gonzalez, A., Izraeli, S., Janic, D., Jazbec, J., Konja, J., Kaiserova, E., Kowalczyk, J., Kovacs, G., Li, C.-K., Magyarosy, E., Popa, A., Stark, B., Jabali, Y., ... Schrappe, M. (2014). Intensive Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Randomized Intercontinental Trial ALL IC-BFM 2002. *Journal of Clinical Oncology*, 32(3), 174–184. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.48.6522>

Steele, M., & Narendran, A. (2012). Mechanisms of defective erythropoiesis and anemia in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Annals of Hematology*, 91(10), 1513–1518. <https://doi.org/10.1007/s00277-012-1475-5>

Suda, T., Takubo, K., & Semenza, G. L. (2011). Metabolic Regulation of Hematopoietic Stem

- Cells in the Hypoxic Niche. *Cell Stem Cell*, 9(4), 298–310.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.010>
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity*, 25(6), 977–988. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.016>
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R. S., Hirao, A., Suematsu, M., & Suda, T. (2010). Regulation of the HIF-1 α Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7(3), 391–402.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.020>
- Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C. I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R. S., Soga, T., Hirao, A., Suematsu, M., & Suda, T. (2013). Regulation of Glycolysis by Pdk Functions as a Metabolic Checkpoint for Cell Cycle Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 12(1), 49–61.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.011>
- Tan, H.-Y., Wang, N., Chan, Y.-T., Zhang, C., Guo, W., Chen, F., Zhong, Z., Li, S., & Feng, Y. (2020). ID1 overexpression increases gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer by activating RIP3/MLKL-dependent necroptosis. *Cancer Letters*, 475, 109–118.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.025>
- Tavian, M., Biasch, K., Sinka, L., Vallet, J., & Péault, B. (2010). Embryonic origin of human hematopoiesis. *International Journal of Developmental Biology*, 54(6–7), 1061–1065.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.103097mt>
- Tonegawa, S., Steinberg, C., Dube, S., & Bernardini, A. (1974). Evidence for Somatic Generation of Antibody Diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10), 4027–4031.

<https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.4027>

Trias, S. de H. C. I.-H. U. G. (2013). *QUIMIOTERAPIA E IMATINIB, SEGUIDO DE TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN ADULTOS JÓVENES (EDAD INFERIOR A 55 AÑOS) CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA Ph (BCR-ABL) POSITIVA.*

Tzoneva, G., Perez-Garcia, A., Carpenter, Z., Khiabani, H., Tosello, V., Allegretta, M., Paietta, E., Racevskis, J., Rowe, J. M., Tallman, M. S., Paganin, M., Basso, G., Hof, J., Kirschner-Schwabe, R., Palomero, T., Rabadan, R., & Ferrando, A. (2013). Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nature Medicine*, *19*(3), 368–371. <https://doi.org/10.1038/nm.3078>

Valcourt, J. R., Lemons, J. M. S., Haley, E. M., Kojima, M., Demuren, O. O., & Coller, H. A. (2012). Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *11*(9), 1680–1696. <https://doi.org/10.4161/cc.19879>

Vander Heiden, M. G., & DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, *168*(4), 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>

Vasan, K., Werner, M., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cell Metabolism*, *32*(3), 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.019>

Vaupel, P., & Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *The Journal of Physiology*, *599*(6), 1745–1757. <https://doi.org/10.1113/JP278810>

Vera, A. M., Pardo, C., Duarte, M. C., & Suárez, A. (2012). [Analysis of mortality in pediatric acute leukemia at the National Cancer Institute]. *Biomedica*, *32*(3), 355–364.

- Virely, C., Moulin, S., Cobaleda, C., Lasgi, C., Alberdi, A., Soulier, J., Sigaux, F., Chan, S., Kastner, P., & Ghysdael, J. (2010). Haploinsufficiency of the IKZF1 (IKAROS) tumor suppressor gene cooperates with BCR-ABL in a transgenic model of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *24*(6), 1200–1204. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.63>
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *12*(10), 685–698. <https://doi.org/10.1038/nrc3365>
- Walter, D., Lier, A., Geiselhart, A., Thalheimer, F. B., Huntscha, S., Sobotta, M. C., Moehrle, B., Brocks, D., Bayindir, I., Kaschutnig, P., Muedder, K., Klein, C., Jauch, A., Schroeder, T., Geiger, H., Dick, T. P., Holland-Letz, T., Schmezer, P., Lane, S. W., ... Milsom, M. D. (2015). Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature*, *520*(7548), 549–552. <https://doi.org/10.1038/nature14131>
- Wang, B., Kohli, J., & Demaria, M. (2020). Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends in Cancer*, *6*(10), 838–857. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.004>
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, *123*(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Waters, L. R., Ahsan, F. M., Wolf, D. M., Shirihai, O., & Teitell, M. A. (2018). Initial B Cell Activation Induces Metabolic Reprogramming and Mitochondrial Remodeling. *IScience*, *5*, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.07.005>
- Wei, Q., & Frenette, P. S. (2018). Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity*, *48*(4), 632–648. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.024>
- Weijie, L. (Ed.). (2022). *Leukemia*. Exon Publications. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-leukemia>
- Wellmann, S., Guschmann, M., Griethe, W., Eckert, C., Stackelberg, A., Lottaz, C., Moderegger,

- E., Einsiedel, H. G., Eckardt, K.-U., Henze, G., & Seeger, K. (2004). Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia*, *18*(5), 926–933. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403332>
- Whiteley, A. E., Price, T. T., Cantelli, G., & Sipkins, D. A. (2021). Leukaemia: a model metastatic disease. *Nature Reviews Cancer*, *21*(7), 461–475. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00355-z>
- Whitley, B. N., Engelhart, E. A., & Hoppins, S. (2019). Mitochondrial dynamics and their potential as a therapeutic target. *Mitochondrion*, *49*, 269–283. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.06.002>
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R. C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C. F., Eshkind, L., Bockamp, E., Lió, P., MacDonald, H. R., & Trumpp, A. (2008). Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell*, *135*(6), 1118–1129. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.048>
- Xia, L., Oyang, L., Lin, J., Tan, S., Han, Y., Wu, N., Yi, P., Tang, L., Pan, Q., Rao, S., Liang, J., Tang, Y., Su, M., Luo, X., Yang, Y., Shi, Y., Wang, H., Zhou, Y., & Liao, Q. (2021). The cancer metabolic reprogramming and immune response. *Molecular Cancer*, *20*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01316-8>
- Xiao, G., Chan, L. N., Klemm, L., Braas, D., Chen, Z., Geng, H., Zhang, Q. C., Aghajani-refah, A., Cosgun, K. N., Sadras, T., Lee, J., Mirzapoiiazova, T., Salgia, R., Ernst, T., Hochhaus, A., Jumaa, H., Jiang, X., Weinstock, D. M., Graeber, T. G., & Müschen, M. (2018). B-Cell-Specific Diversion of Glucose Carbon Utilization Reveals a Unique Vulnerability in B Cell Malignancies. *Cell*, *173*(2), 470-484.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.048>
- Ye, H., Adane, B., Khan, N., Sullivan, T., Minhajuddin, M., Gasparetto, M., Stevens, B., Pei, S.,

- Balys, M., Ashton, J. M., Klemm, D. J., Woolthuis, C. M., Stranahan, A. W., Park, C. Y., & Jordan, C. T. (2016a). Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell*, 19(1), 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.001>
- Ye, H., Adane, B., Khan, N., Sullivan, T., Minhajuddin, M., Gasparetto, M., Stevens, B., Pei, S., Balys, M., Ashton, J. M., Klemm, D. J., Woolthuis, C. M., Stranahan, A. W., Park, C. Y., & Jordan, C. T. (2016b). Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell*, 19(1), 23–37. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.001>
- Yin, X., Tang, B., Li, J.-H., Wang, Y., Zhang, L., Xie, X.-Y., Zhang, B.-H., Qiu, S.-J., Wu, W.-Z., & Ren, Z.-G. (2017). ID1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation and confers chemoresistance to oxaliplatin by activating pentose phosphate pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0637-7>
- Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I., & Smith, A. (2003). BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), 281–292. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00847-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00847-X)
- Zhang, J., Mullighan, C. G., Harvey, R. C., Wu, G., Chen, X., Edmonson, M., Buetow, K. H., Carroll, W. L., Chen, I.-M., Devidas, M., Gerhard, D. S., Loh, M. L., Reaman, G. H., Relling, M. V., Camitta, B. M., Bowman, W. P., Smith, M. A., Willman, C. L., Downing, J. R., & Hunger, S. P. (2011). Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*, 118(11), 3080–3087. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-341412>

- Zhang, M.-Y., Liu, S.-L., Huang, W.-L., Tang, D.-B., Zheng, W.-W., Zhou, N., Zhou, H., Abudurehman, T., Tang, Z.-H., Zhou, B.-B. S., & Duan, C.-W. (2020). Bromodomains and Extra-Terminal (BET) Inhibitor JQ1 Suppresses Proliferation of Acute Lymphocytic Leukemia by Inhibiting c-Myc-Mediated Glycolysis. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e923411. <https://doi.org/10.12659/MSM.923411>
- Zhang, W., Wang, G., & Liang, A. (2019). DNA Damage Response in Quiescent Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Stem Cells (pp. 147–171). https://doi.org/10.1007/978-981-13-7342-8_7
- Zhang, Y., Guo, H., Guo, X., Ge, D., Shi, Y., Lu, X., Lu, J., Chen, J., Ding, F., & Zhang, Q. (2019). Involvement of Akt/mTOR in the Neurotoxicity of Rotenone-Induced Parkinson's Disease Models. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(20), 3811. <https://doi.org/10.3390/ijerph16203811>
- Zhao, Q., Chang, C., Gonzalez, J. P., Alzahrani, K., Button, J. L., & Fraidenraich, D. (2016). Combined Id1 and Id3 Deletion Leads to Severe Erythropoietic Disturbances. *PLOS ONE*, 11(4), e0154480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154480>
- Zink, F., Stacey, S. N., Norrdahl, G. L., Frigge, M. L., Magnusson, O. T., Jonsdottir, I., Thorgeirsson, T. E., Sigurdsson, A., Gudjonsson, S. A., Gudmundsson, J., Jonasson, J. G., Tryggvadottir, L., Jonsson, T., Helgason, A., Gylfason, A., Sulem, P., Rafnar, T., Thorsteinsdottir, U., Gudbjartsson, D. F., ... Stefansson, K. (2017). Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood*, 130(6), 742–752. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-769869>

Apéndices

Apéndice A. Protocolo de inclusión de pacientes al estudio.

1. La gestión de los eventos se realizó bajo dos circunstancias: En la primera se atendieron las alertas generadas por los especialistas de posibles pacientes con diagnóstico de LLA, o por la segunda que fue asistir directamente al llamado de confirmación por parte del laboratorio de citometría cuando se confirmó un diagnóstico de LLA-B.
2. Se evaluaron los siguientes criterios inclusión para posibles candidatos a entrar en el estudio:
 - Pacientes con sospecha de leucemia aguda.
 - Pacientes candidatos a recibir esquema de tratamiento de inducción de acuerdo con el protocolo institucional para pacientes con Leucemia Aguda del centro participante en el estudio.
 - Pacientes que manifiesten deseo de participación en el estudio.
 - Pacientes de los cuales se pueda obtener una muestra de médula ósea al inicio del tratamiento de inducción y al momento de la valoración de respuesta al tratamiento.
 - Pacientes de los cuales se tenga disponibilidad de acceso a la historia clínica y a los datos respecto al estado de la enfermedad.
3. Se excluirán las muestras de pacientes que cumplan los siguientes criterios:
 - Pacientes con enfermedad neoplásica hematológica maligna previa.
 - Pacientes que hayan recibido quimioterapia previa para cualquier tipo de cáncer.
 - Pacientes con limitación mental.

- Pacientes en embarazo en cualquier etapa.
4. Una vez evaluado los criterios de inclusión y exclusión de los pacientes, se procede a impartir los consentimientos y asentimientos informados según corresponda (Anexo 2).
 5. Una vez el diagnóstico de la enfermedad sea confirmado por el centro tratante, se incluirán las muestras de pacientes diagnosticados con LLA-B.

Apéndice B. Asentimiento informado en su última versión.

	UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA	CÓDIGO IDENTIFICACIÓN
--	---	--------------------------

Evaluación de los mecanismos de resistencia tumoral relacionados con la firma de expresión génica de mal pronóstico ID1/ID3/IG.J y su efecto en la plasticidad metabólica de leucemia linfoblástica aguda

Informe de asentimiento informado

Nosotros venimos del Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular de la UIS y estamos realizando un proyecto en el cual se busca determinar cuáles son las razones por las cuales algunos pacientes con leucemia son resistentes al tratamiento, lo cual hace que muchos pacientes en Colombia recaigan o mueran. Para esto, necesitamos contar con la participación de niños y niñas de 0 a 17 años a los que les vayan a hacer exámenes de médula ósea para diagnosticar su enfermedad y por ello queremos pedir tu colaboración. Si decides participar, utilizaremos la parte de la muestra que sobra de la muestra de médula ósea que te tomará el médico para hacer el diagnóstico de tu enfermedad. Por lo tanto, la participación en este proyecto no generará riesgos ni molestias adicionales para ti. Además, el tratamiento y los exámenes que te harán serán exactamente iguales que a los otros niños y tu participación no afectará tu salud de ninguna manera.

Con esta muestra, haremos las pruebas de laboratorio que nos permitan entender la enfermedad y definir las características que hacen que algunas células sean más resistentes (Figura 1). Después de realizar las pruebas necesarias, las muestras serán guardadas congeladas para futuros estudios realizados en nuestro laboratorio los cuales pueden contribuir en el estudio de la leucemia de otros niños y adultos.

Ya hemos hablado con tus papas y ellos saben que te estamos preguntando si quieres participar. Debes tener en cuenta que tu participación en el estudio es voluntaria, es decir, aun cuando tus papas hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no, es tu decisión. También es importante que tengas claro que tu ni tus papás recibirán dinero por participar. Si en algún momento no quieres continuar en el estudio y deseas retirar la información entrega al proyecto o no quieres contestar alguna pregunta no habrá ningún problema.

Las únicas personas que sabrán que participaste en el estudio somos los miembros del equipo de investigación. Nosotros no divulgaremos ningún tipo de información que pueda revelar tu identidad ya que tu muestra será identificada con un código asignado completamente al azar de manera que no se pueda identificar quien es el dueño de cada muestra.



16/7/21

	UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA	CÓDIGO IDENTIFICACIÓN
--	---	--------------------------

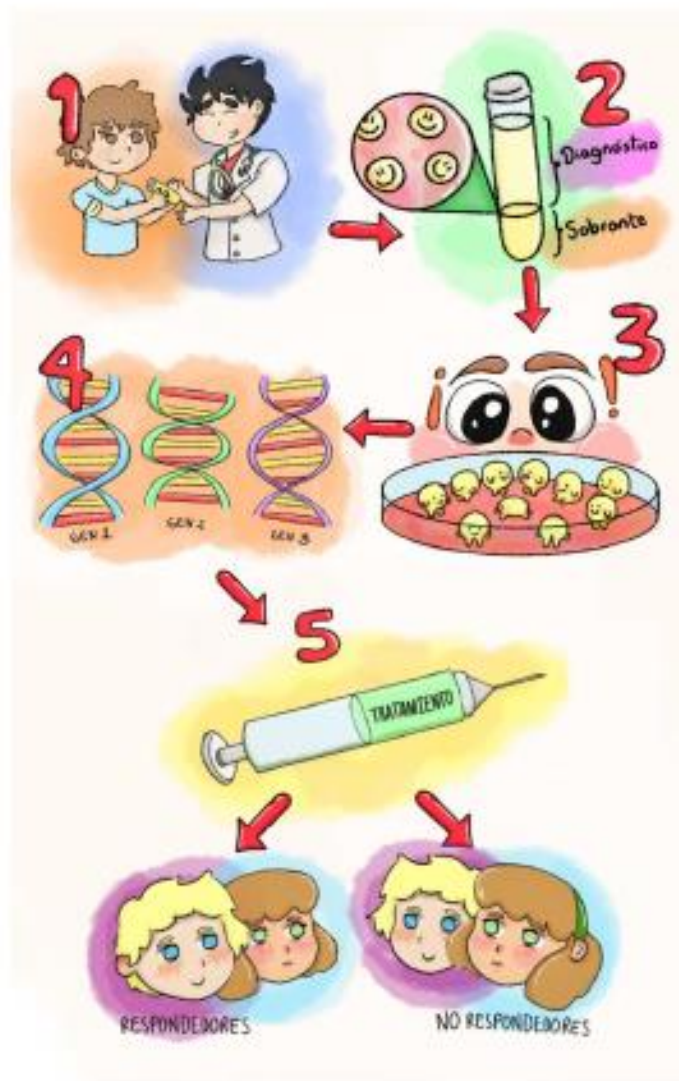


Figura 1

"Sé que puedo elegir participar en la investigación o no hacerlo. Sé que puedo retirarme cuando quiera y he leído esta información (o se me ha leído la información) y la entiendo. Me han respondido las preguntas y sé que puedo hacer preguntas más tarde si las tengo. Entiendo que cualquier cambio se discutirá conmigo. Acepto participar en la investigación".

El uso de este consentimiento está aprobado por tres años a partir del inicio de las actividades de investigación.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
 FACULTAD DE SALUD
 ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS
 GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA
 MOLECULAR
 Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA

	UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA	CÓDIGO IDENTIFICACIÓN
--	---	--------------------------

**EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA TUMORAL RELACIONADOS
 CON LA FIRMA DE EXPRESIÓN GÉNICA DE MAL PRONÓSTICO ID1/ID3/IGJ Y SU
 EFECTO EN LA PLASTICIDAD METABÓLICA DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
 AGUDA**

Acepto: Si No

Nombre: _____

Fecha: ____ / ____ / ____

Persona que imparte el consentimiento:



Nombre: _____

Firma: _____

Fecha: ____ / ____ / ____

16/7/21

Apéndice C. Consentimiento informado para padres en su última versión.

 	<p>UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA</p>	<p>CÓDIGO IDENTIFICACIÓN</p>
---	--	---

Evaluación de los mecanismos de resistencia tumoral relacionados con la firma de expresión génica de mal pronóstico ID1/ID3/IGJ y su efecto en la plasticidad metabólica de leucemia linfoblástica aguda

Informe de Consentimiento informado para padres de menores de edad



La Leucemia Linfoblástica Aguda de precursores B (LLA-B) se presenta en niños y adultos. Esta enfermedad es la principal causa de cáncer en niños y aunque en los pacientes adultos es menos frecuente, es muy agresiva. Colombia junto con Costa Rica son los países donde más se diagnostican pacientes con leucemia a nivel mundial. Adicionalmente, en Colombia mueren más pacientes con leucemia en comparación con países desarrollados. Una de las principales razones por las cuales el tratamiento de la leucemia no funciona es debido a que las células del tumor se hacen resistentes a los medicamentos de la quimioterapia, lo que ocasiona que la enfermedad vuelva y el paciente recaiga. Debido a que no sabemos cuáles son las características que hacen que los pacientes sean resistentes al tratamiento, se desea hacer un estudio para determinar cuáles son estas propiedades que hacen que los pacientes con leucemia tengan tan mal pronóstico.

En estudios anteriores, nosotros encontramos que existen tres genes que cuando se sobreexpresan en los pacientes adultos con leucemia, los hace más resistentes al tratamiento. Sin embargo, no hemos investigado si esto también sucede en los niños y consideramos importante analizar si estos genes también tienen un efecto en su enfermedad con el fin de poder utilizarlos a futuro como una herramienta para identificar desde el momento del diagnóstico si los pacientes menores responderán bien o mal al tratamiento. Por lo tanto, para poder llevar a cabo este proyecto, necesitamos contar con la participación de niños y niñas de 0 a 17 años a los que les vayan a hacer exámenes de médula ósea para diagnosticar su enfermedad que no hayan tenido otro tipo de cáncer anteriormente y por ello queremos pedir la colaboración de su hijo(a). Esperamos incluir en este estudio todos los niños y niñas que sean diagnosticados con LLA-B durante dos años en el Hospital Universitario de Santander y otros centros participantes. La participación de su hijo(a) consistirá en permitirnos usar la parte de la muestra de médula ósea que sobra de la muestra que le tomará el médico para hacer el diagnóstico de su enfermedad. Por lo tanto, la participación en este proyecto no generará riesgos ni molestias adicionales para su hijo(a). Los pacientes que participan en el estudio no tendrá diferencias en cuanto a los procedimientos que se realizan habitualmente a los pacientes con esta enfermedad ni afectará su salud de ninguna manera. Usted debe saber que para la realización de este procedimiento se cuenta con personal calificado, que atenderá cualquier inquietud que usted o su hijo(a) pueda tener.

Esta muestra de médula ósea se usará durante los 3 años del estudio para buscar si se expresan algunos genes cuya alteración pueda estar relacionada con una mayor o menor posibilidad de responder al tratamiento durante la quimioterapia y las células serán usadas para hacer algunas pruebas en el laboratorio para evaluar si hay alteraciones metabólicas que puedan estar relacionadas con la expresión de estos genes y con las características

INFORMACIÓN GENERAL DE SU INSTITUCIÓN
 COMITÉ DE ÉTICA


16/7/21

 	<p>UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA</p>	<p>CÓDIGO IDENTIFICACIÓN</p>
---	--	---

de la enfermedad registradas en la historia clínica. Después de realizar las pruebas necesarias, las muestras serán guardadas congeladas para futuros estudios realizados en nuestro laboratorio los cuales pueden contribuir en el estudio de la leucemia. Usted debe saber que con la participación de su hijo(a) en este estudio está contribuyendo en la búsqueda de nuevas alternativas para entender y tratar esta enfermedad, lo que a futuro puede ayudar y salvar la vida de muchos niños y adultos con leucemia.

Las únicas personas que sabrán que su hijo(a) participó en el estudio somos los miembros del equipo de investigación. Nosotros no divulgaremos ninguna información sobre él/ella y cuando los resultados de la investigación se publiquen o se discutan en conferencias, no se incluirá ningún tipo de información que pueda revelar la identidad de él/ella, adicionalmente si usted y su hijo(a) lo desean, nos comprometemos a estar informándoles acerca de los resultados obtenidos en el estudio. Las muestras serán identificadas con un número asignado completamente al azar de manera que no se pueda identificar quien es el dueño de cada muestra.

La participación de su hijo(a) en esta investigación es totalmente voluntaria y los pacientes que acepten participar no recibirán ningún pago económico. Usted puede autorizar que el participe o no. De igual manera, usted y/o su hijo(a) puede cambiar de idea más tarde y elegir dejar de participar y retirar la información suministrada al proyecto, aun cuando hayan aceptado antes y esto no va a generar ningún tipo de inconveniente.



De igual forma, cualquier duda o inquietud que tenga tanto usted como su hijo(a) sobre el procedimiento a seguir o sobre el estudio le será resuelta por el personal de trabajo el cual está capacitado para brindarle toda la información necesaria.

Tras haber recibido información clara y sencilla, he leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente que mi hijo(a) participe en esta investigación y entiendo que tiene el derecho de retirarse de la misma en cualquier momento.

El uso de este consentimiento está aprobado por tres años a partir del inicio de las actividades de investigación.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
 FACULTAD DE SALUD
 ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS
 GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR
 Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA

16/7/21

		UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA	CÓDIGO IDENTIFICACIÓN
---	---	---	--------------------------

**EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA TUMORAL RELACIONADOS
 CON LA FIRMA DE EXPRESIÓN GÉNICA DE MAL PRONÓSTICO ID1/ID3/IGJ Y SU
 EFECTO EN LA PLASTICIDAD METABÓLICA DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
 AGUDA**

Acepto: Si No

Nombre: _____

Fecha: ____ / ____ / ____



16/7/21

Nombre del testigo 1 _____ Firma _____

Documento de identidad _____

Dirección _____ Tel/cel _____

Relación que tiene con el paciente _____

Fecha de la firma ____ / ____ / ____

Nombre del testigo 2 _____ Firma _____

Documento de identidad _____

Dirección _____ Tel/cel _____



Relación que tiene con el paciente _____

Fecha de la firma ____ / ____ / ____

Persona que imparte el consentimiento:

Nombre: _____

Firma: _____

 	<p>UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA</p>	<p>CÓDIGO IDENTIFICACIÓN</p>
---	---	----------------------------------



Fecha: _____ / _____ / _____



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
COMITÉ DE ÉTICA

16/7/21

Apéndice D. Consentimiento informado para mayores de edad en su última versión.

 	UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA	CÓDIGO IDENTIFICACIÓN
---	---	--------------------------

Evaluación de los mecanismos de resistencia tumoral relacionados con la firma de expresión génica de mal pronóstico ID1/ID3/IG.J y su efecto en la plasticidad metabólica de leucemia linfoblástica aguda

Informe de Consentimiento informado para mayores de edad

La Leucemia Linfoblástica Aguda de precursores B (LLA-B) se presenta en niños y adultos. Esta enfermedad es la principal causa de cáncer en niños y aunque en los pacientes adultos es menos frecuente, es muy agresiva. Colombia junto con Costa Rica son los países donde más se diagnostican pacientes con leucemia a nivel mundial. Adicionalmente, en Colombia mueren más pacientes con leucemia en comparación con países desarrollados. Una de las principales razones por las cuales el tratamiento de la leucemia no funciona es debido a que las células del tumor se hacen resistentes a los medicamentos de la quimioterapia, lo que ocasiona que la enfermedad vuelva y el paciente recaiga. Debido a que no sabemos cuáles son las características que hacen que los pacientes sean resistentes al tratamiento, se desea hacer un estudio para determinar cuáles son estas propiedades que hacen que los pacientes con leucemia tengan tan mal pronóstico.



Para llevar a cabo este proyecto estamos invitando a participar a pacientes mayores de edad con sospecha de leucemia aguda que no hayan tenido otro tipo de cáncer anteriormente. Todos los pacientes con sospecha de leucemia aguda requieren para su diagnóstico la realización del procedimiento conocido como aspirado y biopsia de médula ósea. En este procedimiento el hematólogo que lo está tratando toma las muestras para realizar las pruebas necesarias para un adecuado diagnóstico y clasificación de la enfermedad. Igualmente, después del tratamiento de inducción el hematólogo le tomará otra muestra de médula ósea para determinar la respuesta al tratamiento y definir su conducción final de tratamiento. Esperamos incluir en este estudio todos pacientes adultos que sean diagnosticados con LLA-B durante dos años en el Hospital Universitario de Santander y otros centros participantes.

Para aquellos pacientes que voluntariamente acepten participar, durante el diagnóstico y seguimiento del tratamiento, se recogerá la muestra que sobra luego de realizar el diagnóstico de su enfermedad. Por lo tanto, la participación en este proyecto no generará riesgos ni molestias adicionales. El paciente que desee participar no tendrá diferencias en cuanto a los procedimientos que se realizan habitualmente a los pacientes con esta enfermedad ni afectará su salud de ninguna manera. Por lo tanto, si usted decide participar en el estudio usaremos la muestra de médula ósea que sobra después de haber usado la cantidad necesaria para realizar el diagnóstico de su enfermedad.

Esta muestra de médula ósea se usará durante los 3 años del estudio para buscar si se expresan algunos genes cuya alteración pueda estar relacionada con una mayor o menor posibilidad de responder al tratamiento durante la quimioterapia y las células serán usadas para hacer algunas pruebas en el laboratorio para evaluar si hay alteraciones metabólicas

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
 ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS
 GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR
 Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA

16/7/21

 	<p>UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA</p>	<p>CÓDIGO IDENTIFICACIÓN</p>
---	---	----------------------------------

que puedan estar relacionadas con la expresión de estos genes y con las características de la enfermedad registradas en la historia clínica. Después de realizar las pruebas necesarias, las muestras serán guardadas congeladas para futuros estudios realizados en nuestro laboratorio los cuales pueden contribuir en el estudio de la leucemia.

Las únicas personas que sabrán que usted participó en el estudio somos los miembros del equipo de investigación. Nosotros no divulgaremos ninguna información sobre usted y cuando los resultados de la investigación se publiquen o se discutan en conferencias, no se incluirá ningún tipo de información que pueda revelar su identidad y nos comprometemos, si usted lo desea a estar informándole los resultados obtenidos en el estudio. Las muestras serán identificadas con un número asignado completamente al azar de manera que no se pueda identificar quien es el dueño de cada muestra.

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria, usted puede elegir participar o no hacerlo. Los pacientes que acepten participar no recibirán ningún pago económico. Asimismo, si usted cambia de opinión más adelante y desea dejar de participar en el estudio y retirar la información suministrada al proyecto lo puede realizar y esto no va a generar ningún tipo de inconveniente.

De igual forma, cualquier duda o inquietud que tenga sobre el procedimiento a seguir o sobre el estudio le será resuelta por el personal de trabajo el cual está capacitado para brindarle toda la información necesaria.

Tras haber recibido información clara y sencilla, he leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la misma en cualquier momento.

El uso de este consentimiento está aprobado por tres años a partir del inicio de las actividades de investigación.


EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA TUMORAL RELACIONADOS CON LA FIRMA DE EXPRESIÓN GÉNICA DE MAL PRONÓSTICO ID1/ID3/IGJ Y SU EFECTO EN LA PLASTICIDAD METABÓLICA DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Nombre del participante o representante legal

Firma

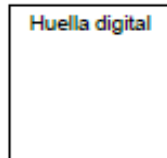
INFORMACIÓN PARA EL PARTICIPANTE
COMITÉ DE ÉTICA


16/7/21

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA</p>	<p style="text-align: center;">CÓDIGO IDENTIFICACIÓN</p>
---	---	--

La firma puede ser sustituida por la huella digital en los casos que se amerite

Huella digital



Nombre del testigo 1 _____ Firma _____

Documento de identidad _____

Dirección _____ Tel/cel _____

Relación que tiene con el paciente _____

Fecha de la firma ____ / ____ / ____

Nombre del testigo 2 _____ Firma _____

Documento de identidad _____

Dirección _____ Tel/cel _____

Relación que tiene con el paciente _____



Fecha de la firma ____ / ____ / ____

Persona que imparte el consentimiento:

Nombre: _____

Firma: _____

Fecha: ____ / ____ / ____

 	UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER FACULTAD DE SALUD ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS GRUPO DE INMUNOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Dr. JOSE ARTURO GUTIERREZ TRIANA	CÓDIGO IDENTIFICACIÓN
---	---	--------------------------



16/7/21

Apéndice E. Tabla de descripción de las variables clínicas, moleculares y de laboratorio a evaluar.

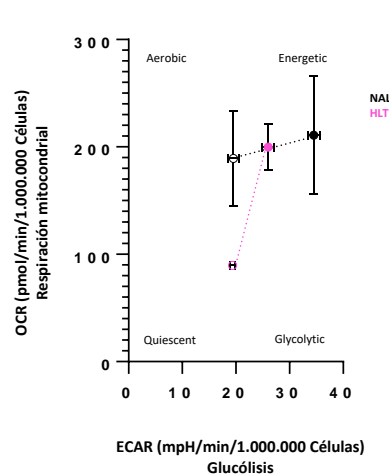
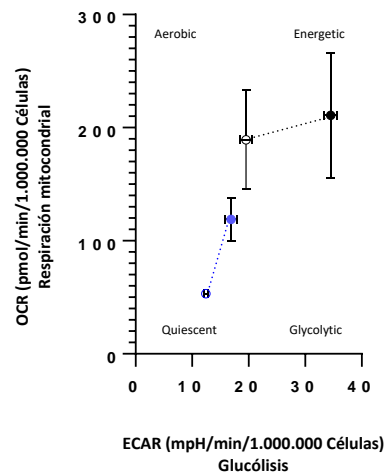
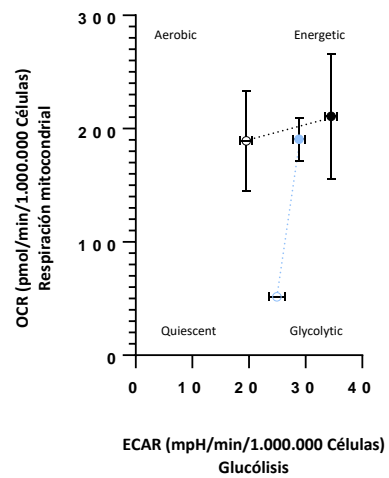
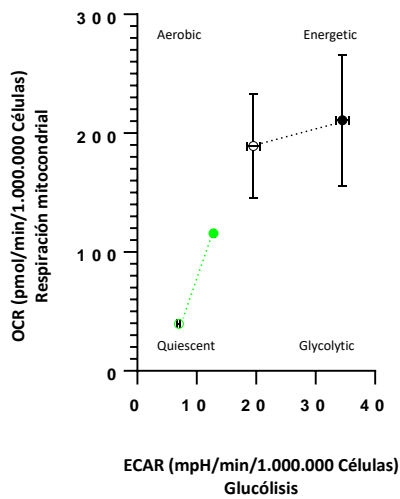
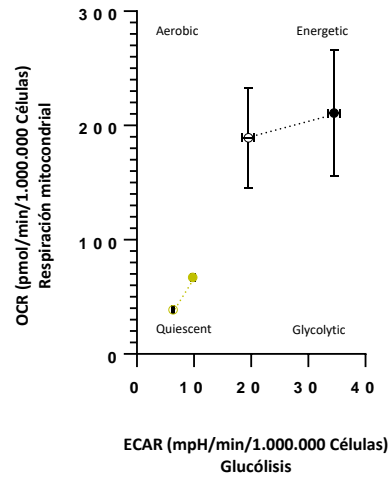
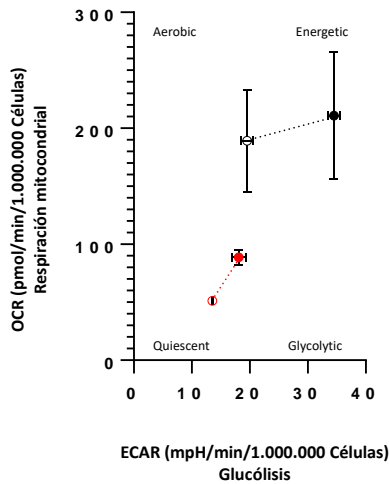
Variable	Definición operativa	Naturaleza	Nivel operativo
<u>Características del paciente</u>			
Edad	Años cumplidos al momento de la toma de la muestra de médula ósea.	Cuantitativa Continua	Años
Sexo	Género de nacimiento del paciente.	Cualitativa Nominal	Hombre, mujer
<u>Información de laboratorio clínico</u>			
Recuento de leucocitos	Recuento de leucocitos registrados en el hemograma al momento del diagnóstico.	Cuantitativa Continua	Leucocitos/uL
Recuento de neutrófilos	Recuento absoluto de neutrófilos registrado en el hemograma al momento del diagnóstico.	Cuantitativa Continua	Neutrófilos/uL
Recuento de plaquetas	Recuento de plaquetas al diagnóstico.	Cuantitativa Continua	Plaquetas/uL
Hemoglobina	Hemoglobina al diagnóstico registrada en el hemograma.	Cuantitativa Continua	g/dL
Niveles de LDH	Lactato deshidrogenasa en realizada al momento del diagnóstico.	Cuantitativa Continua	U/L
<u>Información patológica</u>			

Variable	Definición operativa	Naturaleza	Nivel operativo
Porcentaje de blastos en mielograma	Blastos registrados en el mielograma de cada paciente al momento del diagnóstico (INC, HUSI).	Cuantitativa Continua	% de blastos
Porcentaje de blastos por citometría de flujo	Blastos en médula ósea registrado en el reporte de Citometría de flujo al momento del diagnóstico.	Cuantitativa Continua	% de blastos
Porcentaje de blastos en sangre periférica	Blastos en sangre periférica registrados en el hemograma al momento del diagnóstico.	Cuantitativa Continua	% de blastos
Enfermedad Mínima Residual por CMF	Resultado de enfermedad mínima residual del centro tratante de cada paciente.	Cualitativa dicotómica	Positiva → Más de 0,01% de blastos en médula ósea. Negativa → Menos de 0,01% de blastos en médula ósea.
Remisión completa definida por morfología	Remisión completa o no, según reporte del mielograma.	Cualitativa dicotómica	Médula en remisión → Menos de 5% de blastos en Médula ósea. Médula con presencia de enfermedad → Más del

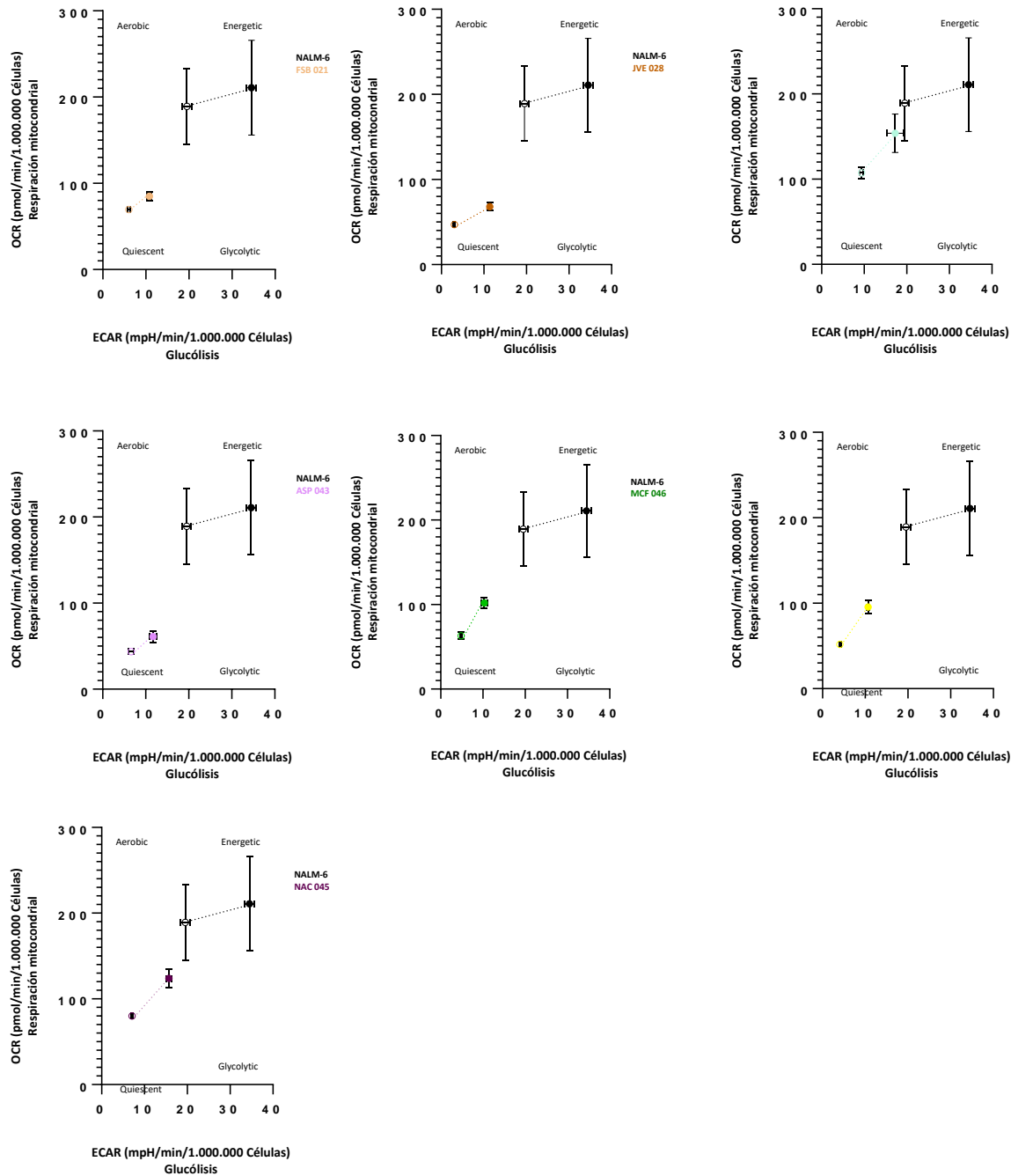
Variable	Definición operativa	Naturaleza	Nivel operativo
			5% de blastos en Médula ósea
Enfermedad extramedular en SNC	Blastos en algún órgano fuera de la Médula ósea, en este caso en el Sistema Nervioso Central.	Cualitativa dicotómica	Presencia o ausencia
<u>Características moleculares</u>			
Cariotipo	Conjunto de características en los cromosomas de una célula, de un individuo o de una especie.	Cualitativa politómica	<ul style="list-style-type: none"> - Normal - Hiperdiploide - Cariotipo complejo con menos de 3 anormalidades - Cariotipo complejo con más de 3 anormalidades.
Citogenética	Estudio genético de los cromosomas y las enfermedades relacionadas causadas por un número o una estructura anormal de los mismos.	Cualitativa politómica	<ul style="list-style-type: none"> - Negativo - t (4;11) - t (9;22) p210 - t (9;22) p190

Variable	Definición operativa	Naturaleza	Nivel operativo
			- t (12;21)
<i>Niveles de expresión de los genes ID1, ID3 e IGJ</i>	Amplificación de los genes <i>ID1</i> , <i>ID3</i> e <i>IGJ</i> por medio de PCR en tiempo real.	Cuantitativa Continua	Se usará el método $2^{-\Delta\Delta CT}$

Apéndice F. Fenotipo energético de los pacientes con potencial metabólico OCR vs el fenotipo energético de la línea celular NALM-6.

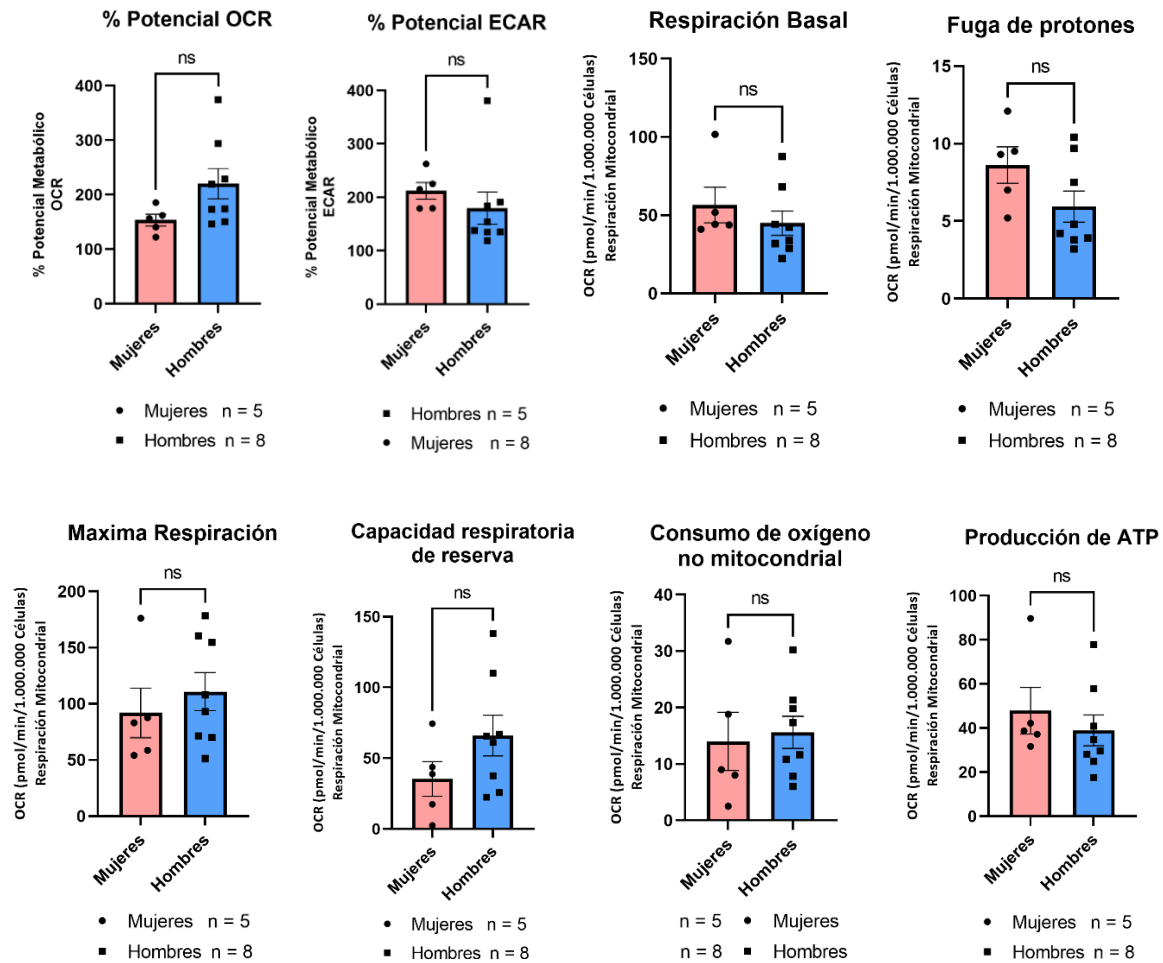


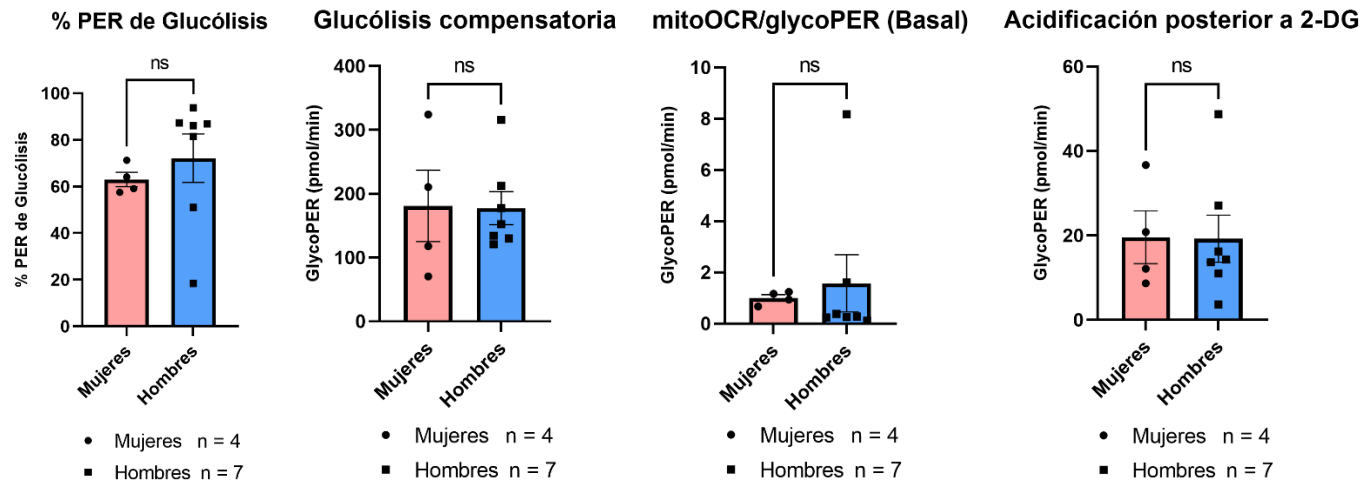
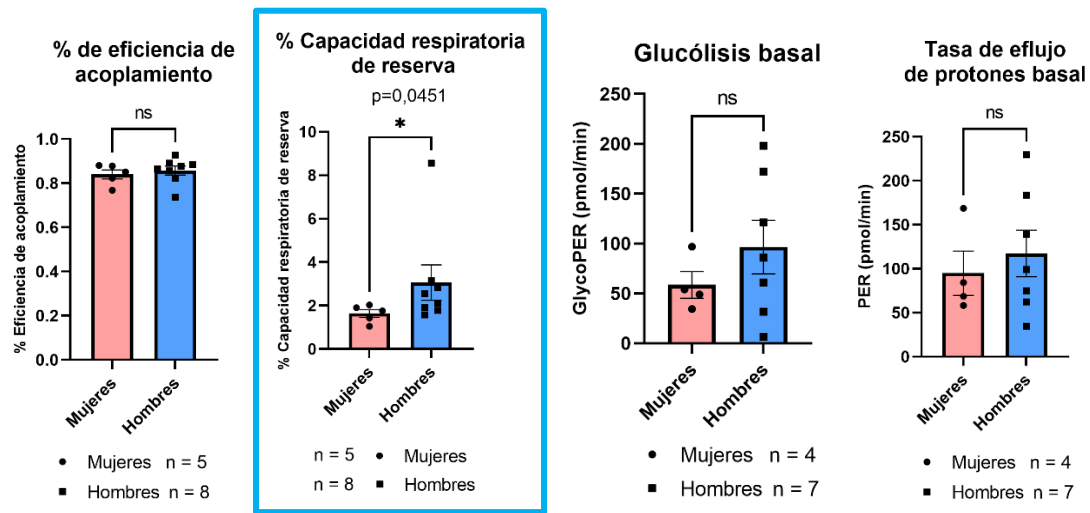
Apéndice G. Fenotipo energético de los pacientes con potencial metabólico ECAR vs el fenotipo energético de la línea celular NALM-6.



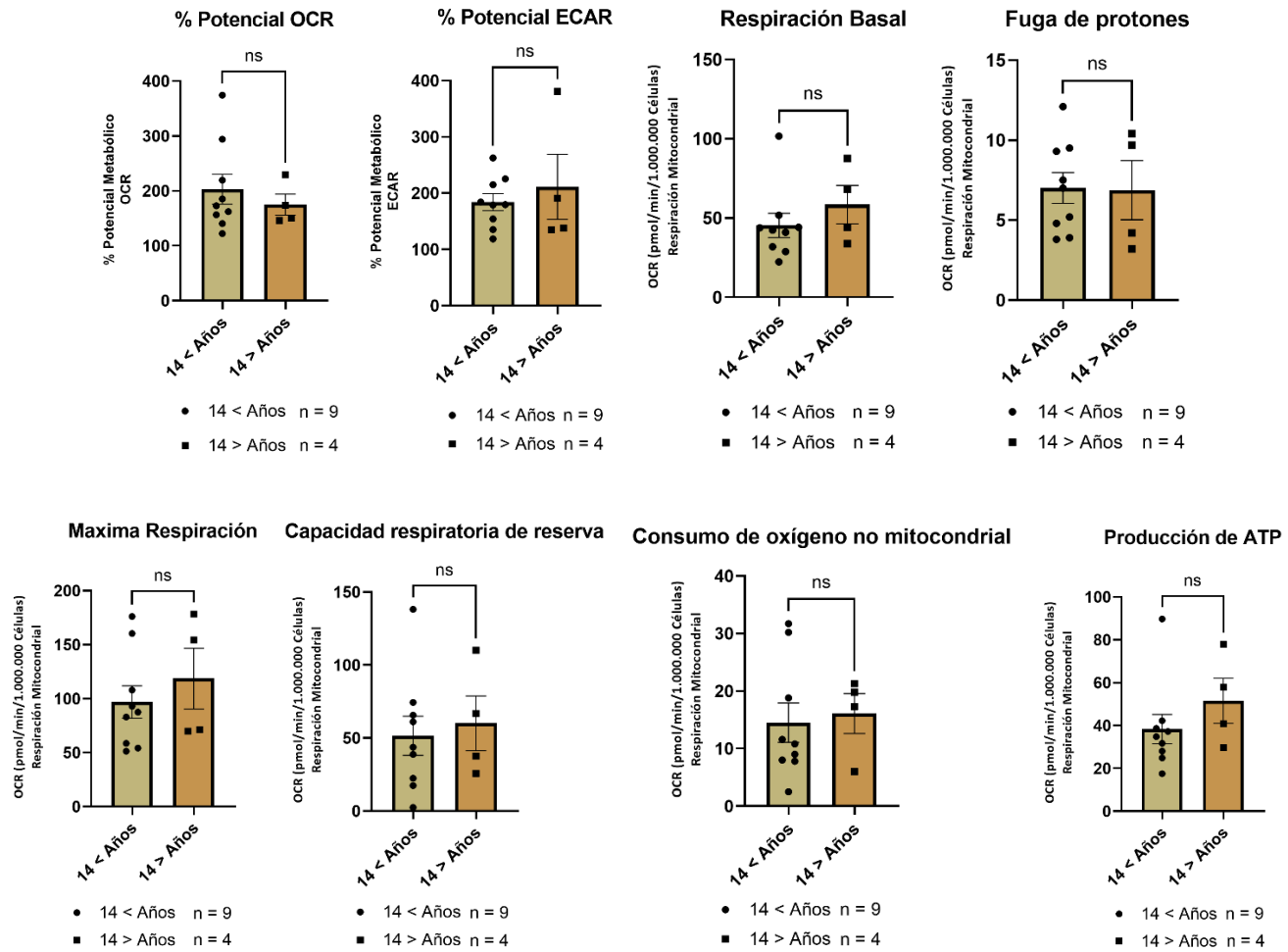
Apéndice H. Variables clínicas en relación con las variables metabólicas.

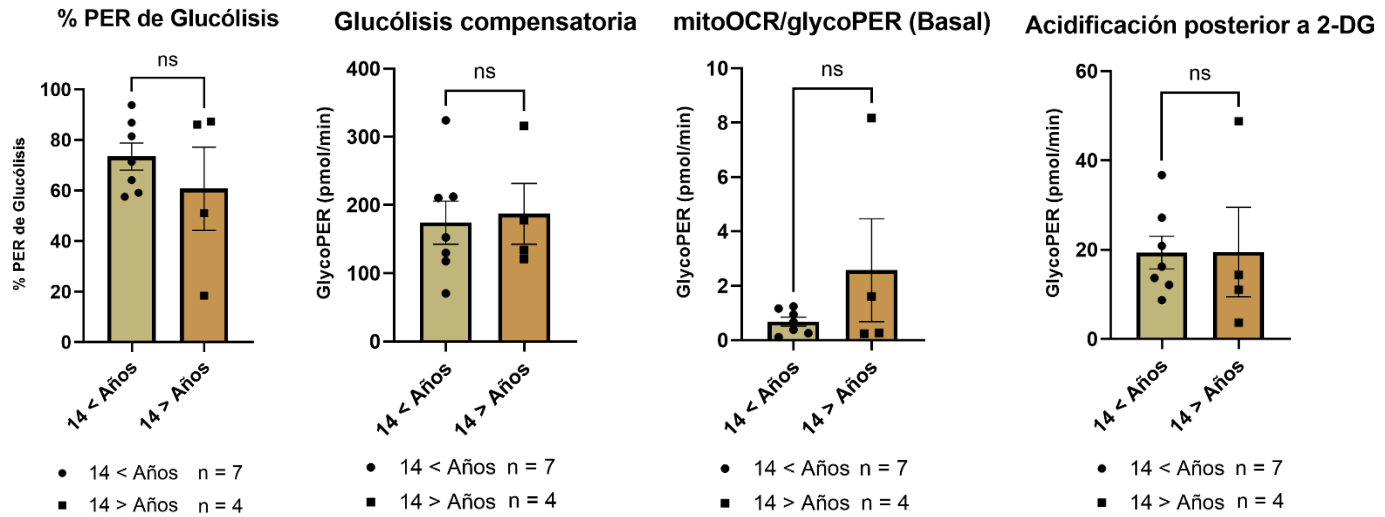
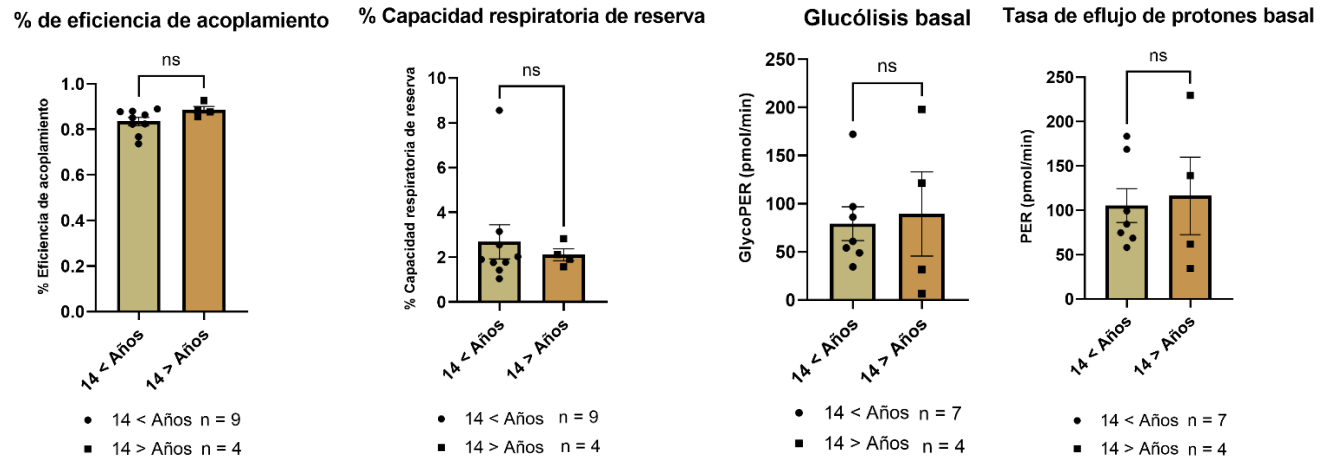
A. Sexo versus variables metabólicas.



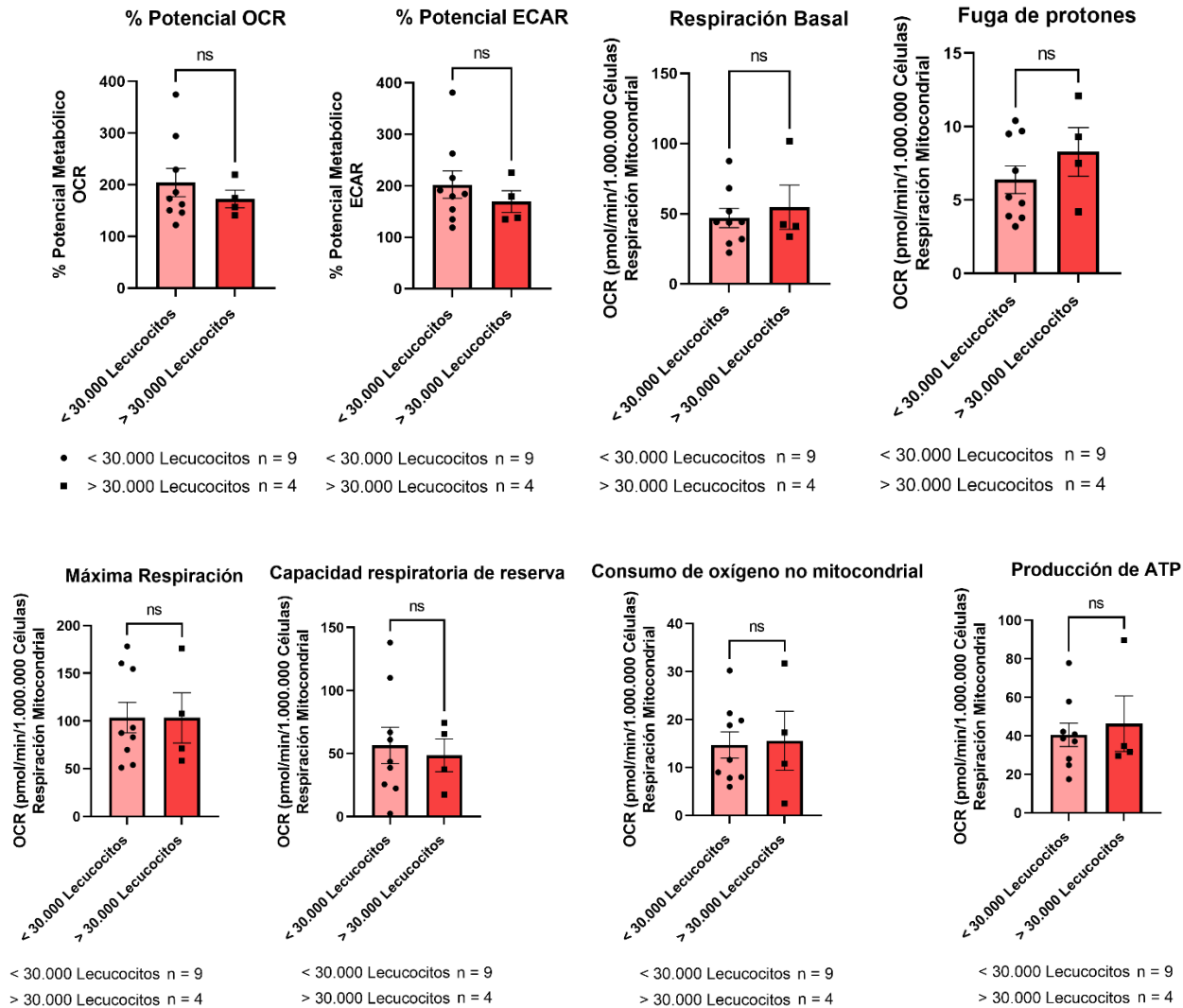


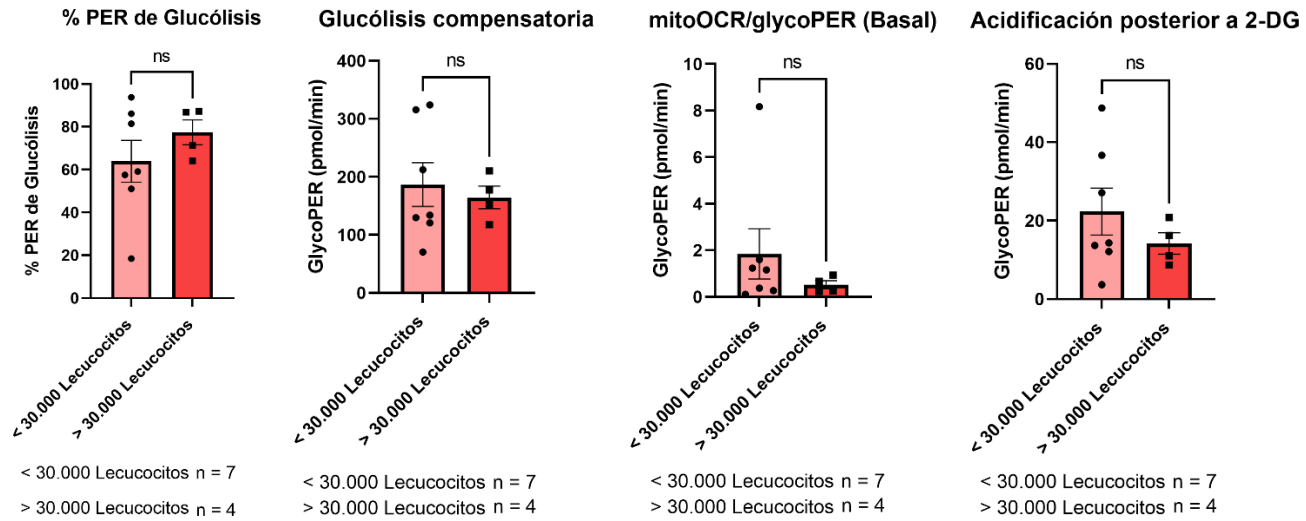
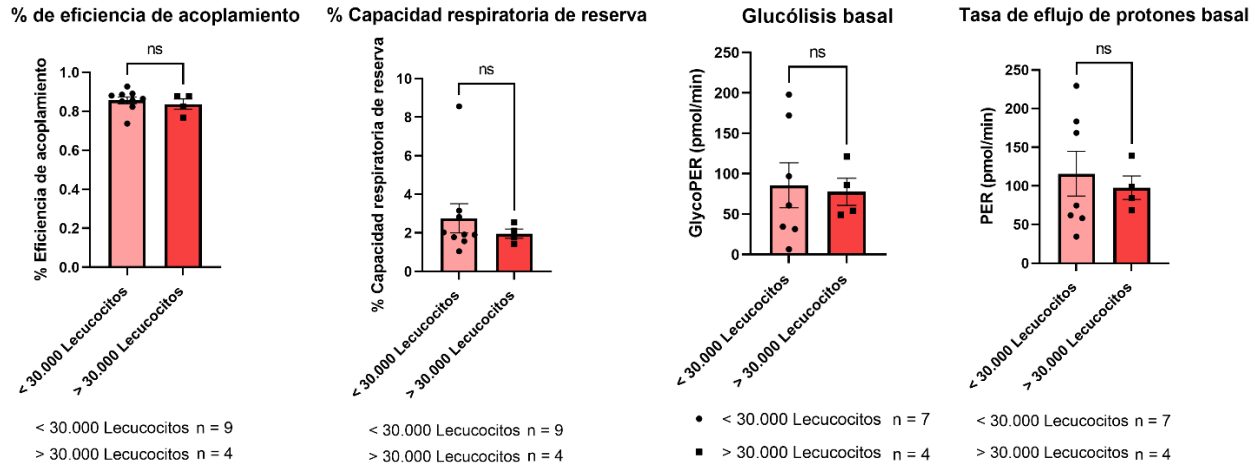
B. Edad versus variables metabólicas.



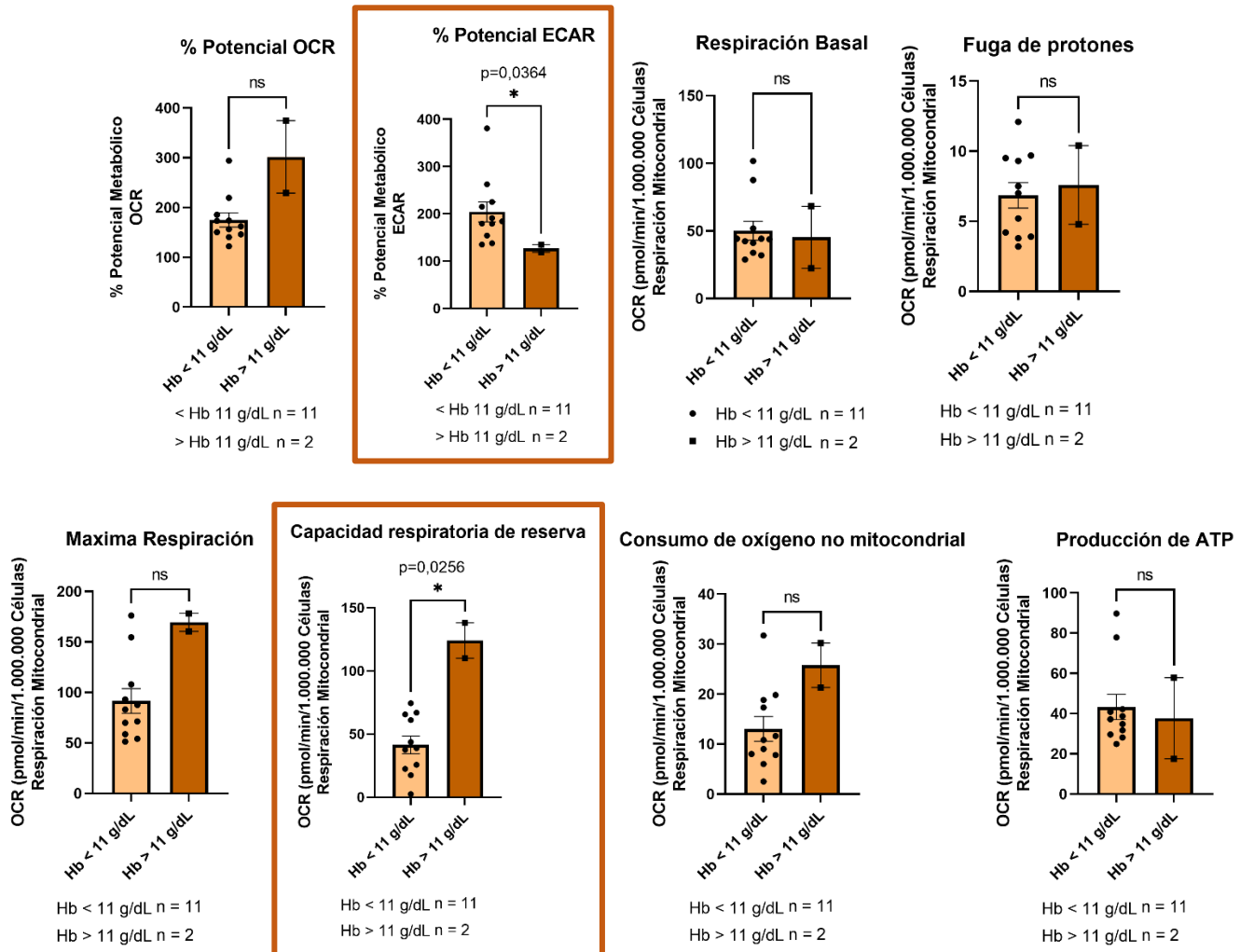


C. Número de leucocitos versus variables metabólicas.

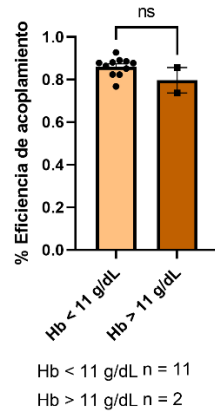




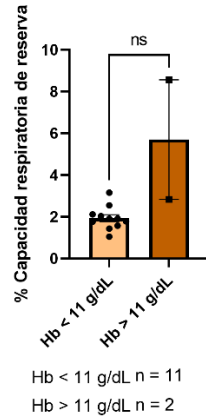
D. Niveles de hemoglobina versus variables metabólicas.



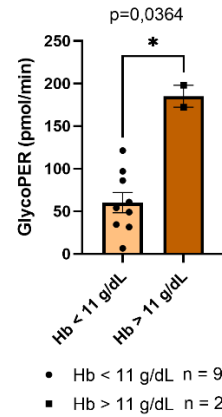
% de eficiencia de acoplamiento



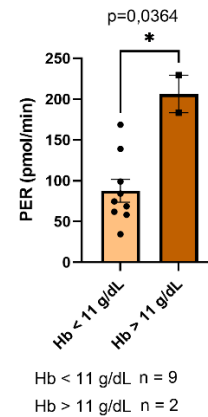
% Capacidad respiratoria de reserva



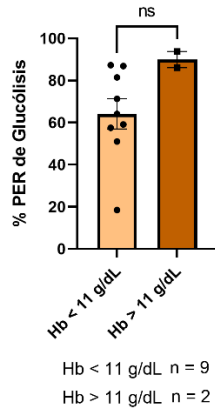
Glucólisis basal



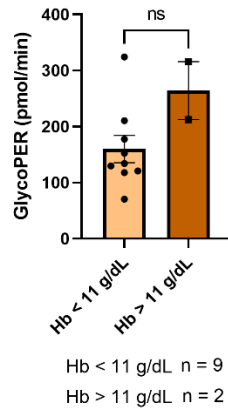
Tasa de flujo de protones basal



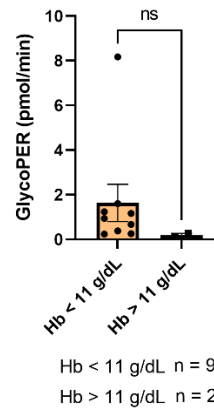
% PER de Glucólisis



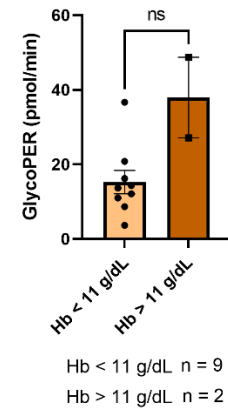
Glucólisis compensatoria



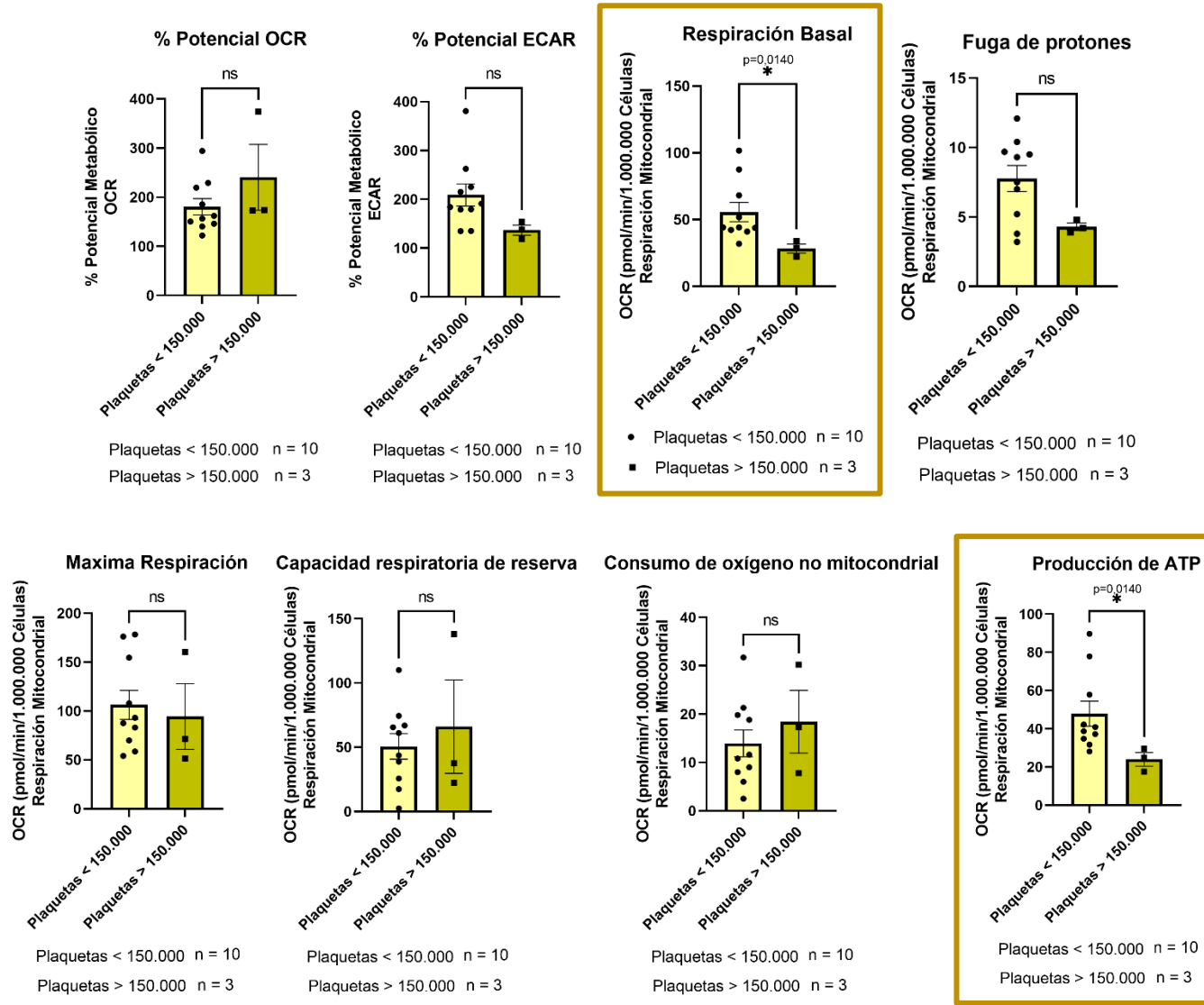
mitoOCR/glycoPER (Basal)

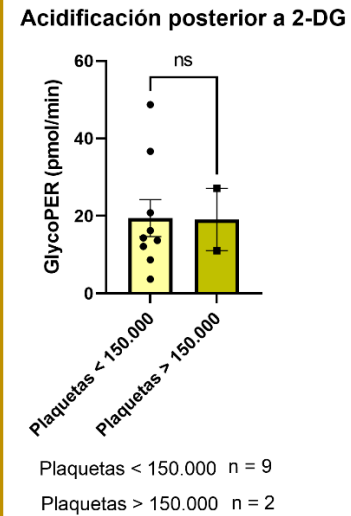
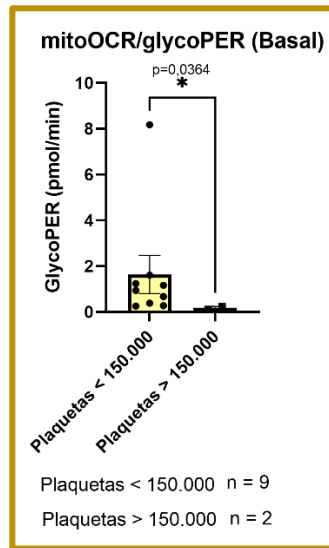
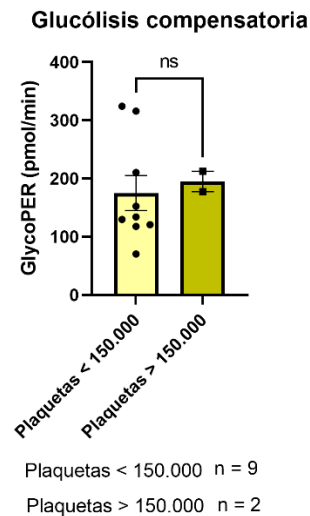
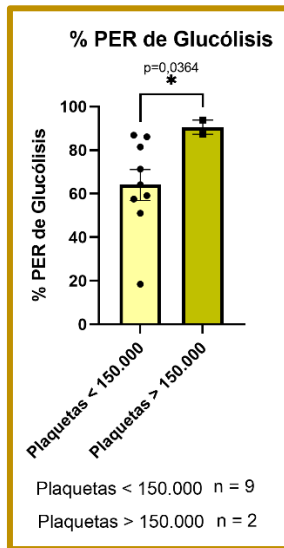
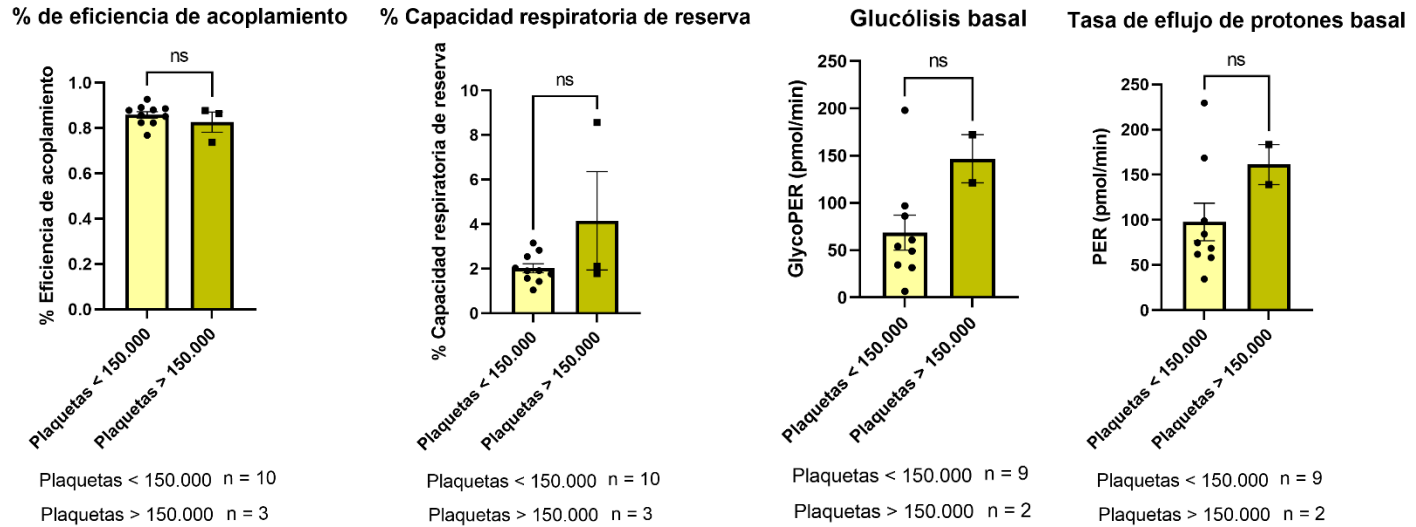


Acidificación posterior a 2-DG

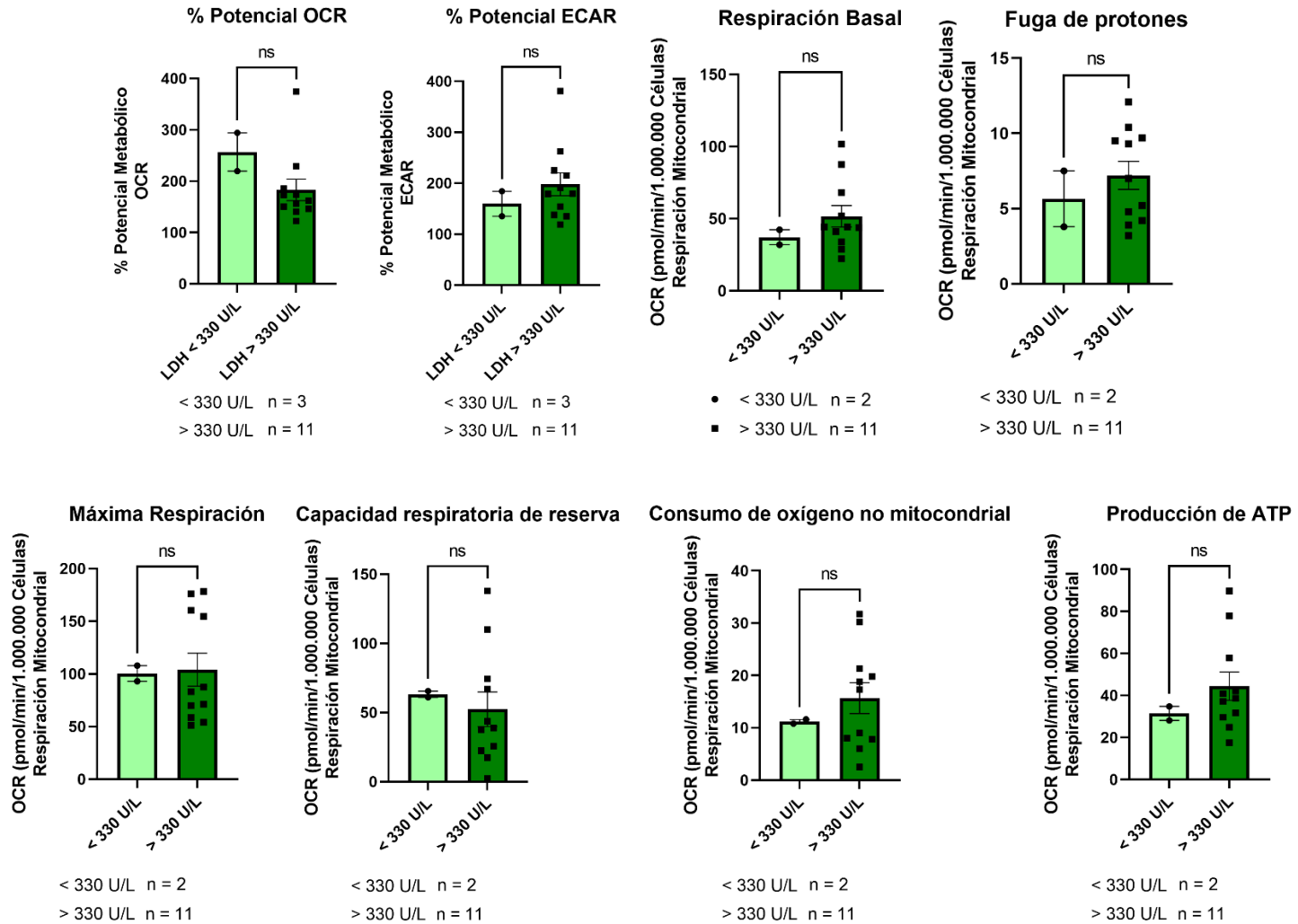


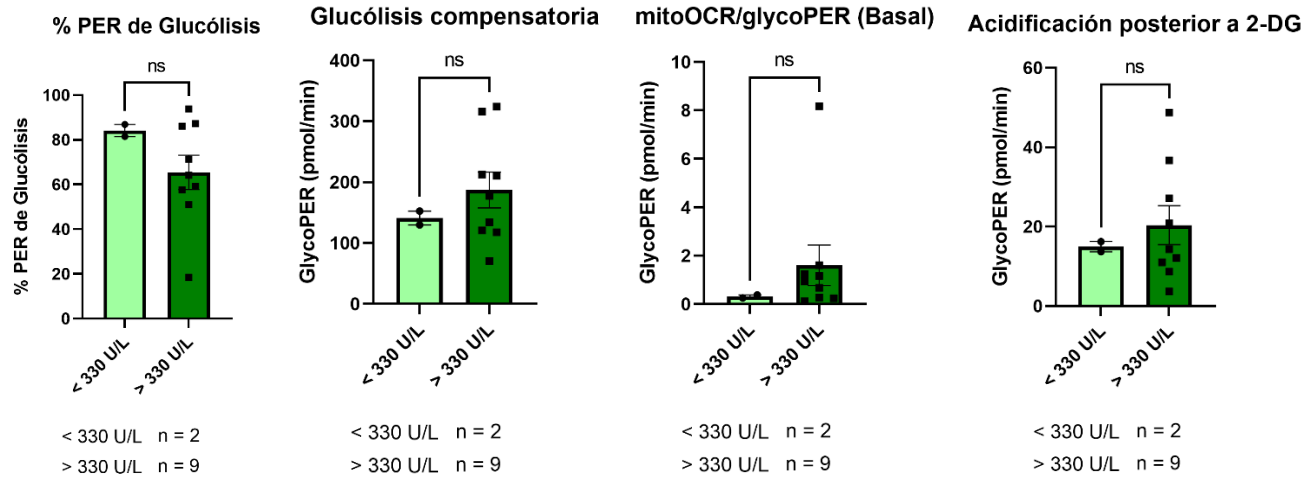
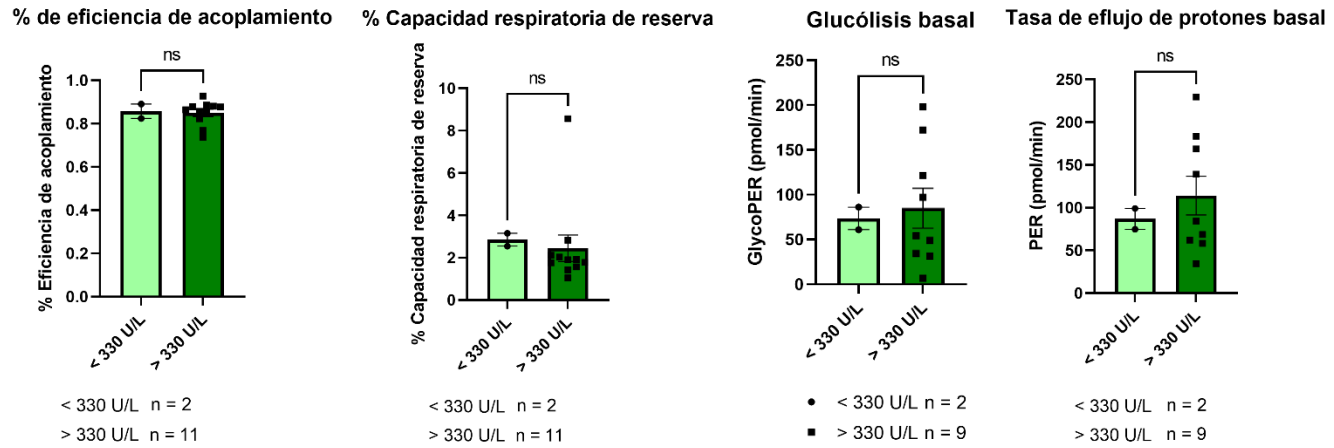
E. Número de plaquetas versus variables metabólicas.



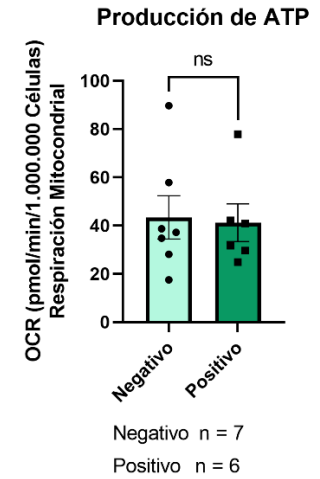
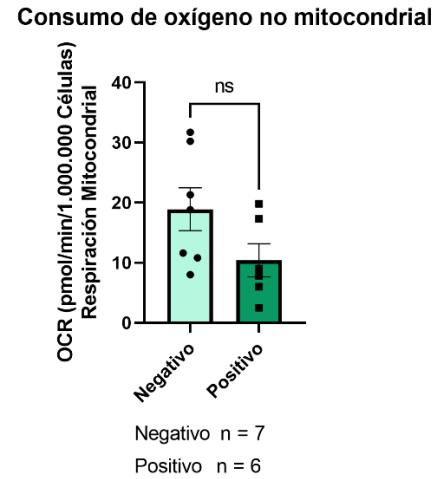
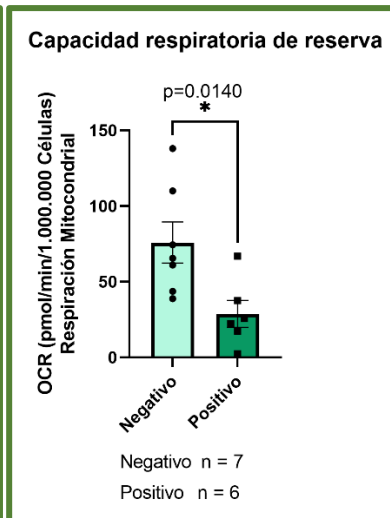
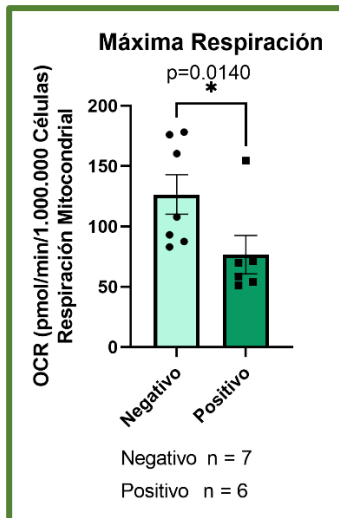
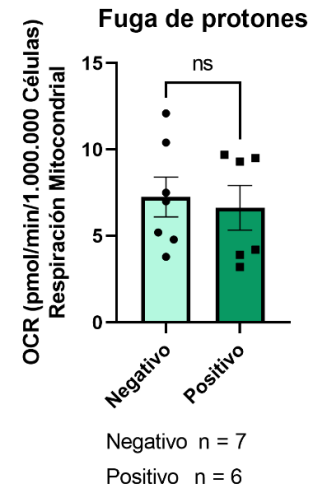
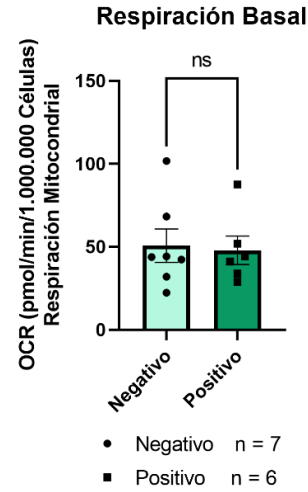
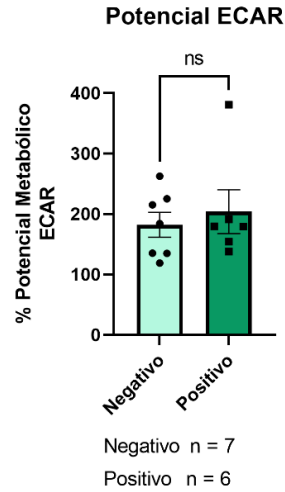
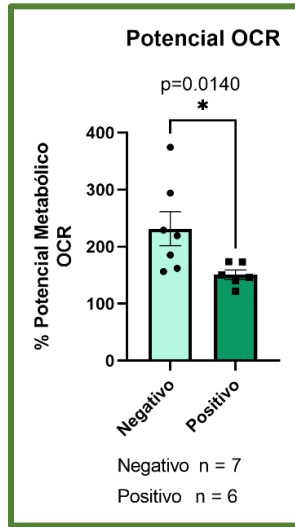


F. Lactato deshidrogenasa (LDH) versus variables metabólicas.

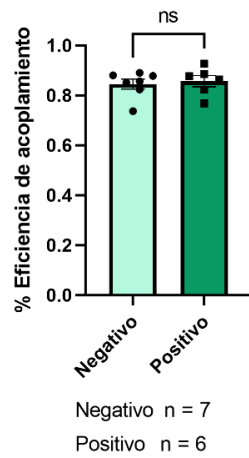




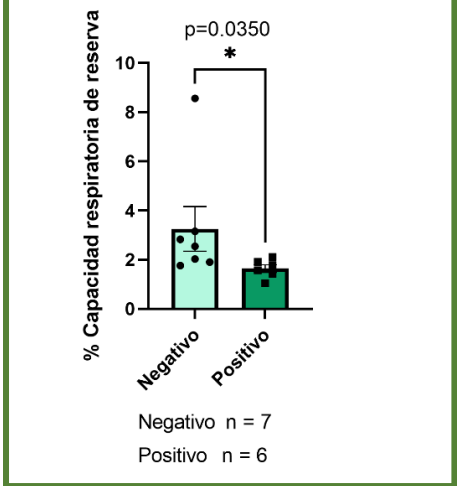
G. Enfermedad Mínima Residual (EMR) día 30 versus variables metabólicas.



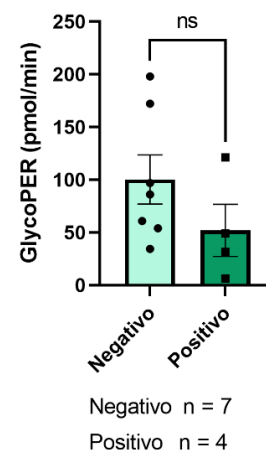
% de eficiencia de acoplamiento



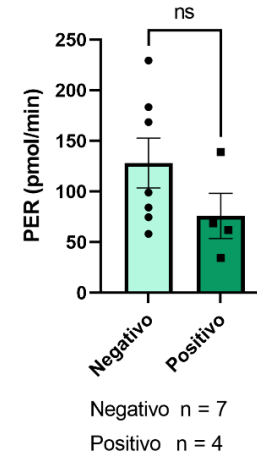
% Capacidad respiratoria de reserva



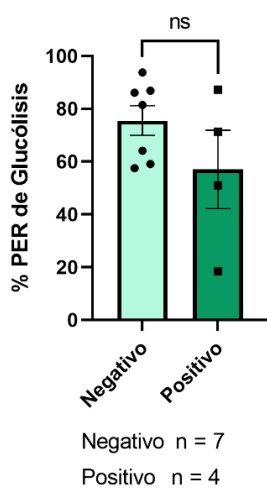
Glucólisis basal



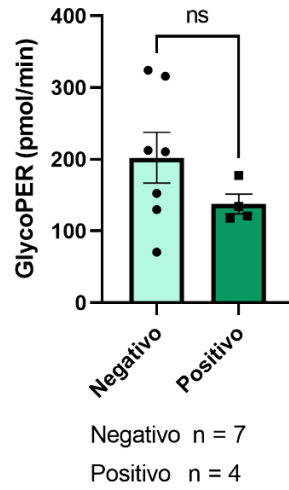
Tasa de eflujo de protones basal



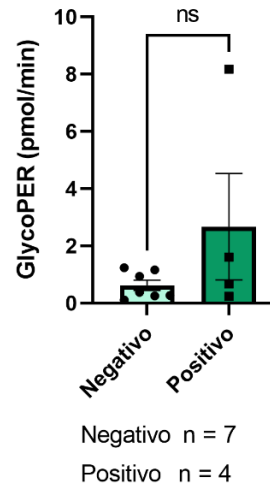
% PER de Glucólisis



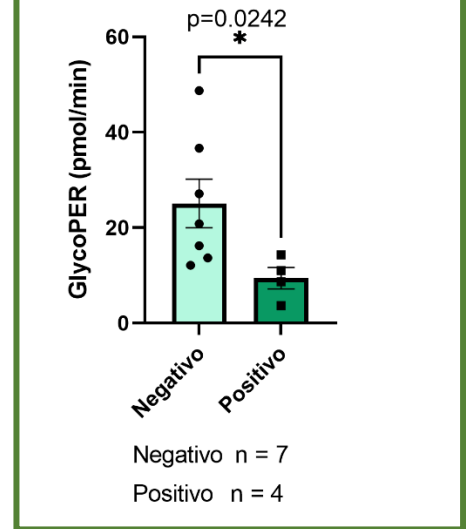
Glucólisis compensatoria



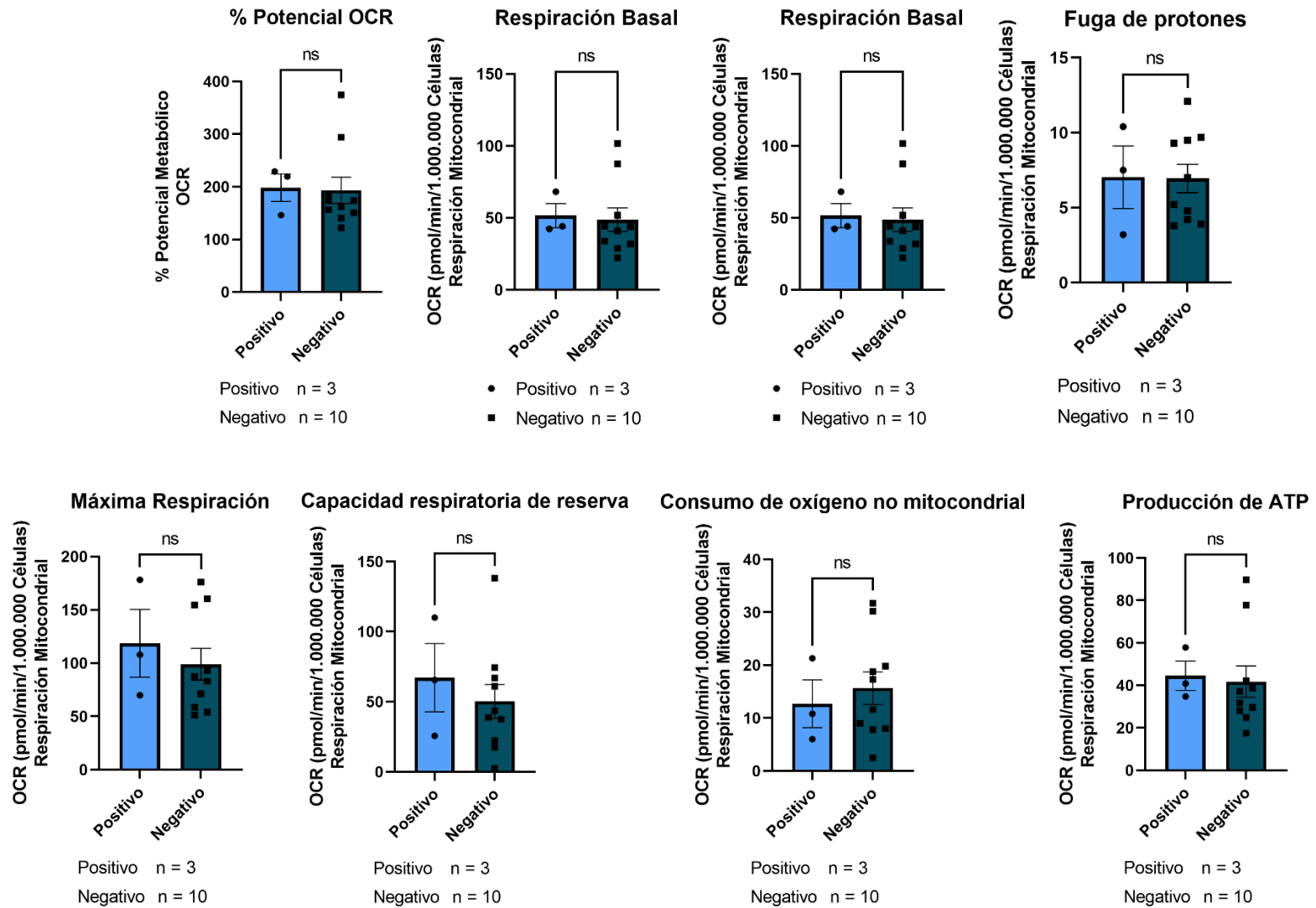
mitoOCR/glycoPER (Basal)

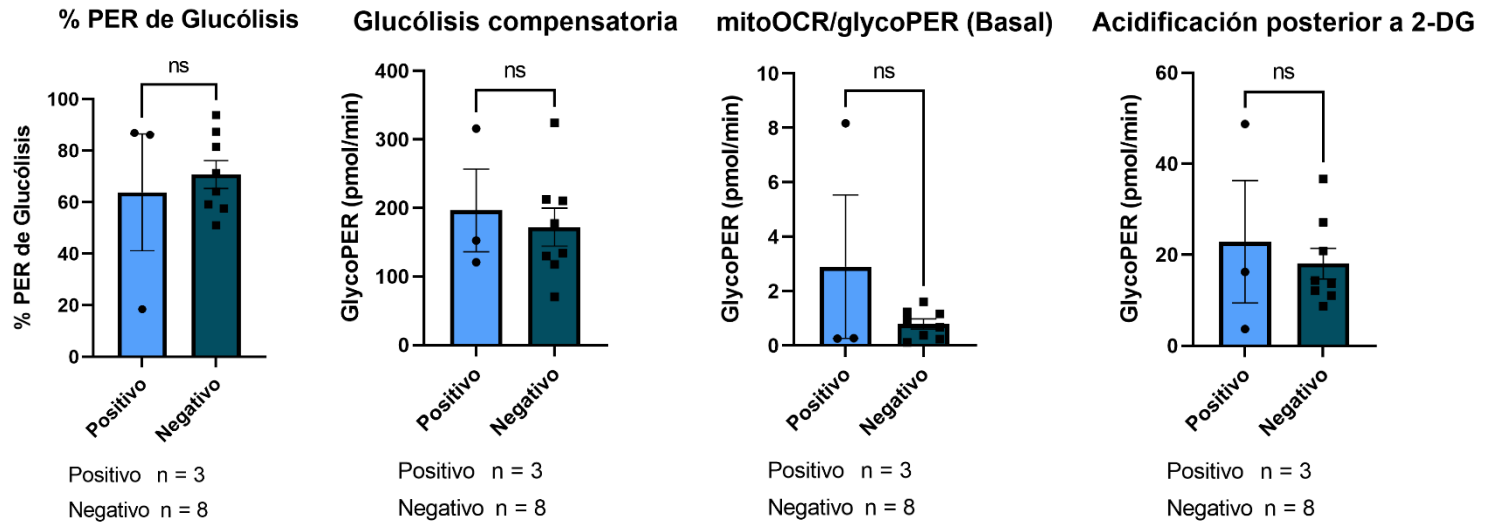
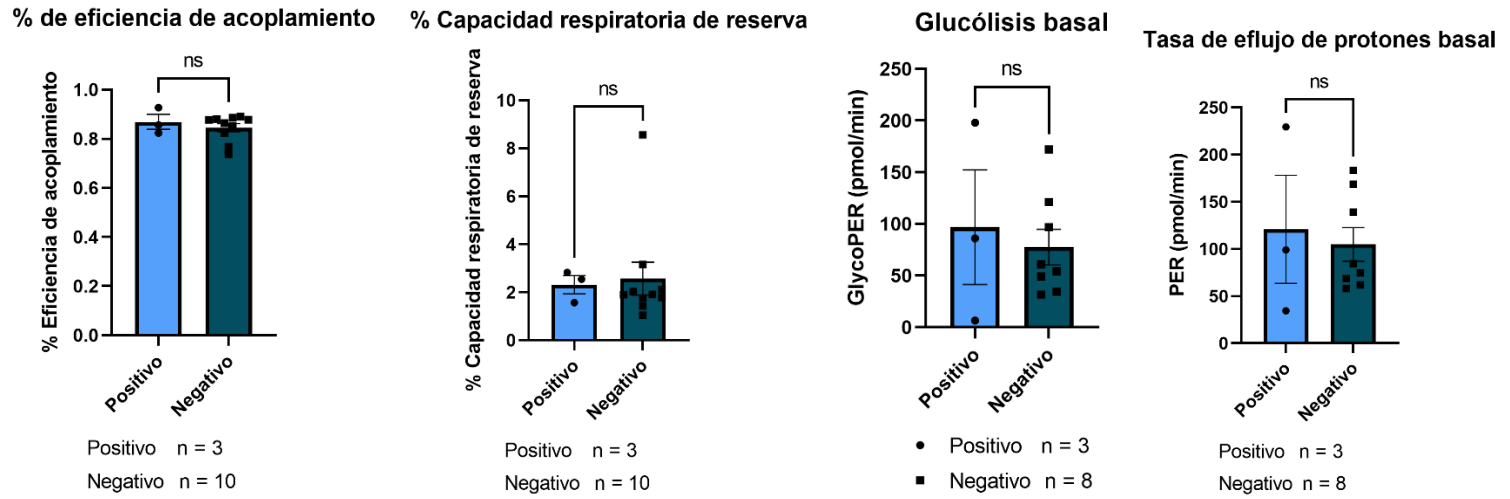


Acidificación posterior a 2-DG

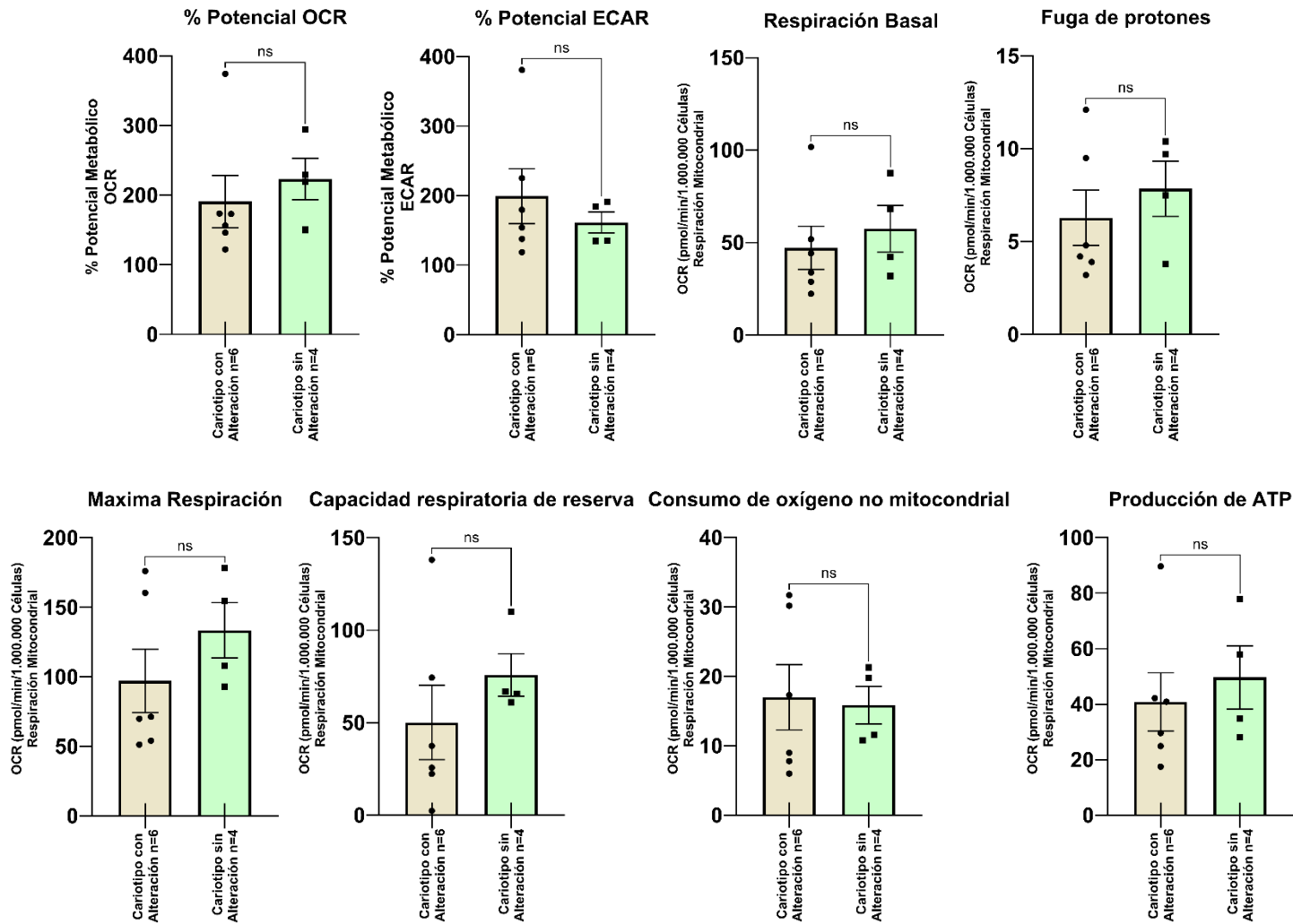


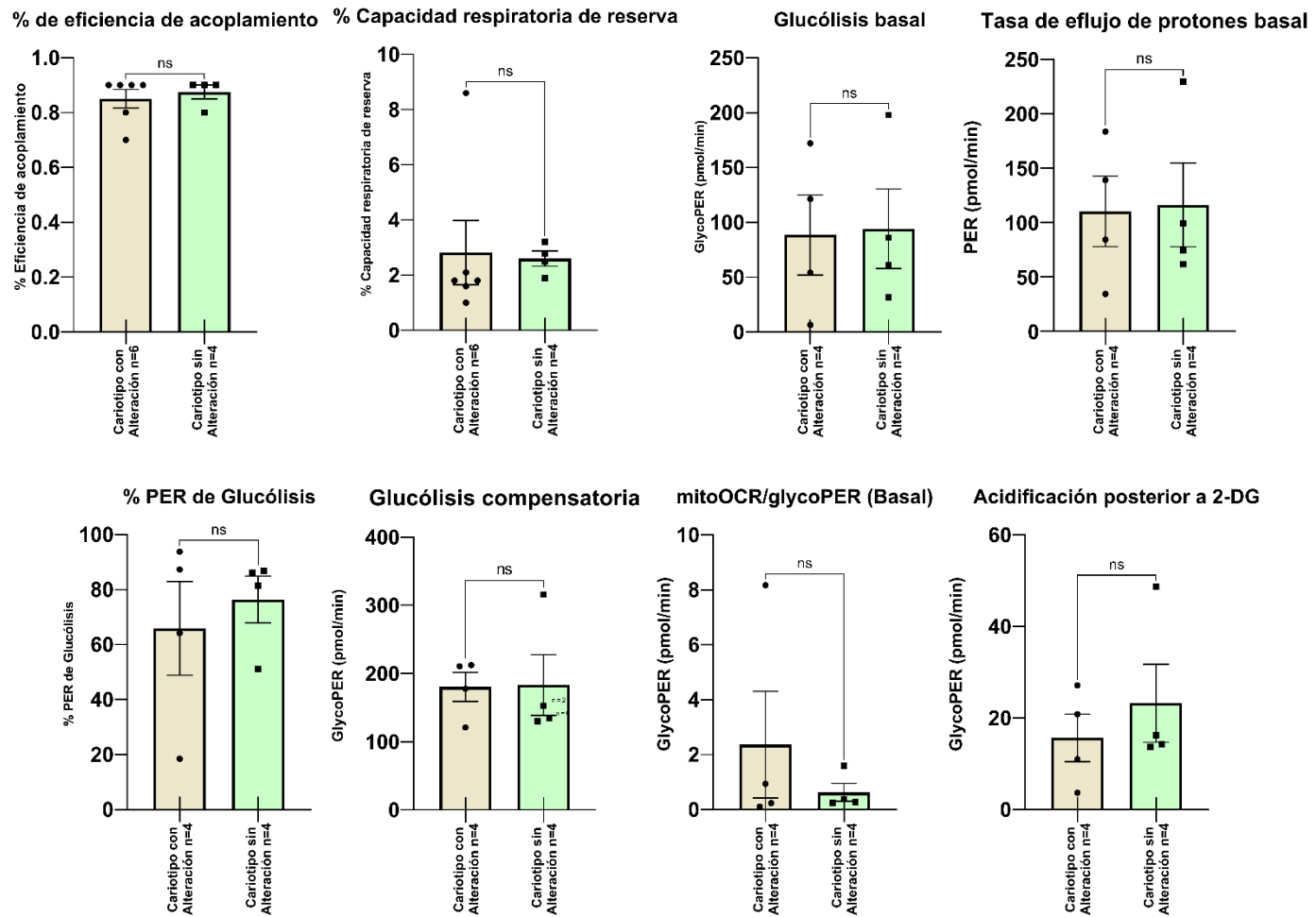
H. Infiltración del SNC versus variables metabólicas.



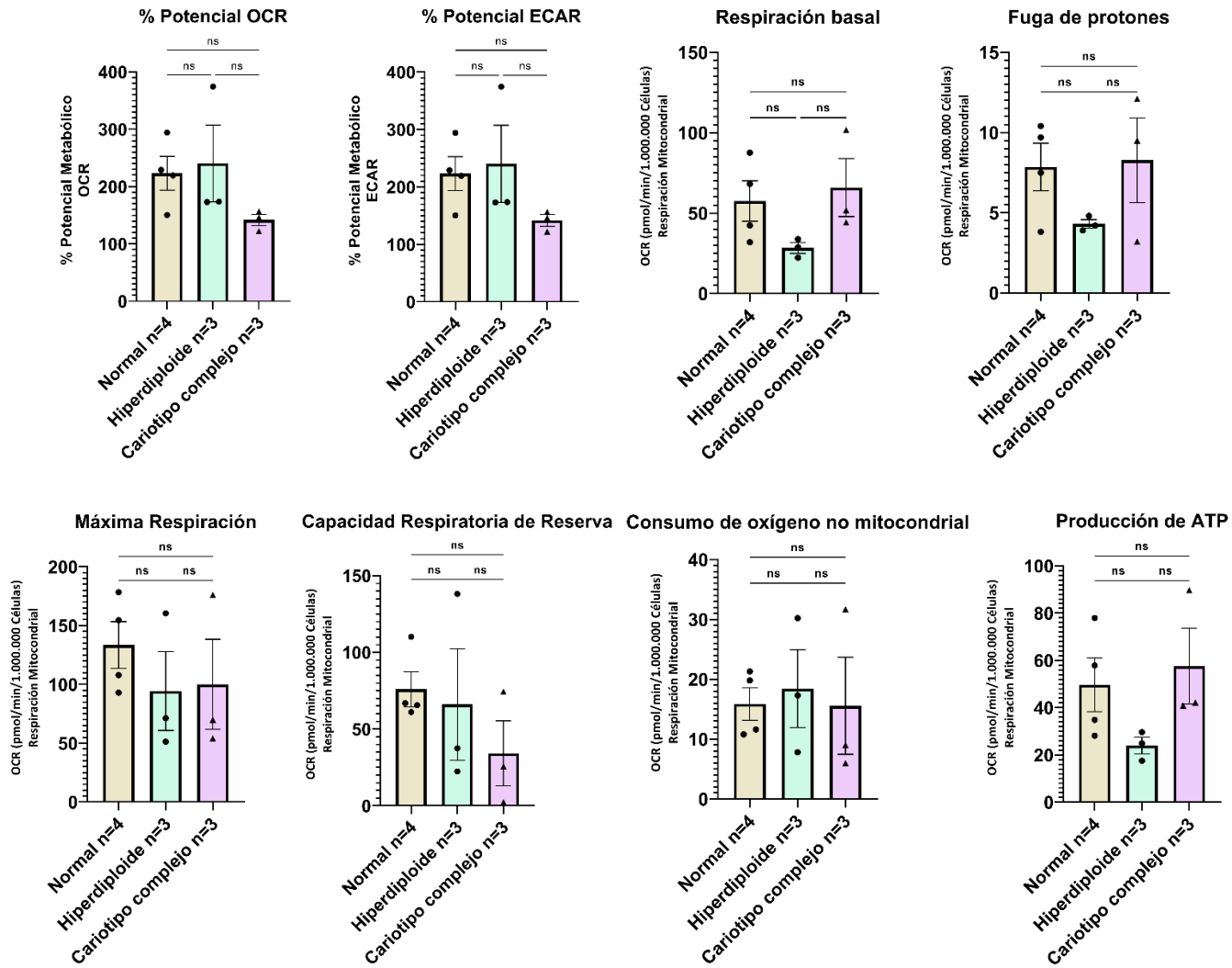


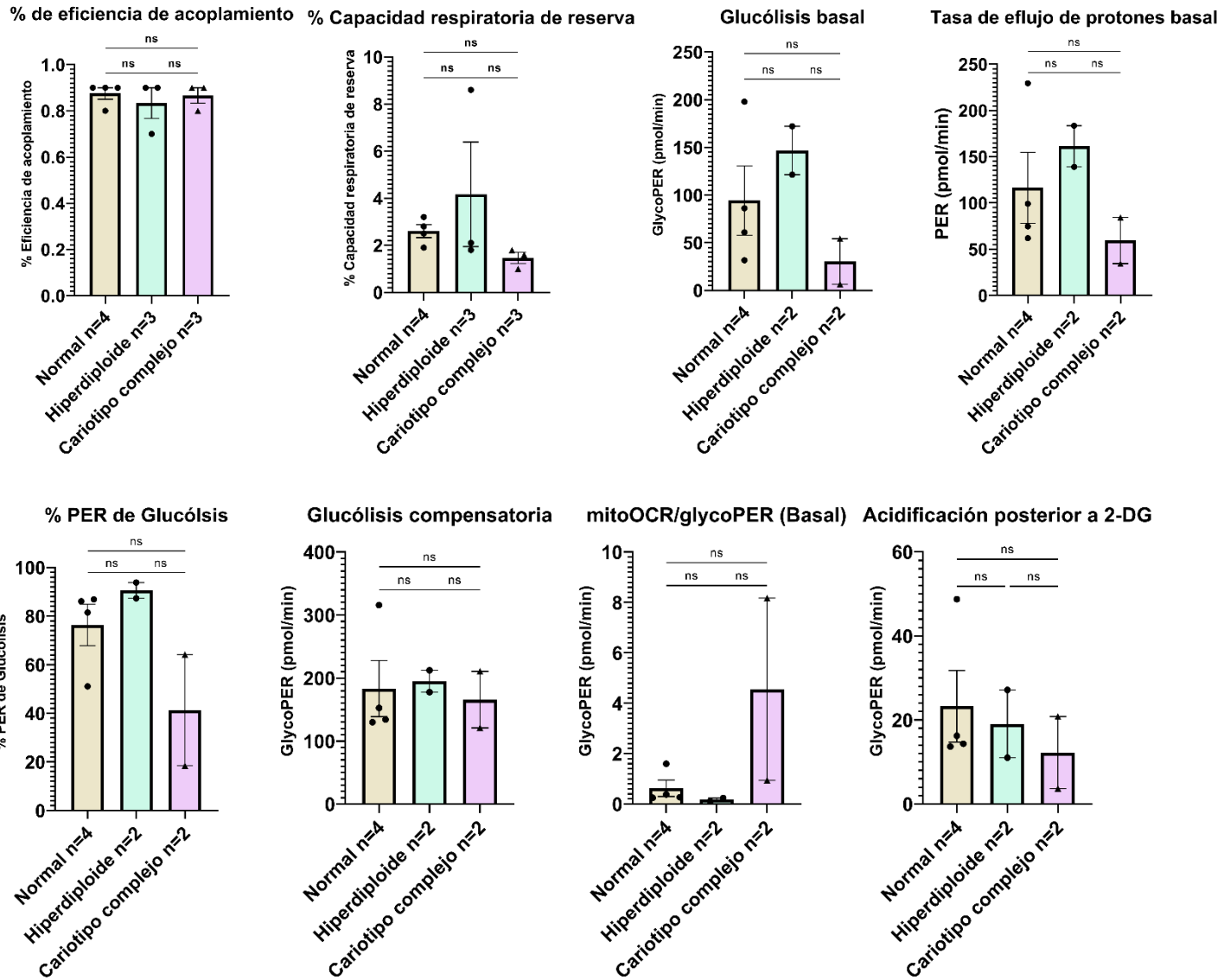
I. Alteraciones en el cariotipo versus variables metabólicas.

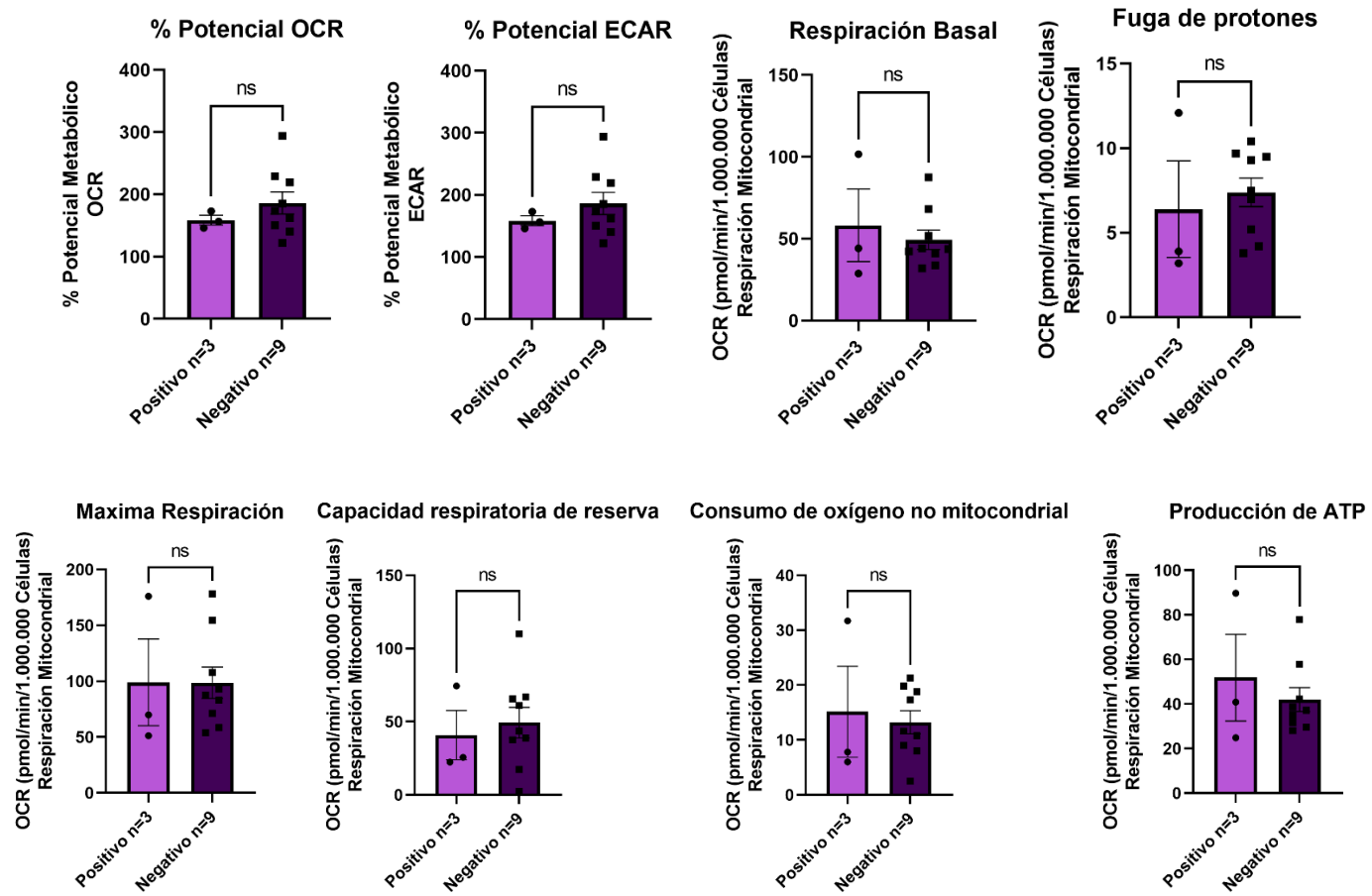


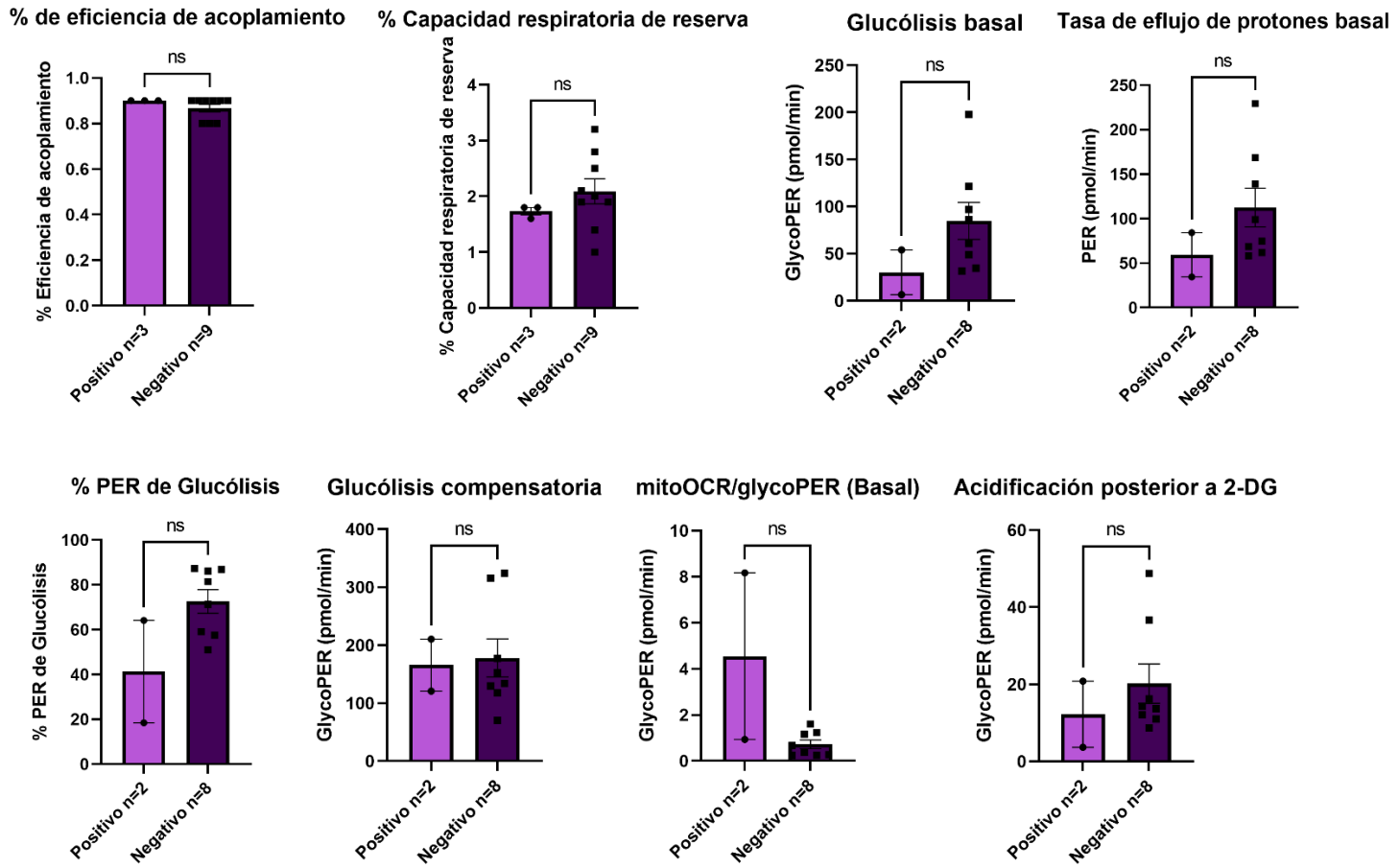


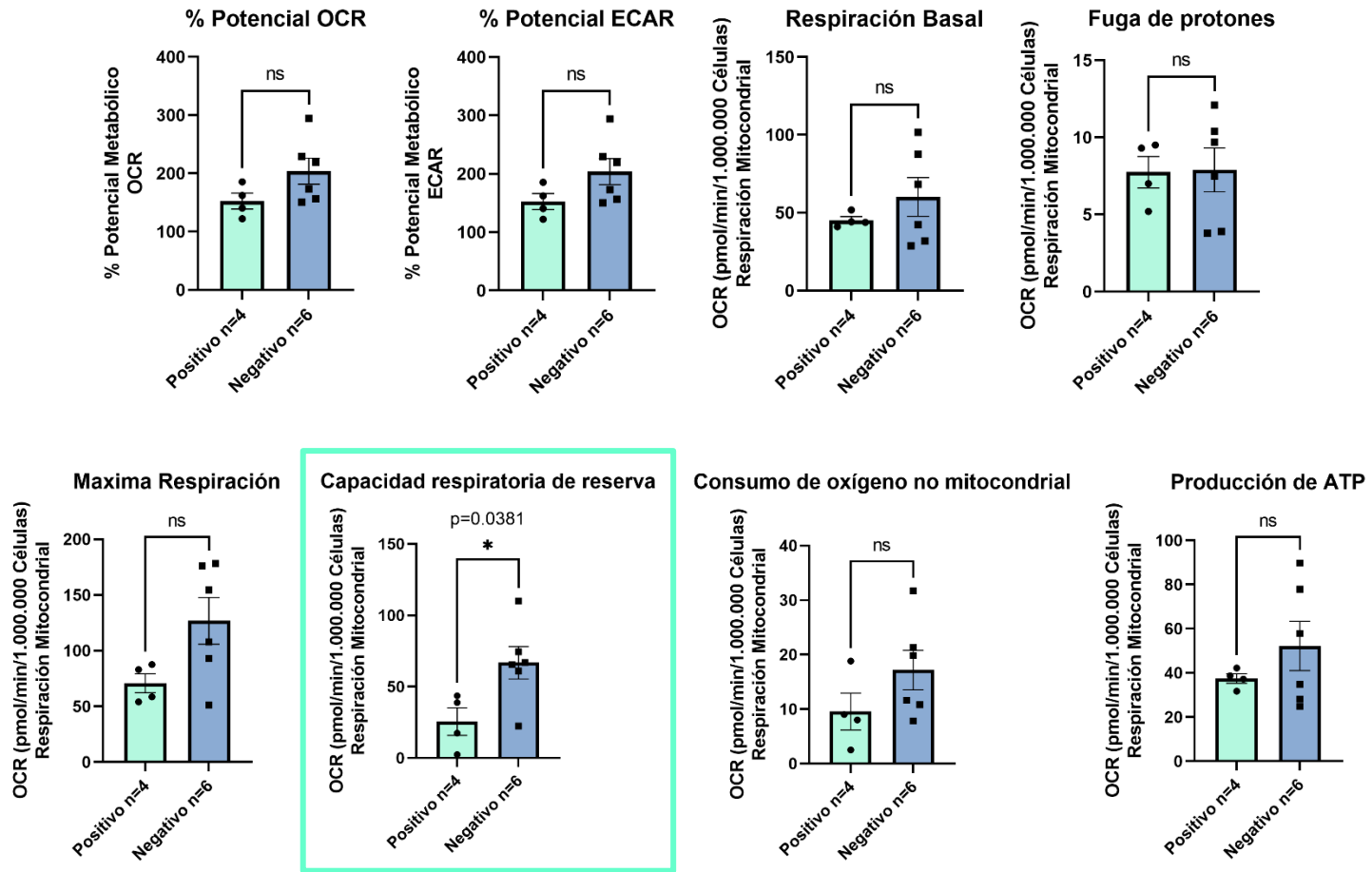
J. Tipo de cariotipo versus variables metabólicas.

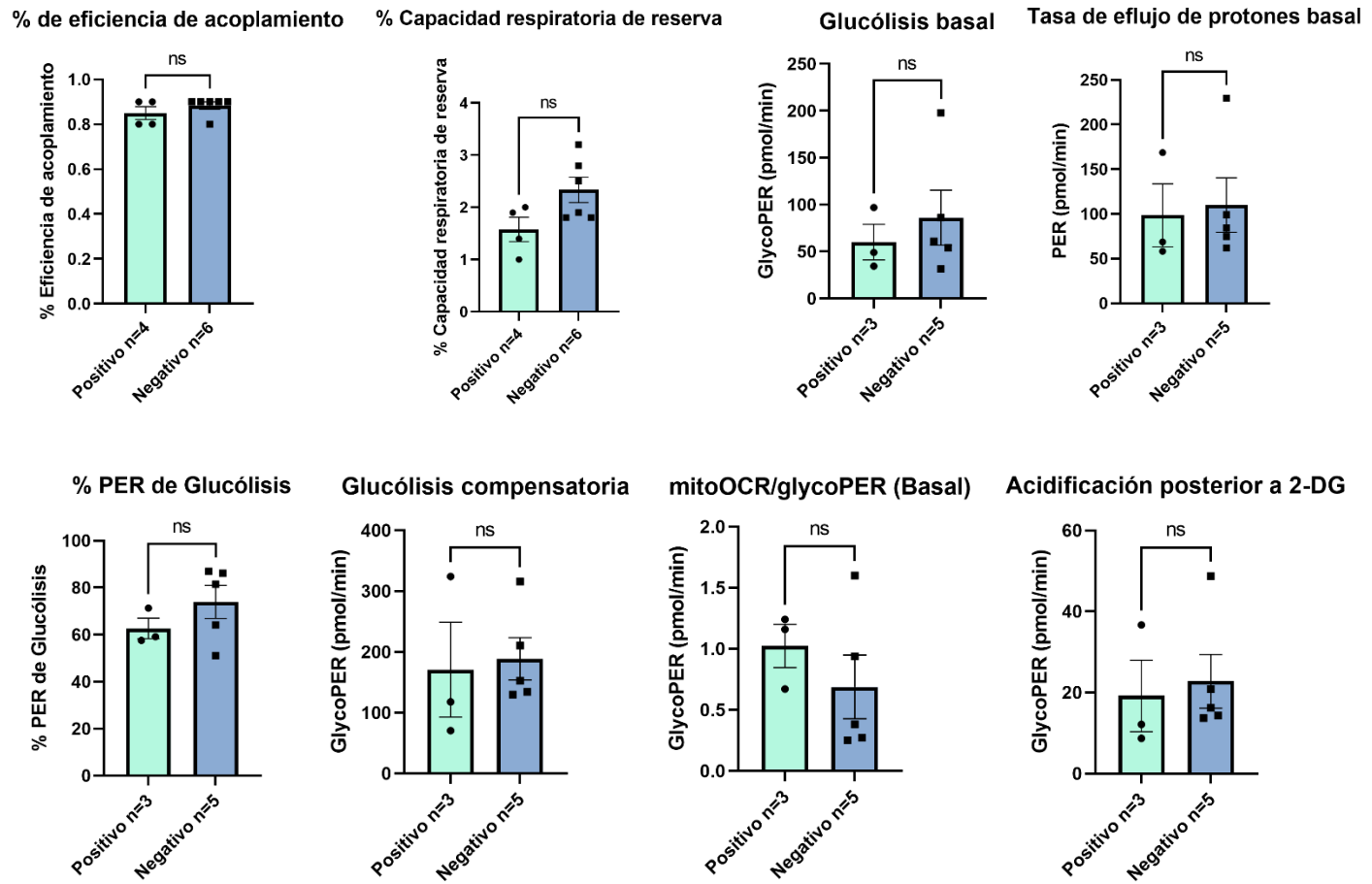




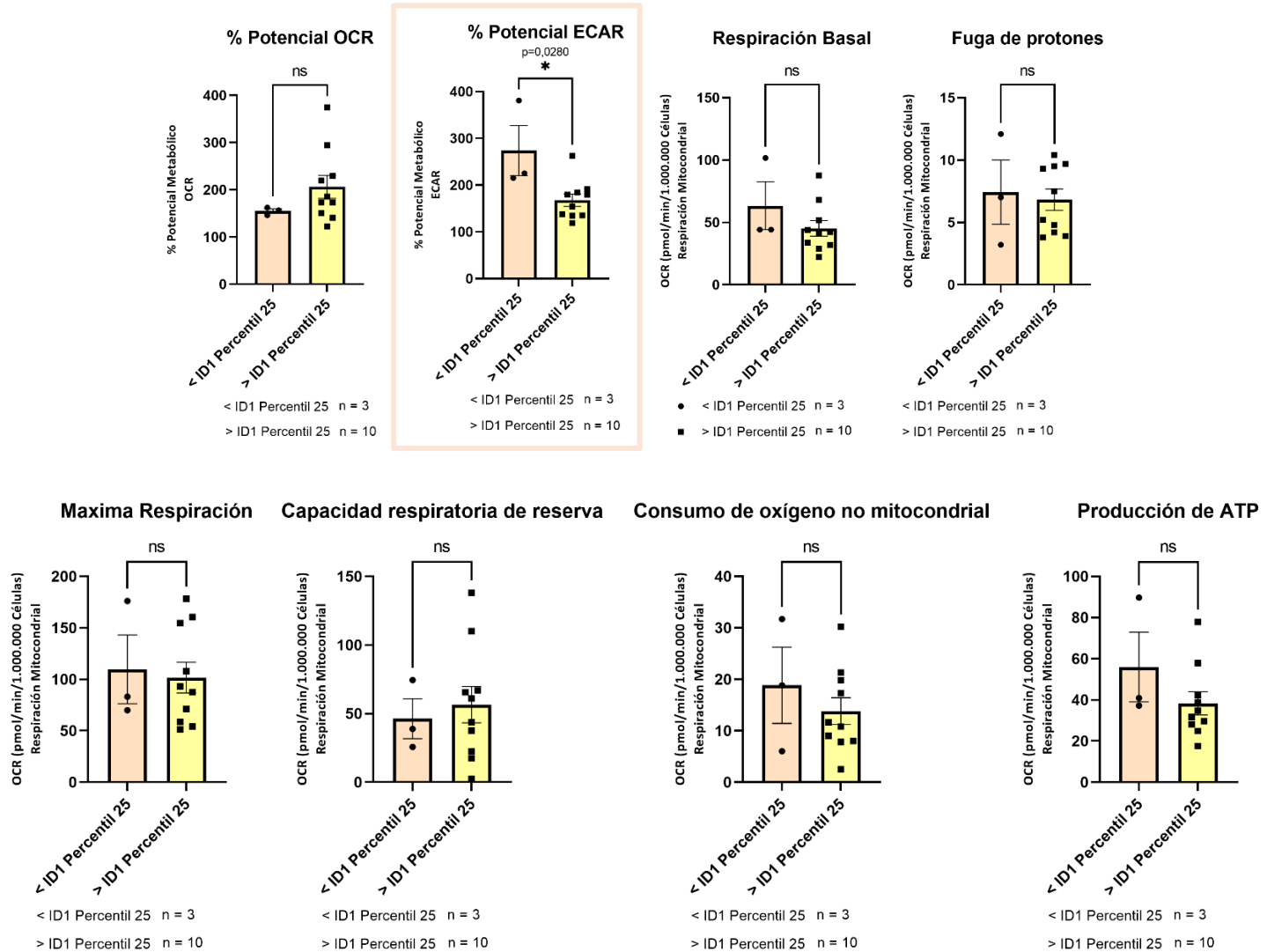
K. *BCR/ABL* versus variables metabólicas.

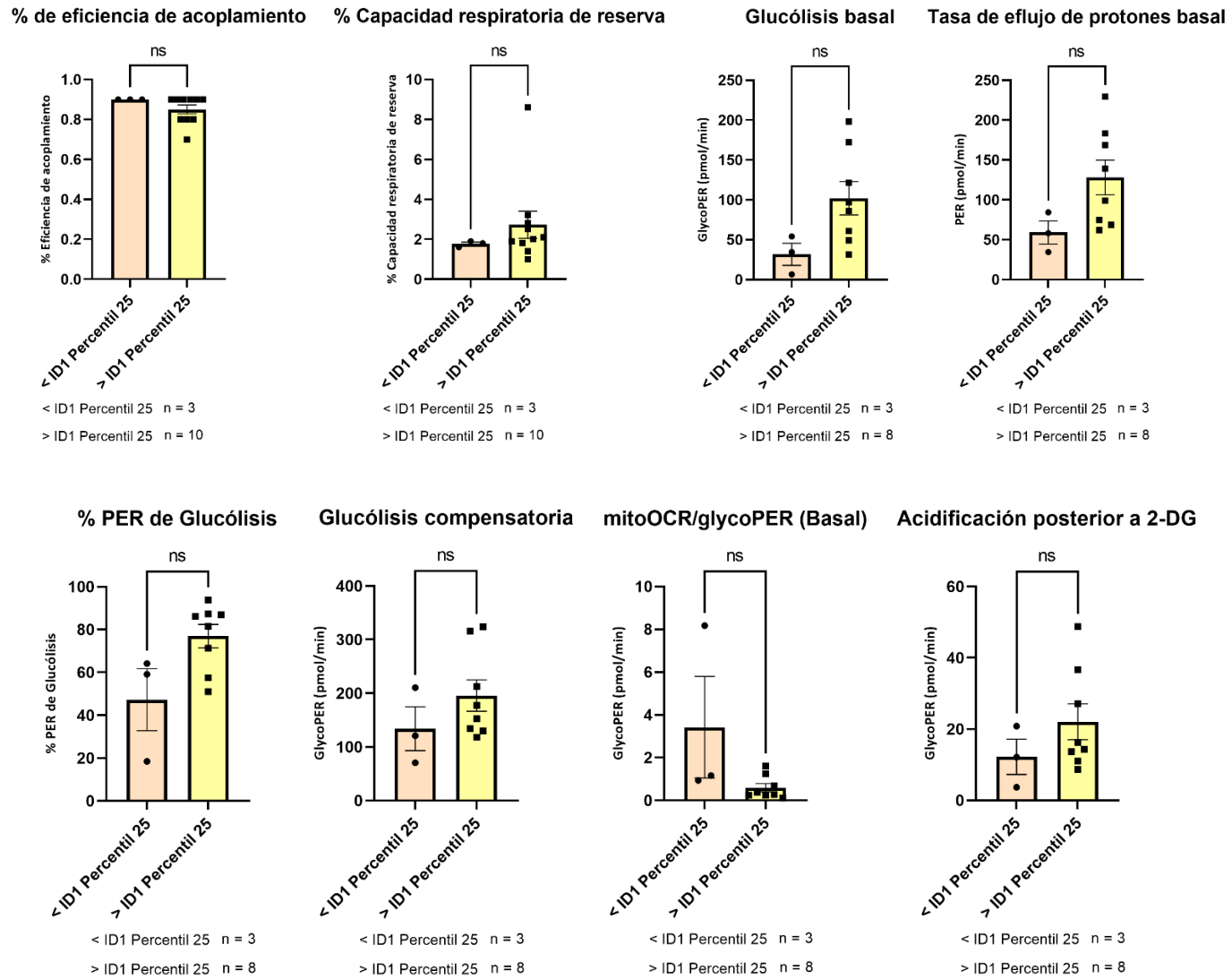


L. *ETV6 RUNX 1* versus variables metabólicas.

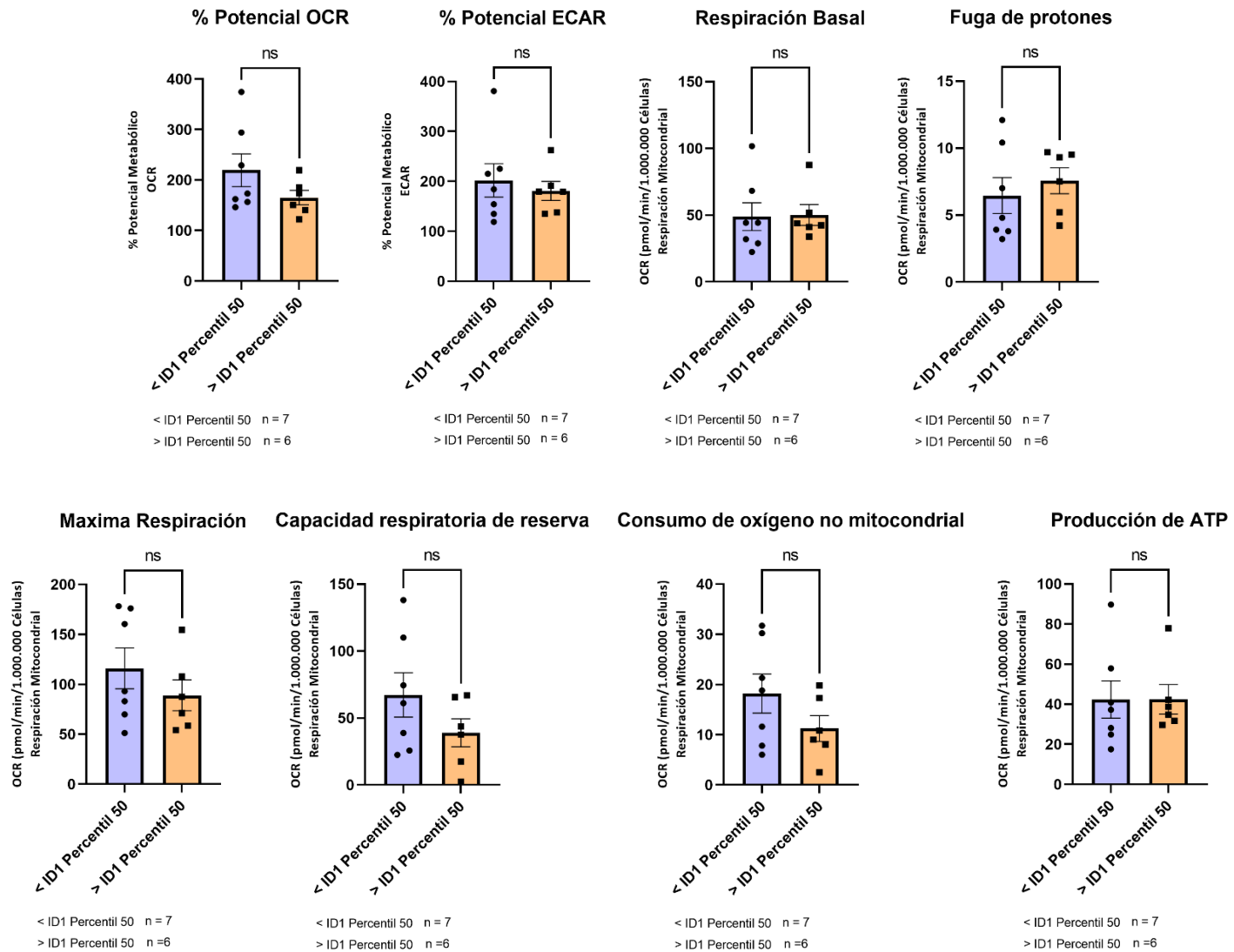


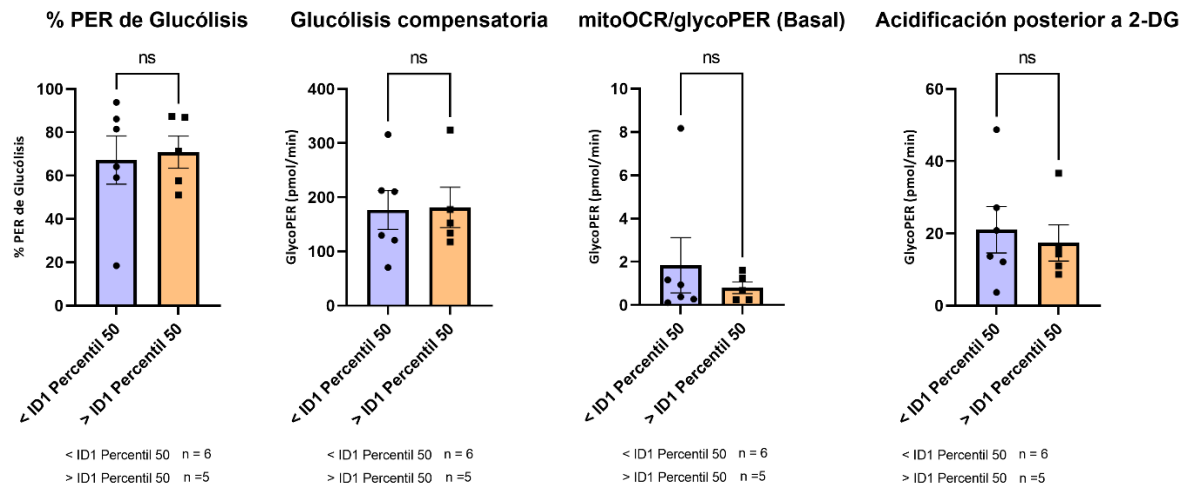
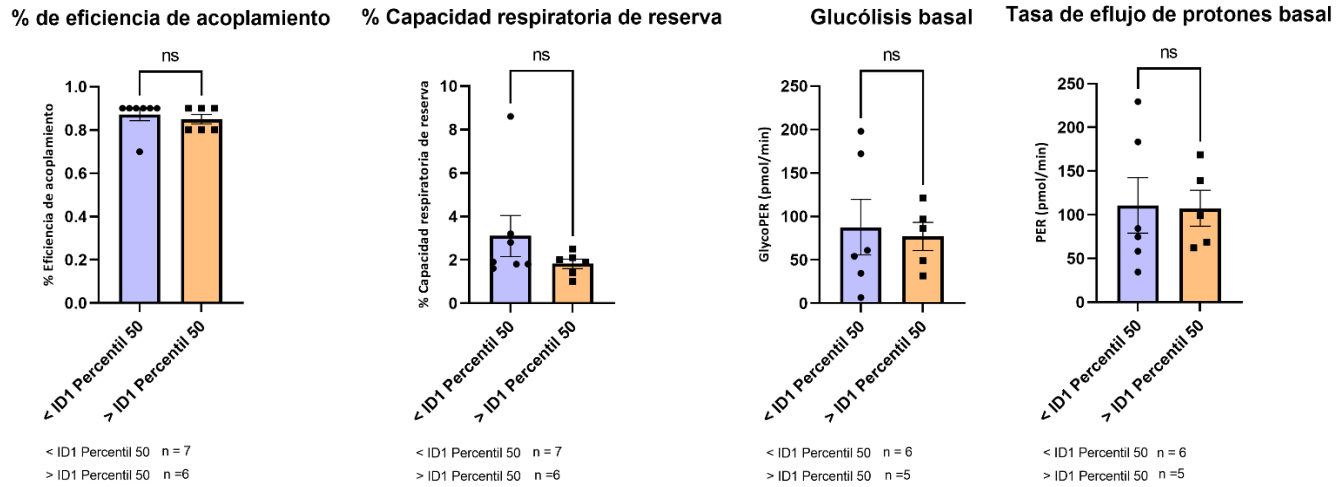
M. Expresión del gen *ID1* (Percentil 25) versus variables metabólicas.

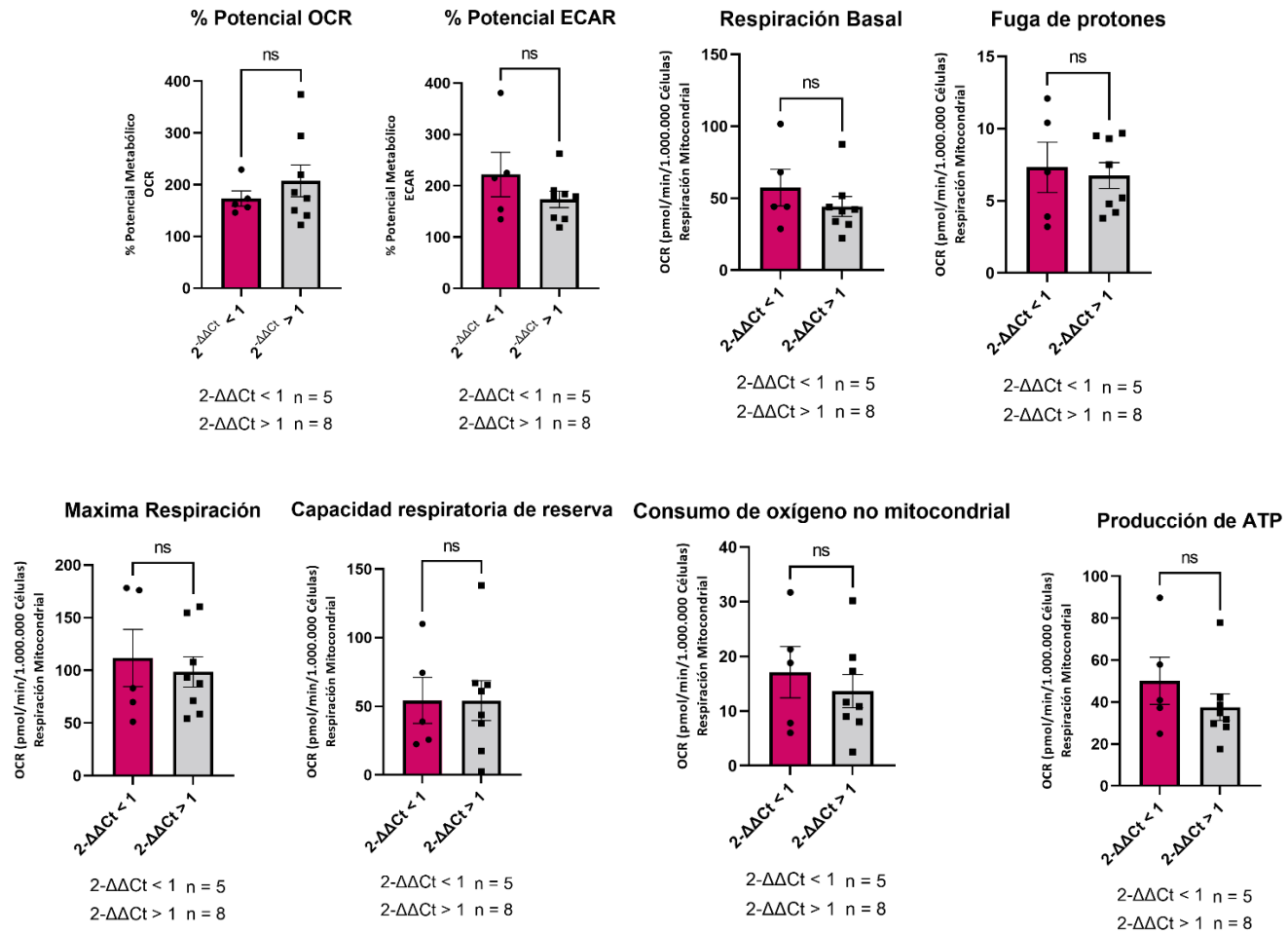


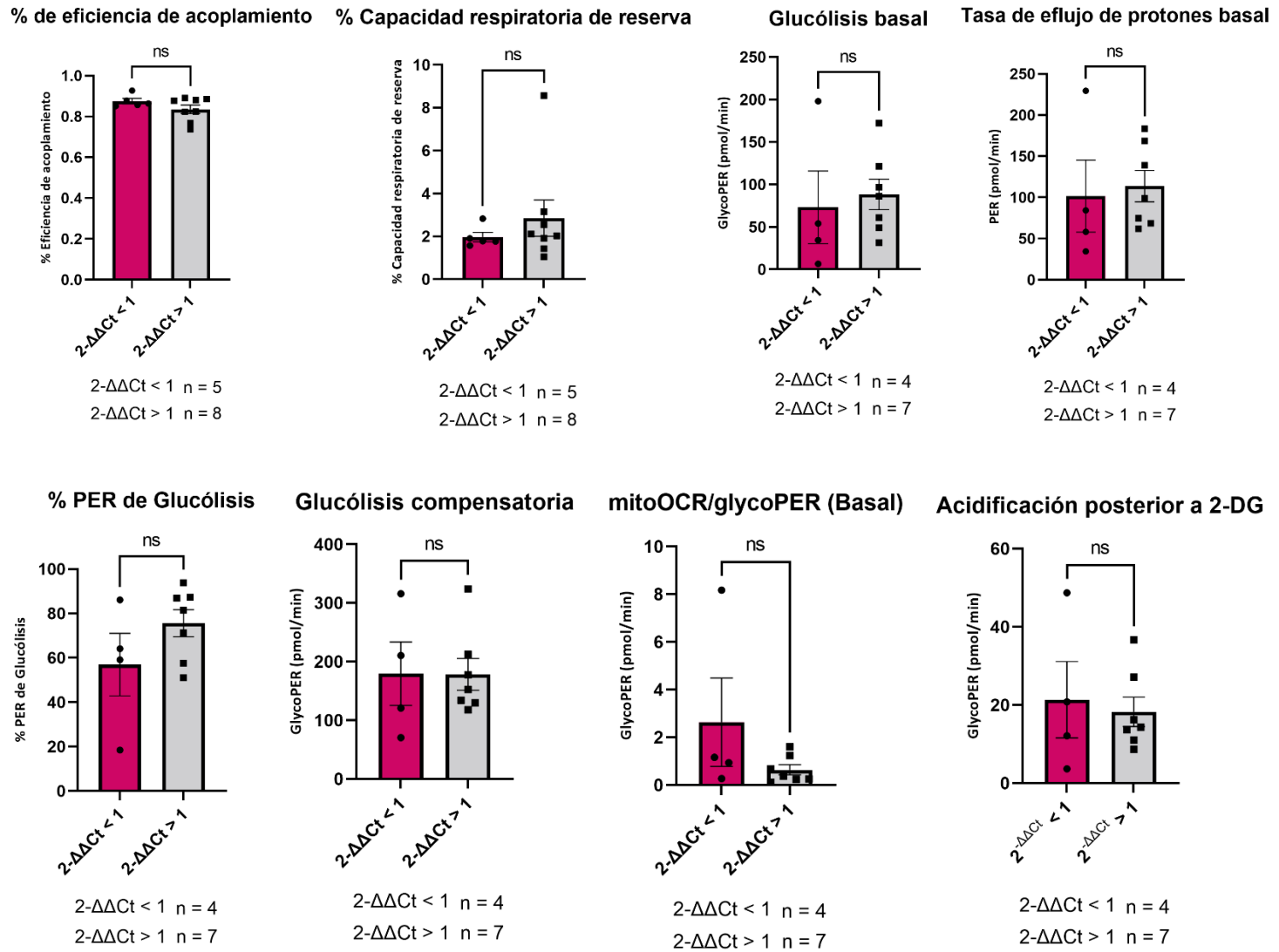


N. Expresión del gen *ID1* (Percentil 50) versus variables metabólicas.

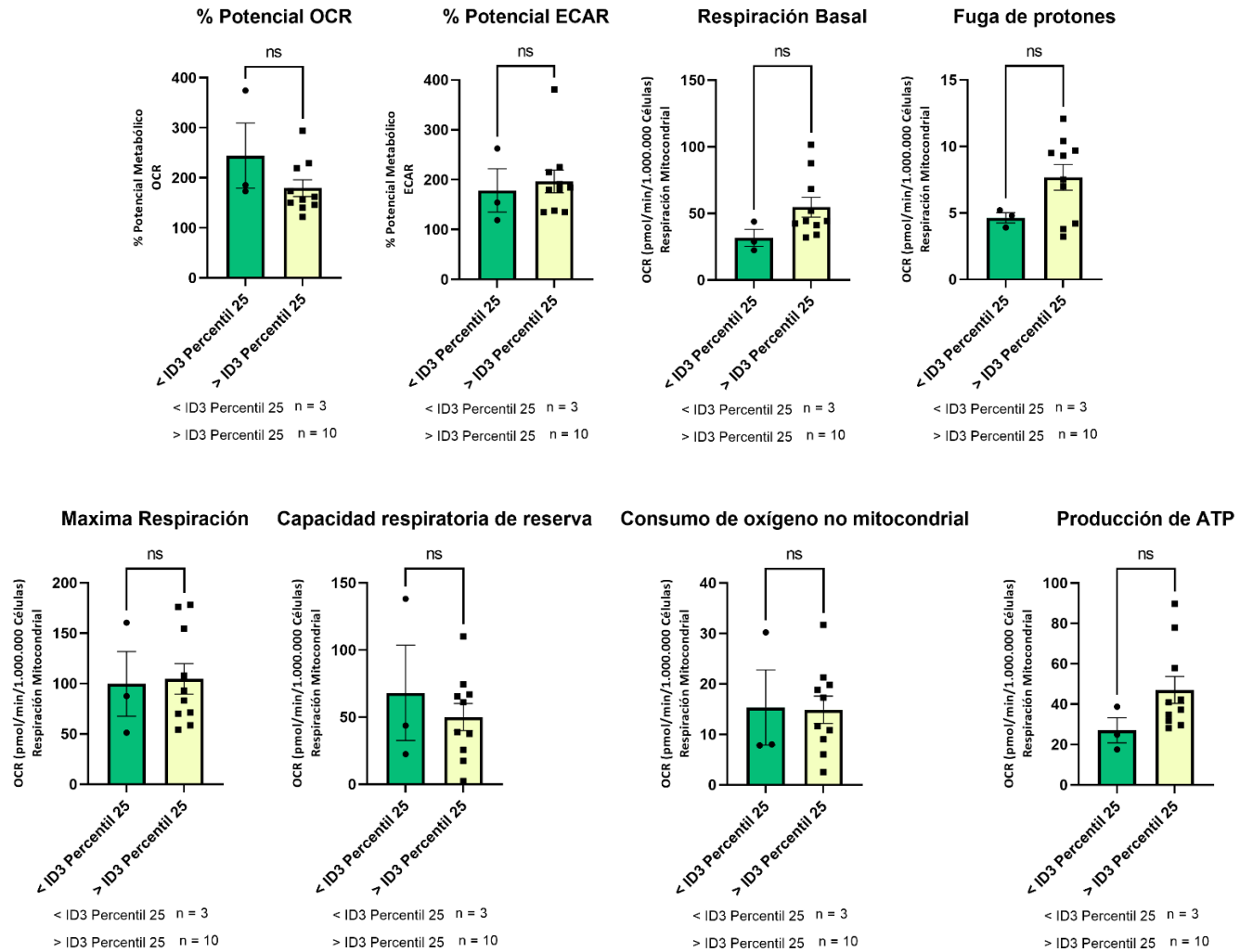


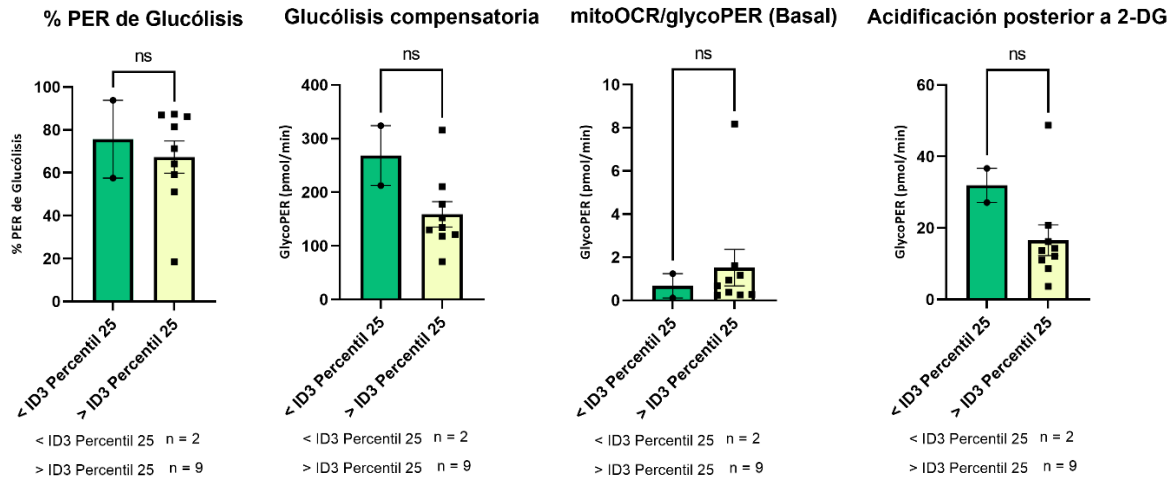
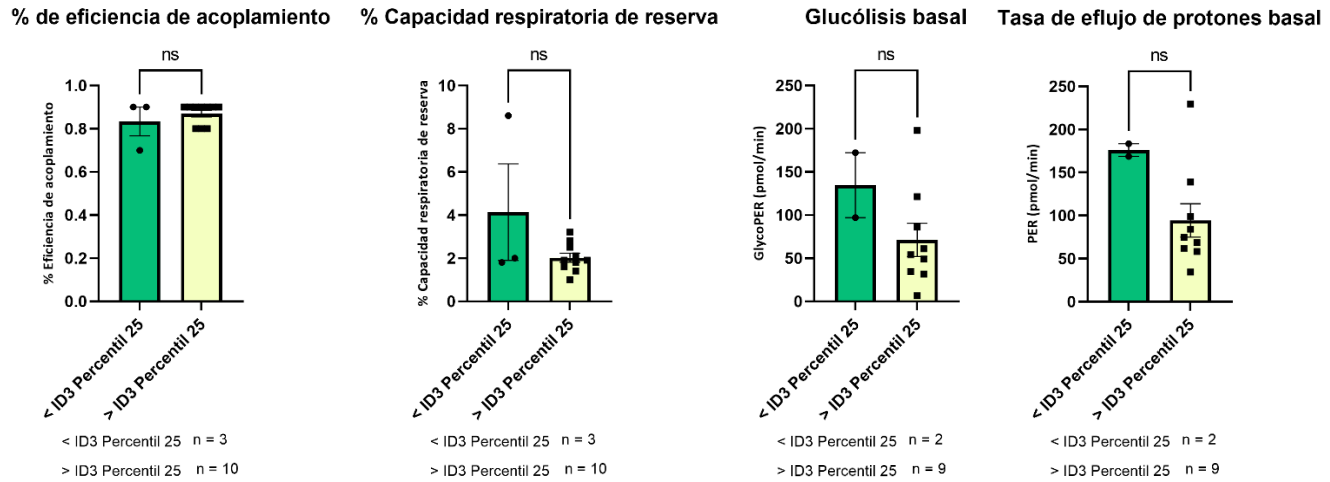


O. Expresión del gen *IDI* ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.

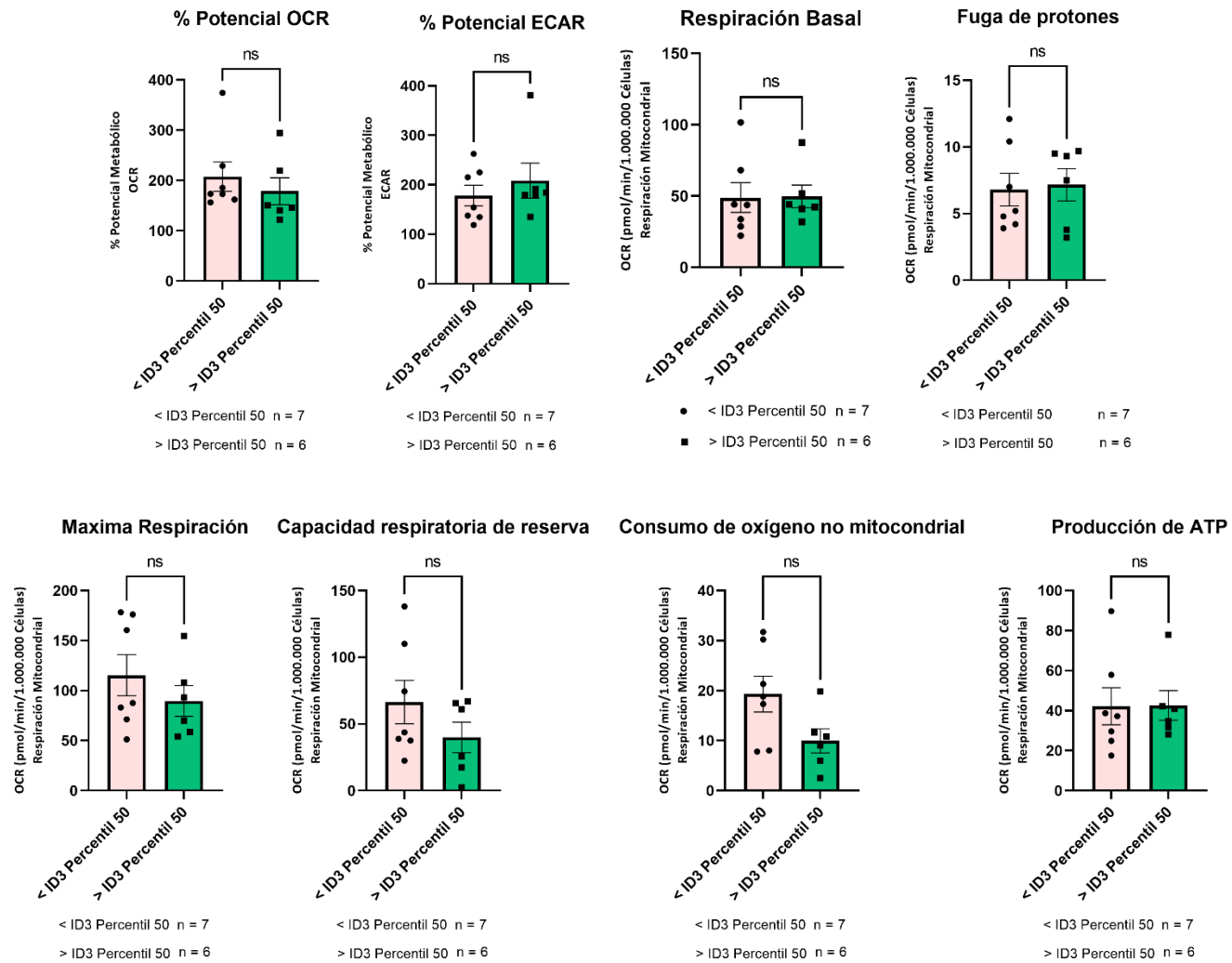


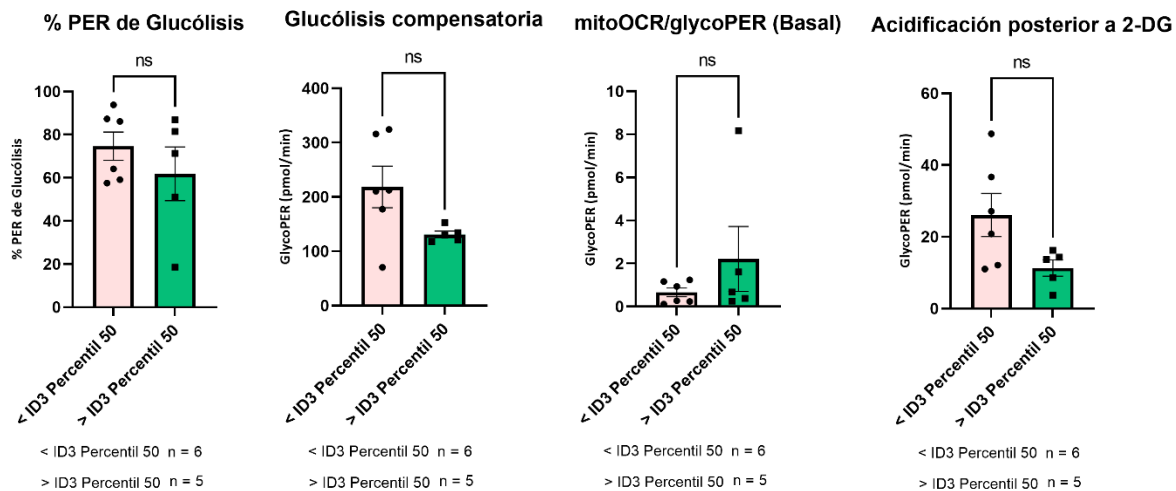
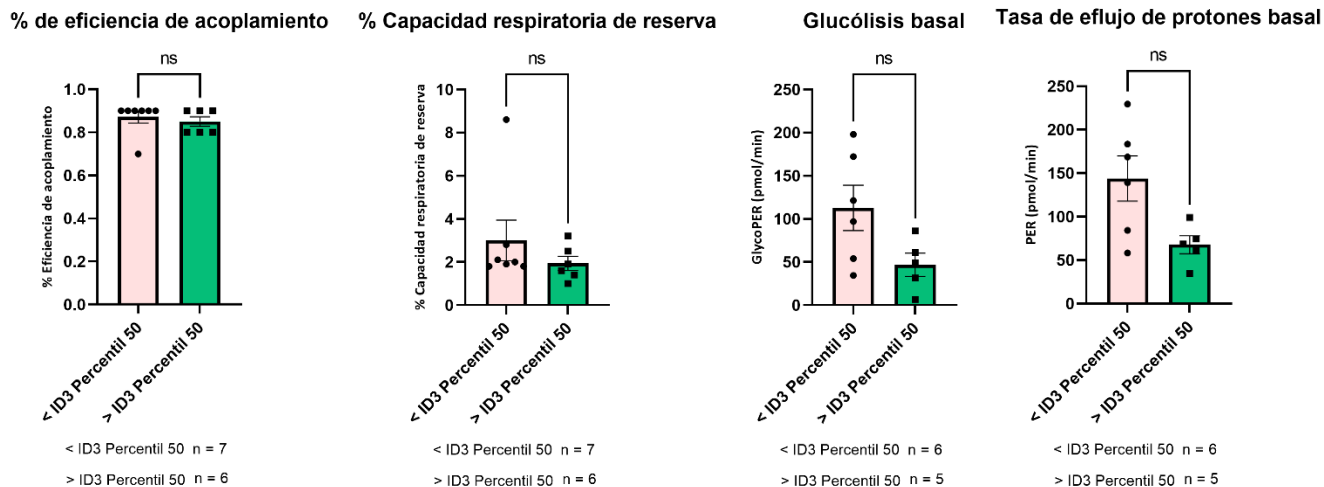
P. Expresión del gen *ID3* (Percentil 25) versus variables metabólicas.



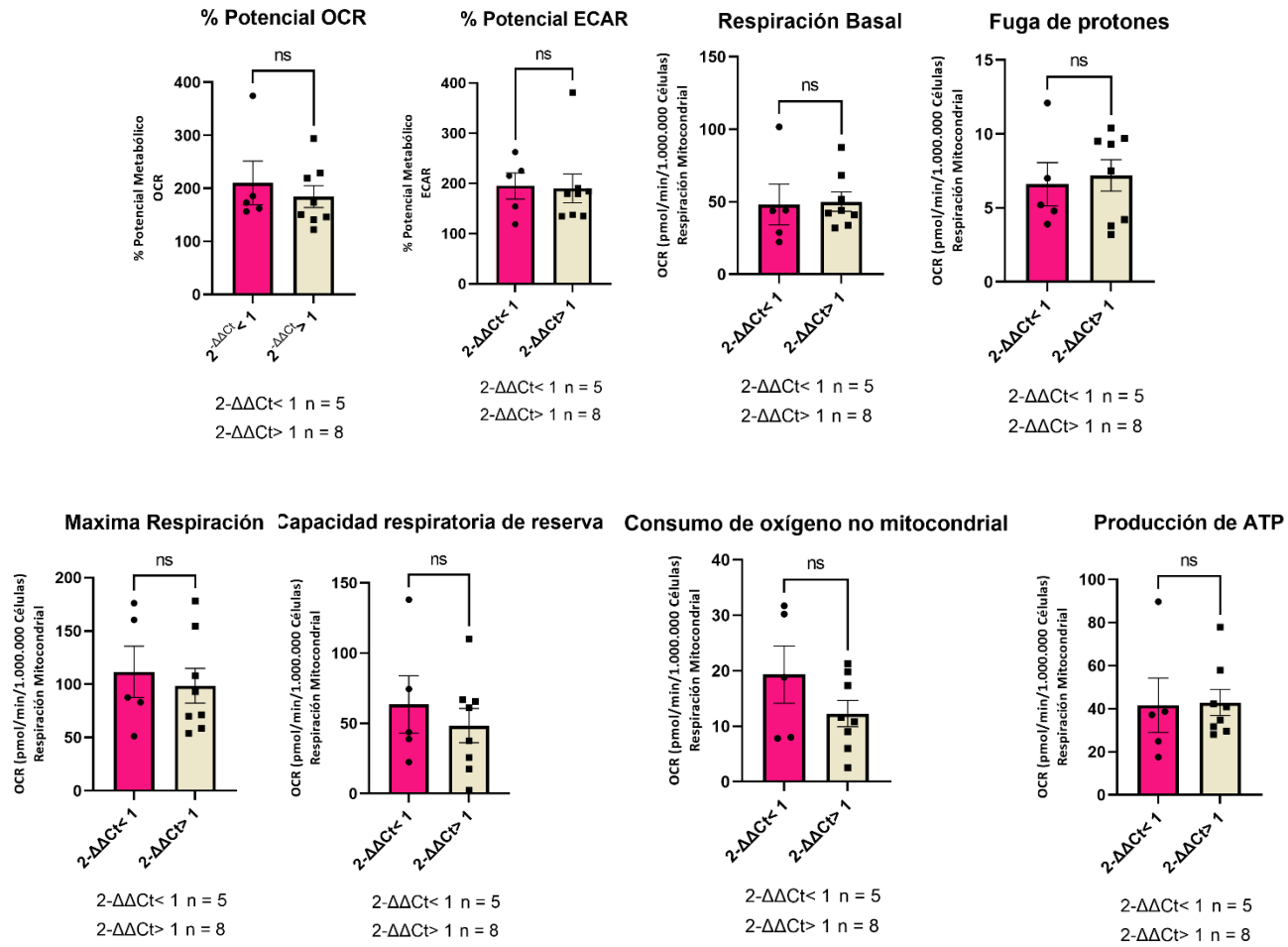


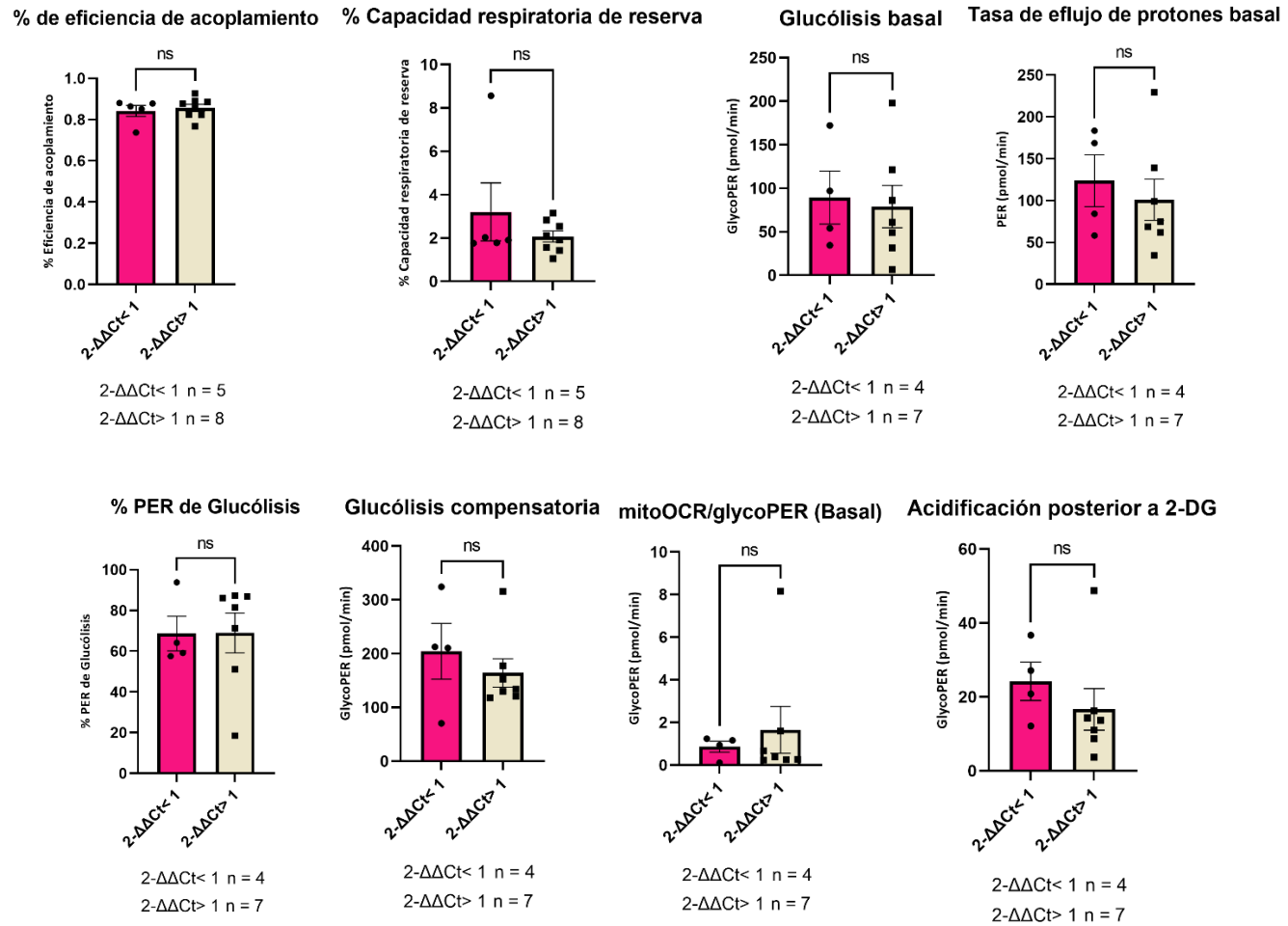
Q. Expresión del gen *ID3* (Percentil 50) versus variables metabólicas.



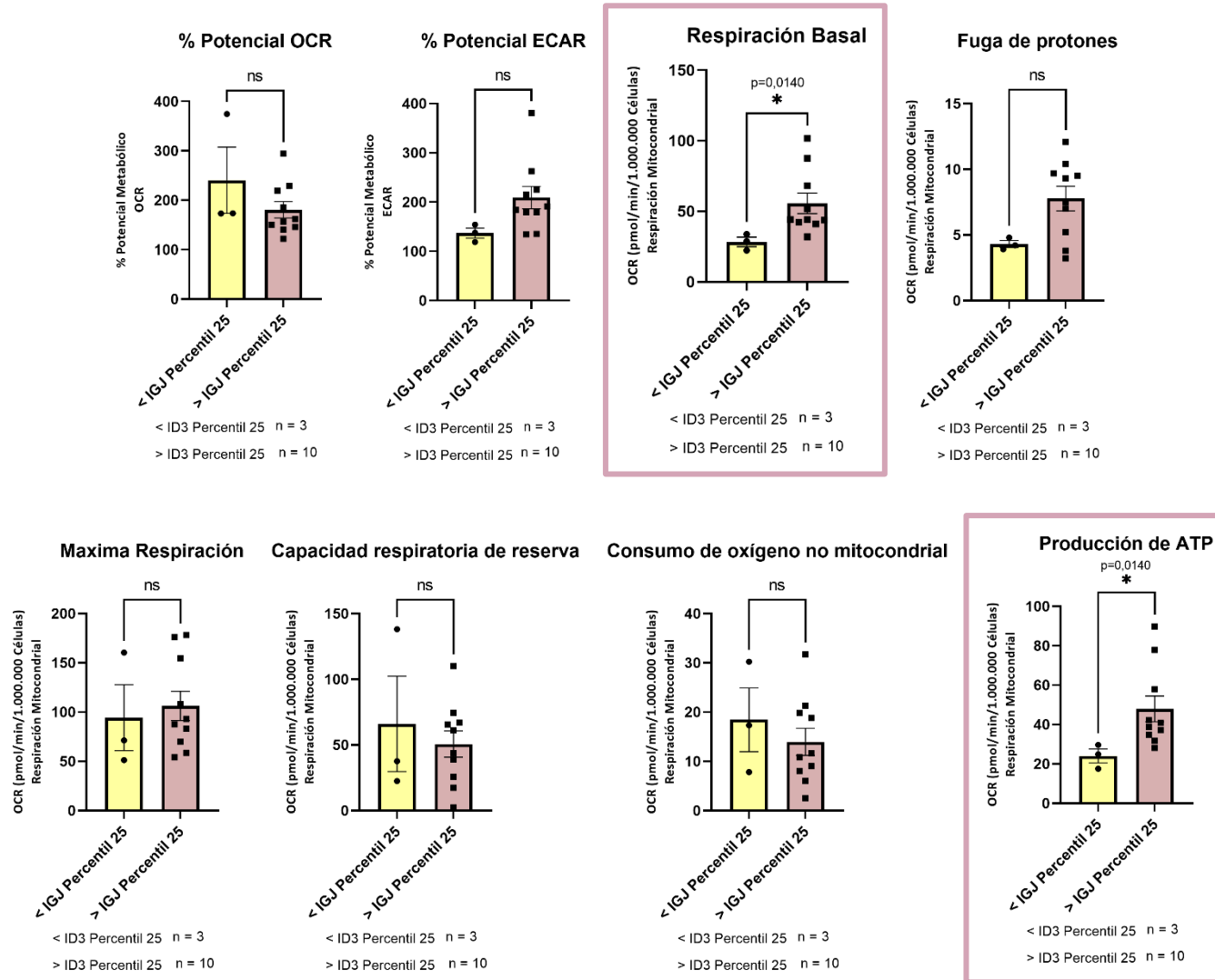


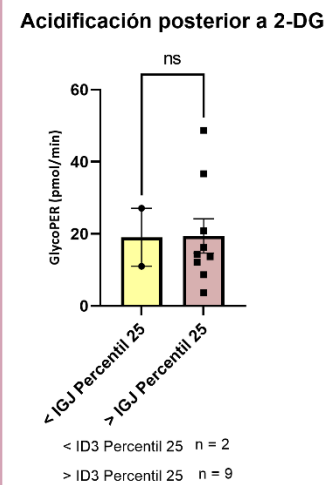
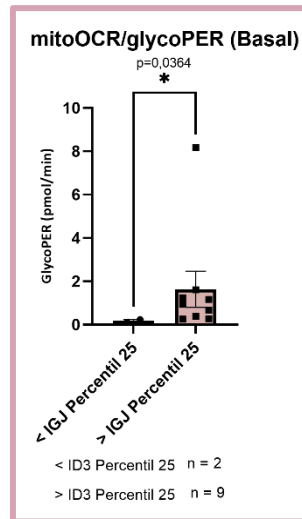
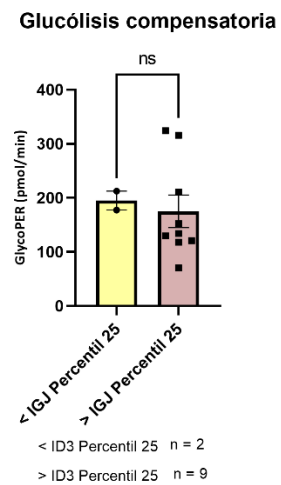
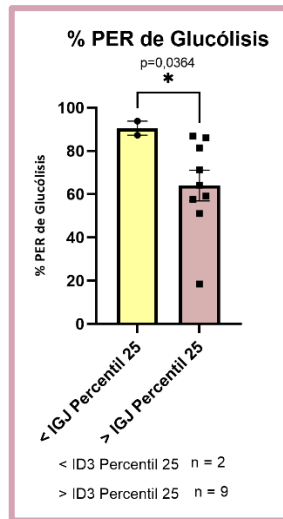
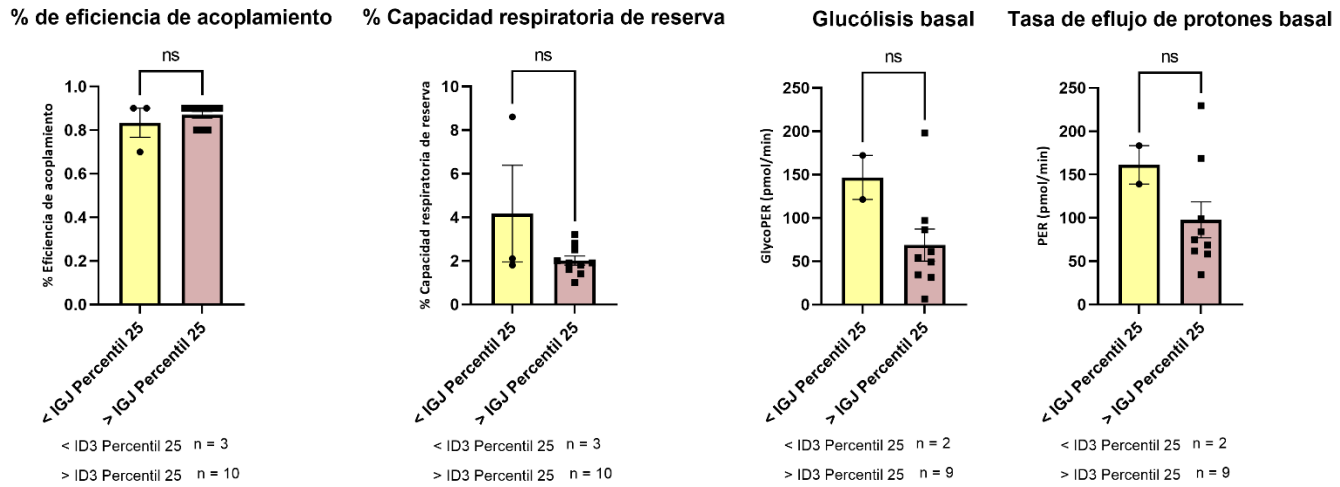
R. Expresión del gen *ID3* ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.



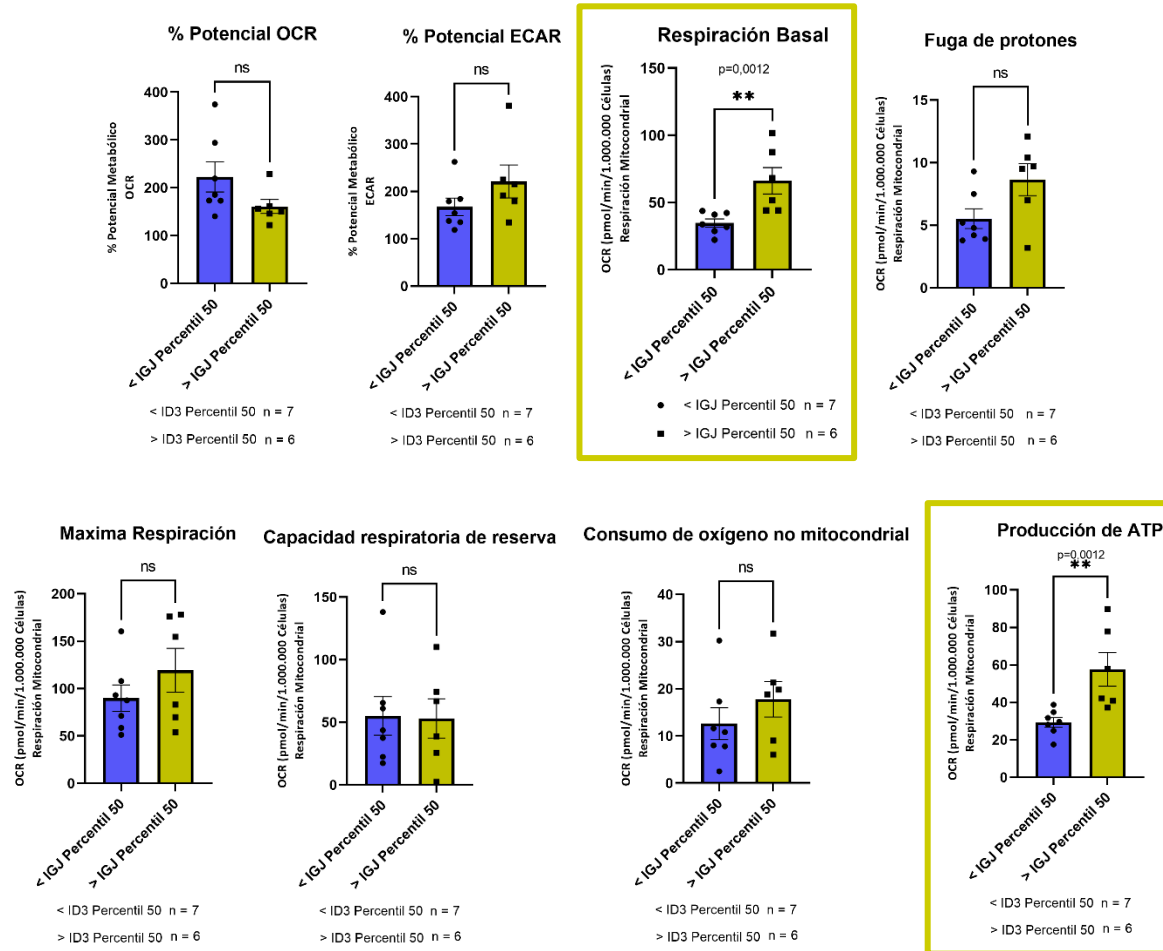


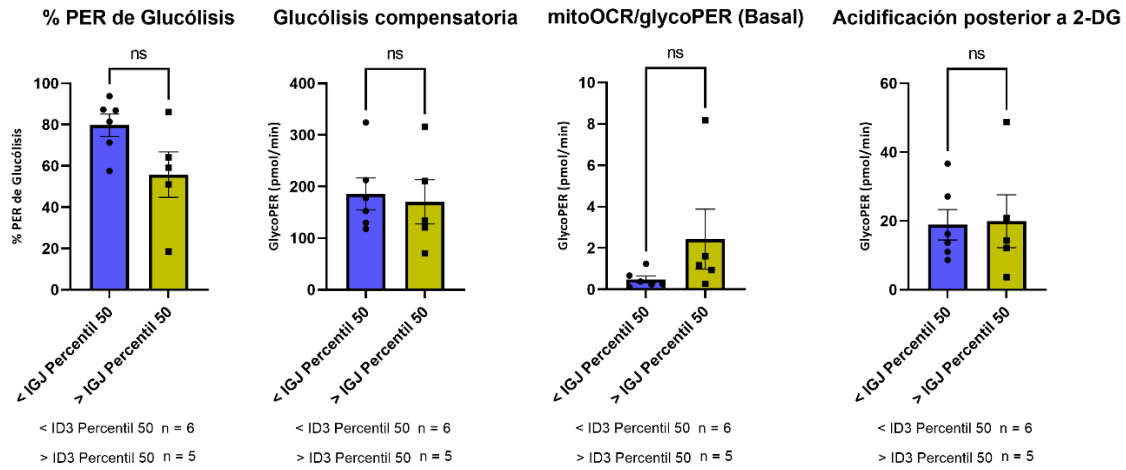
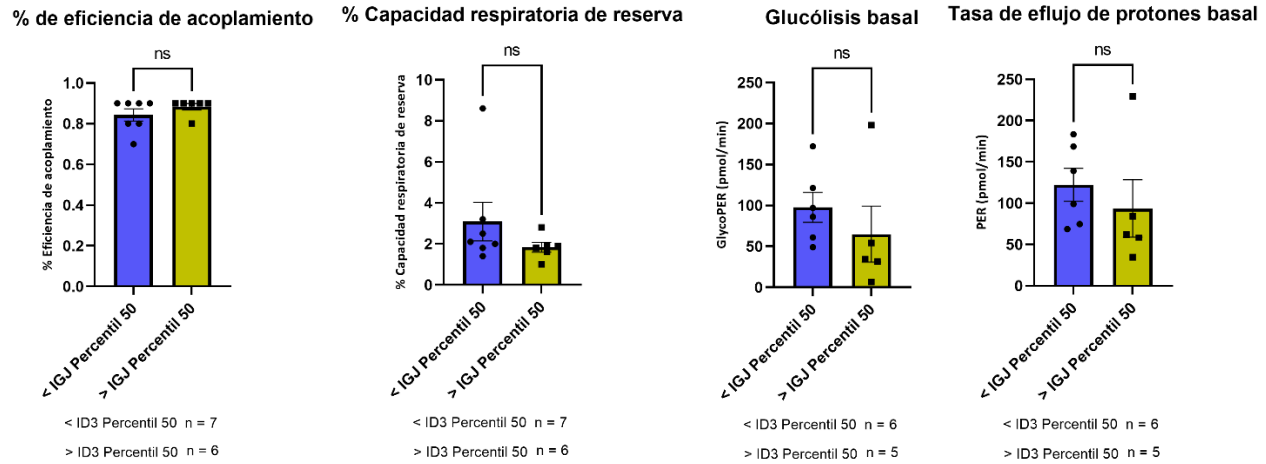
S. Expresión del gen IGJ (Percentil 25) versus variables metabólicas.



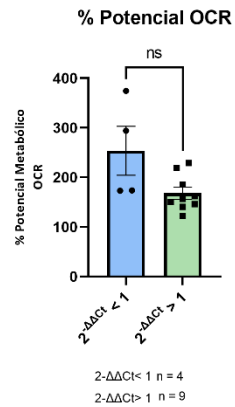


T. Expresión del gen IGJ (Percentil 50) versus variables metabólicas.

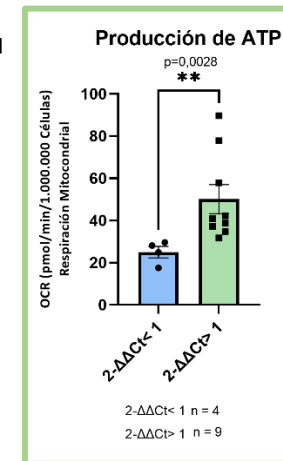
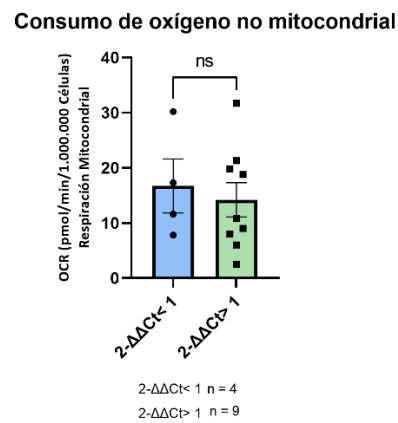
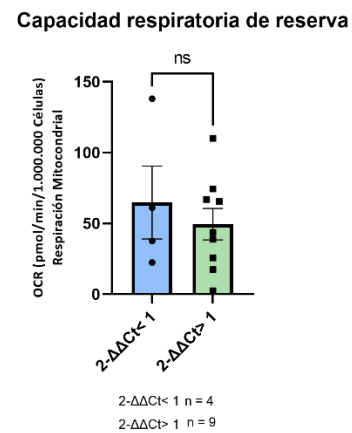
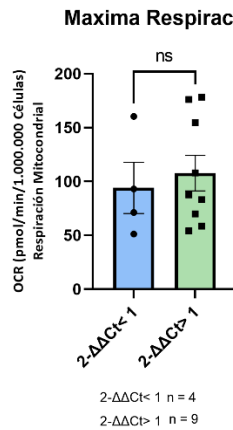
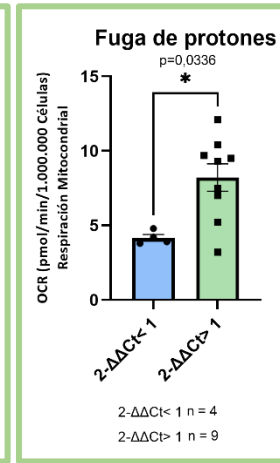
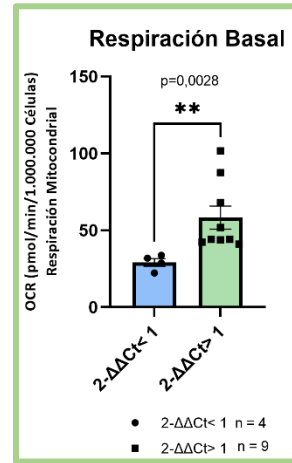
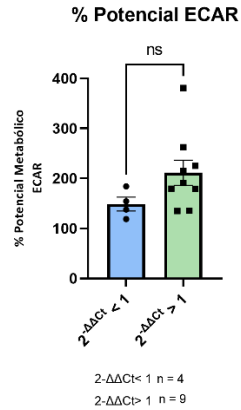




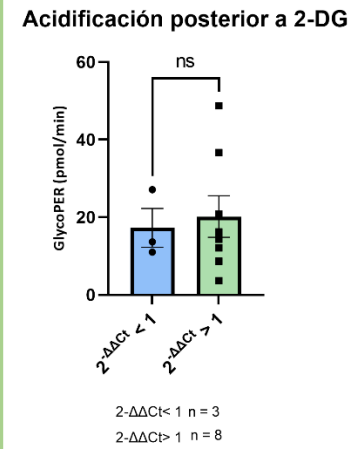
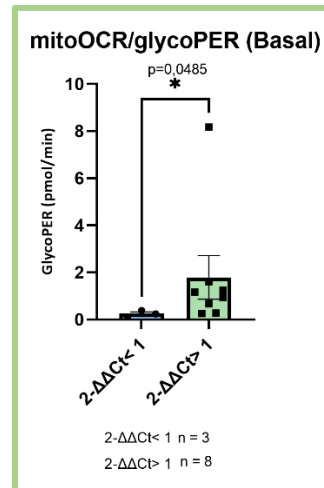
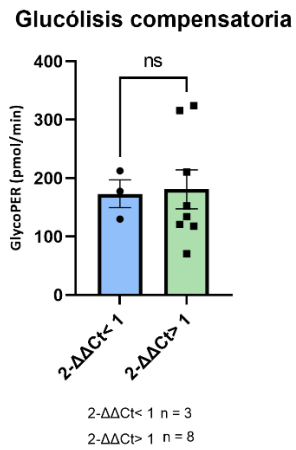
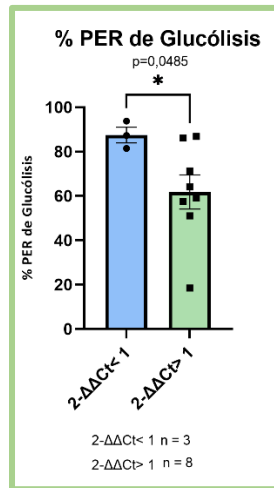
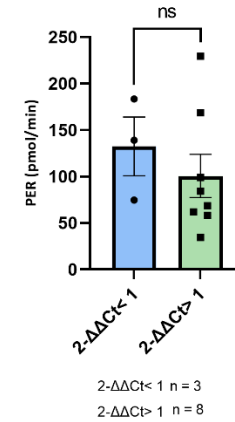
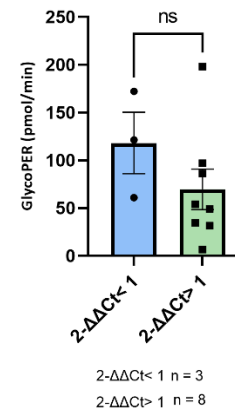
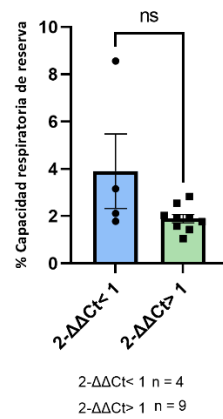
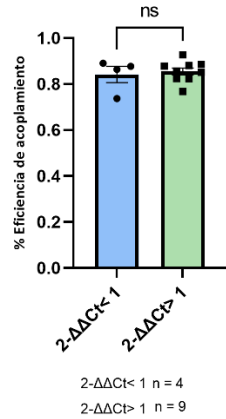
U. Expresión del gen *IGJ* ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.

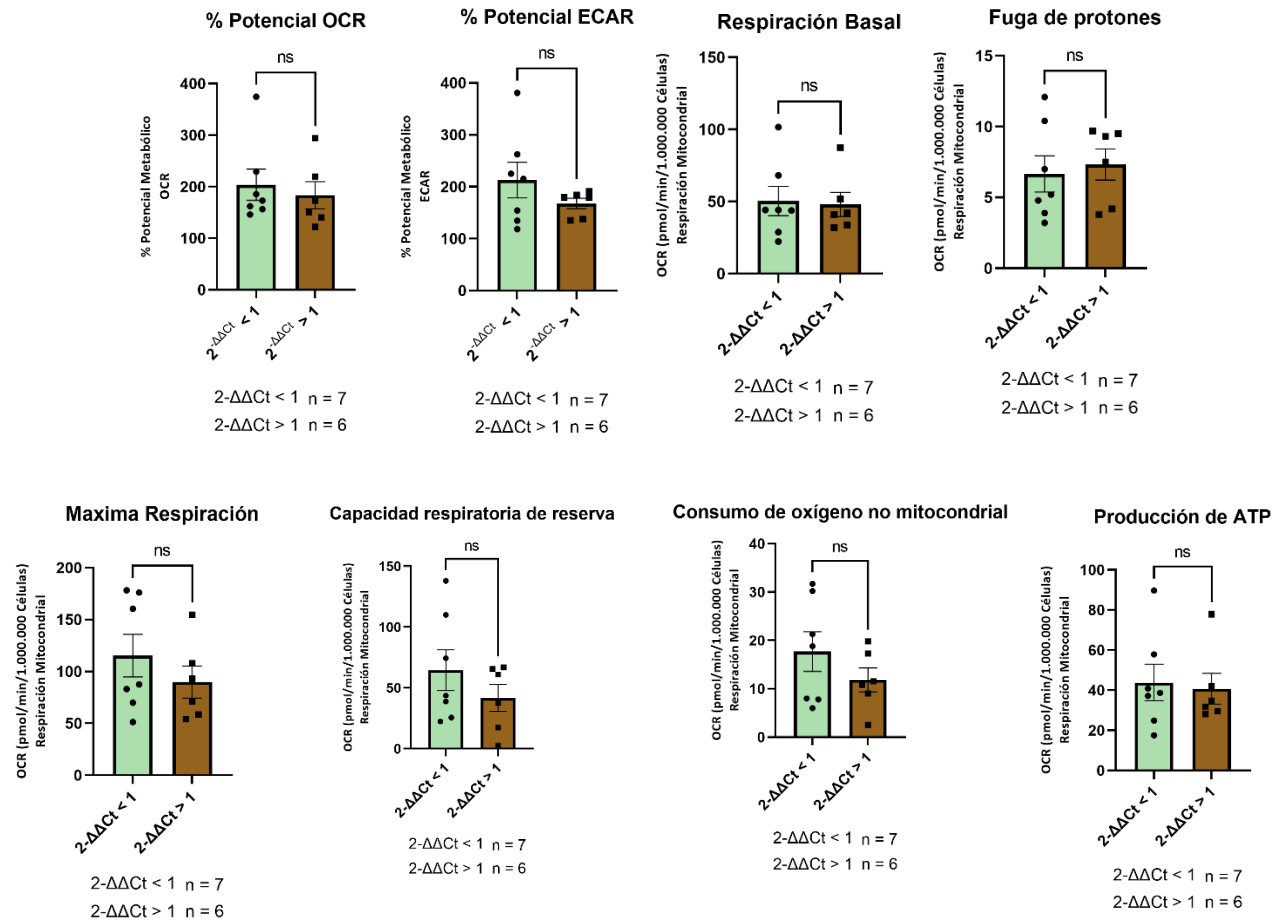


Z

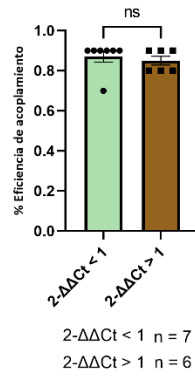


% de eficiencia de acoplamiento % Capacidad respiratoria de reserva Glucólisis basal Tasa de eflujo de protones basal

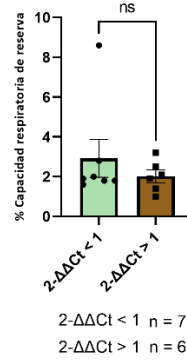


V. Expresión del gen *ID1* e *ID3* ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.

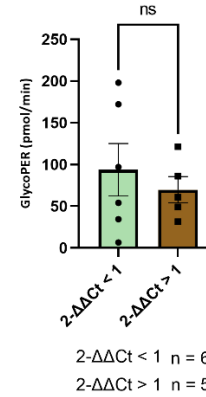
% de eficiencia de acoplamiento



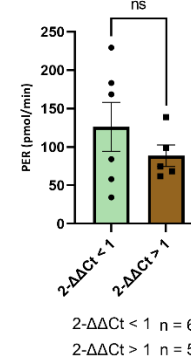
% Capacidad respiratoria de reserva



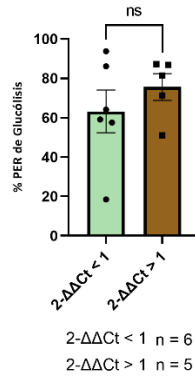
Glucólisis basal



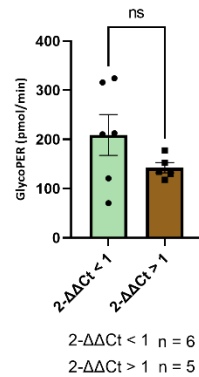
Tasa de eflujo de protones basal



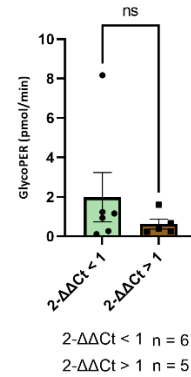
% PER de Glucólisis



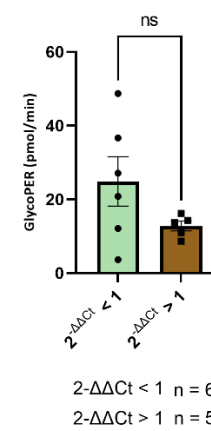
Glucólisis compensatoria



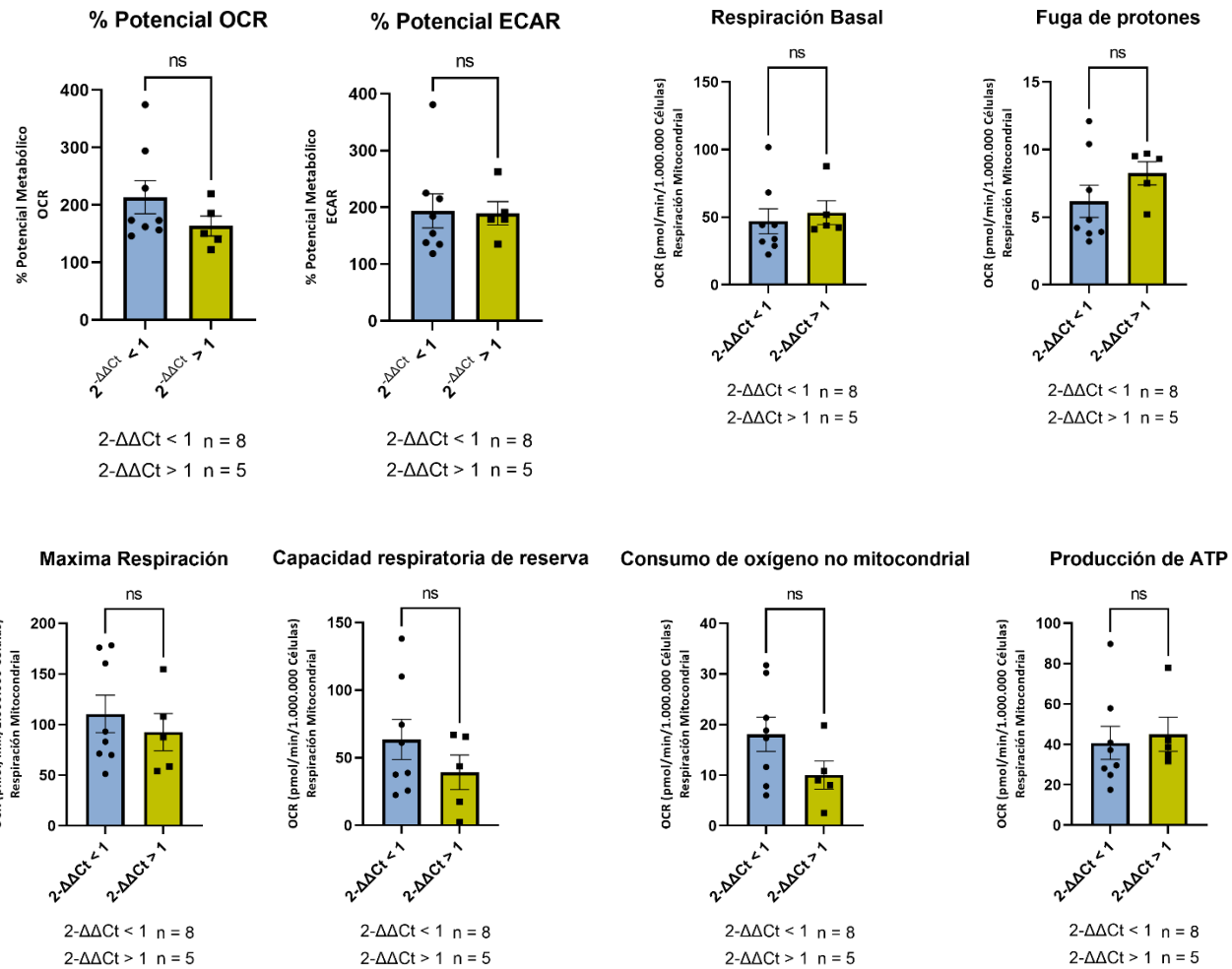
mitoOCR/glycoPER (Basal)



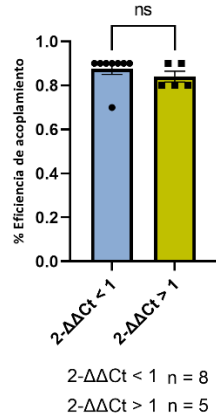
Acidificación posterior a 2-DG



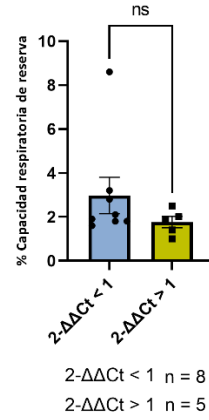
W. Expresión del gen *ID1* e *IGJ* ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.



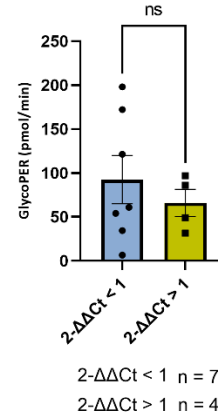
% de eficiencia de acoplamiento



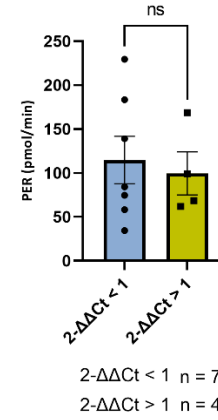
% Capacidad respiratoria de reserva



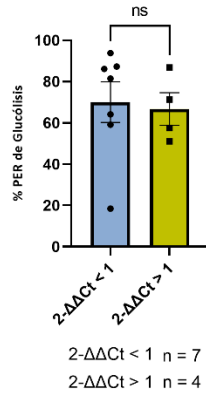
Glucólisis basal



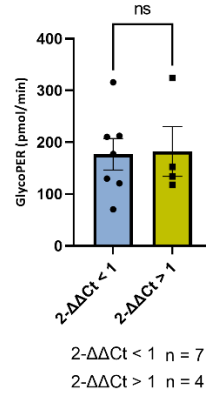
Tasa de eflujo de protones basal



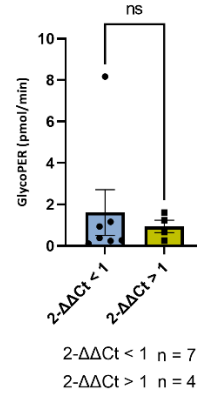
% PER de Glucólisis



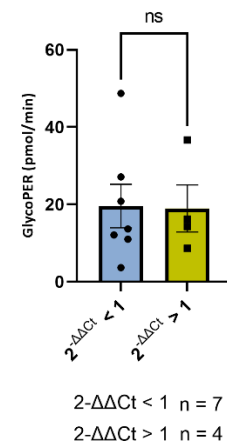
Glucólisis compensatoria

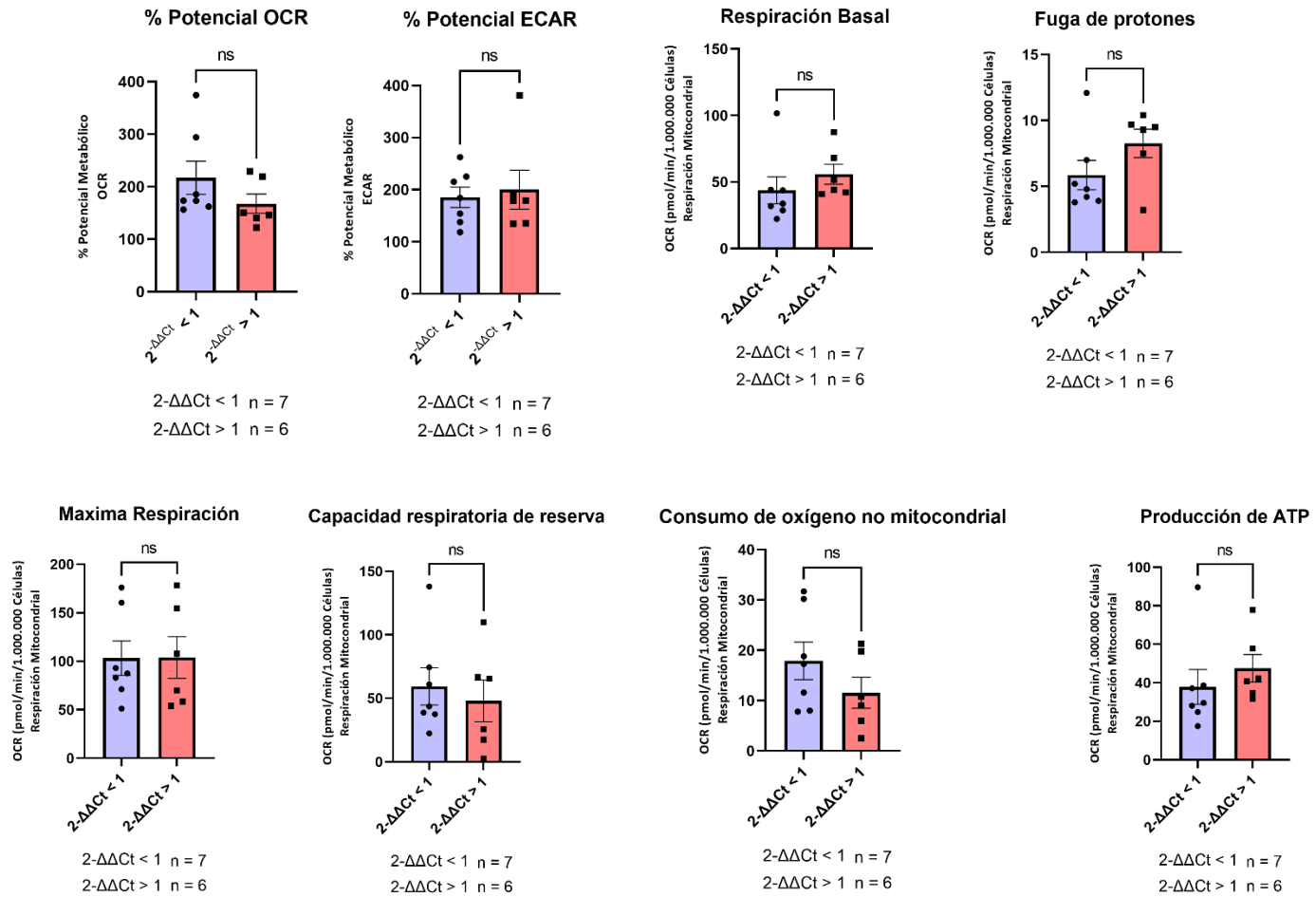


mitoOCR/glycoPER (Basal)

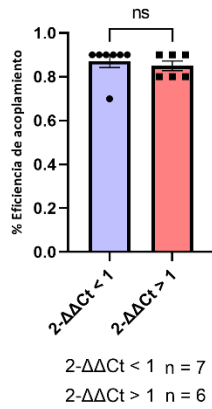


Acidificación posterior a 2-DG

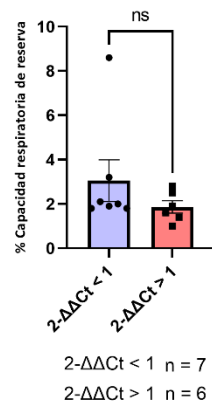


X. Expresión del gen *ID3* e *IGJ* ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.

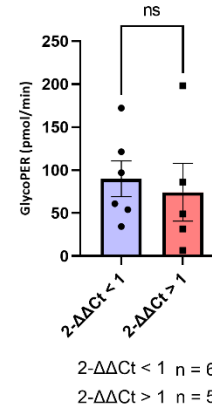
% de eficiencia de acoplamiento



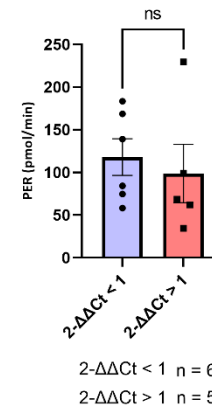
% Capacidad respiratoria de reserva



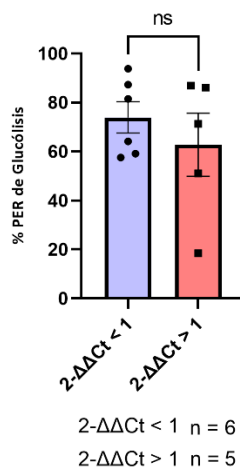
Glucólisis basal



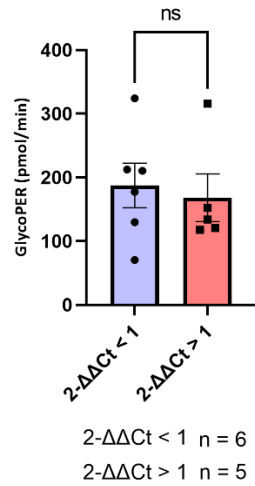
Tasa de eflujo de protones basal



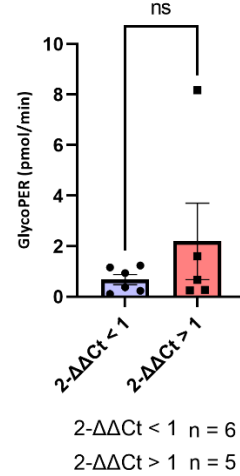
% PER de Glucólisis



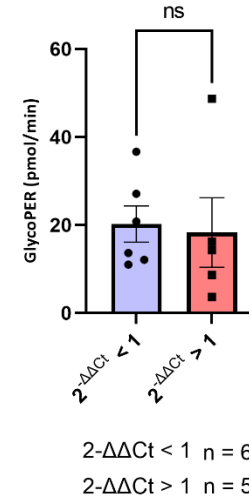
Glucólisis compensatoria



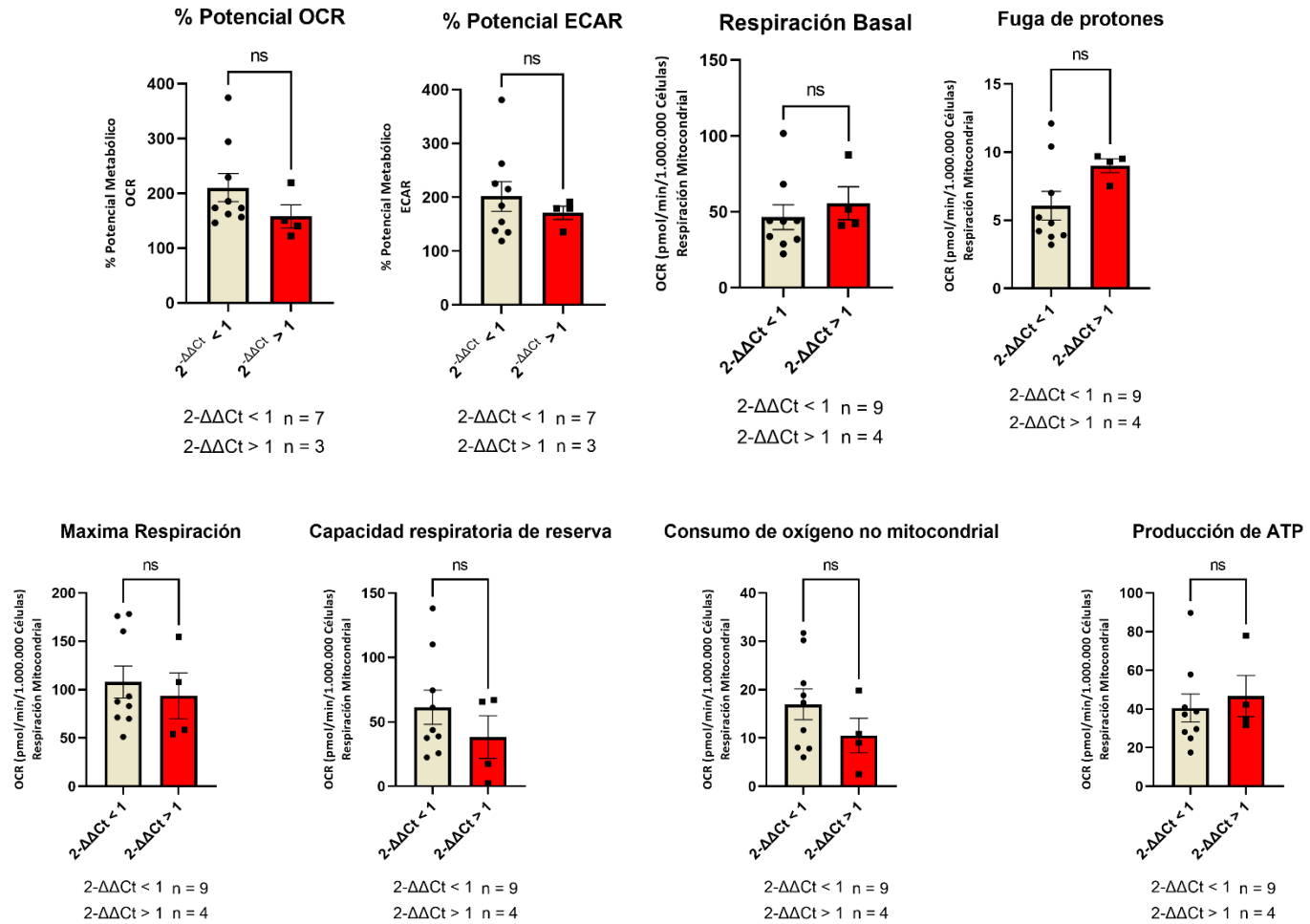
mitoOCR/glycoPER (Basal)

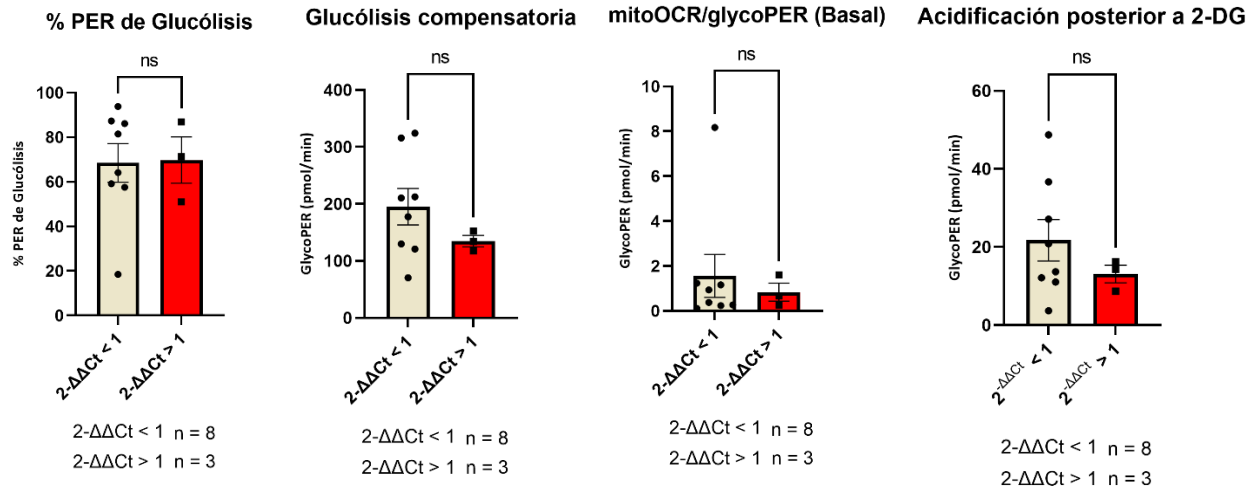
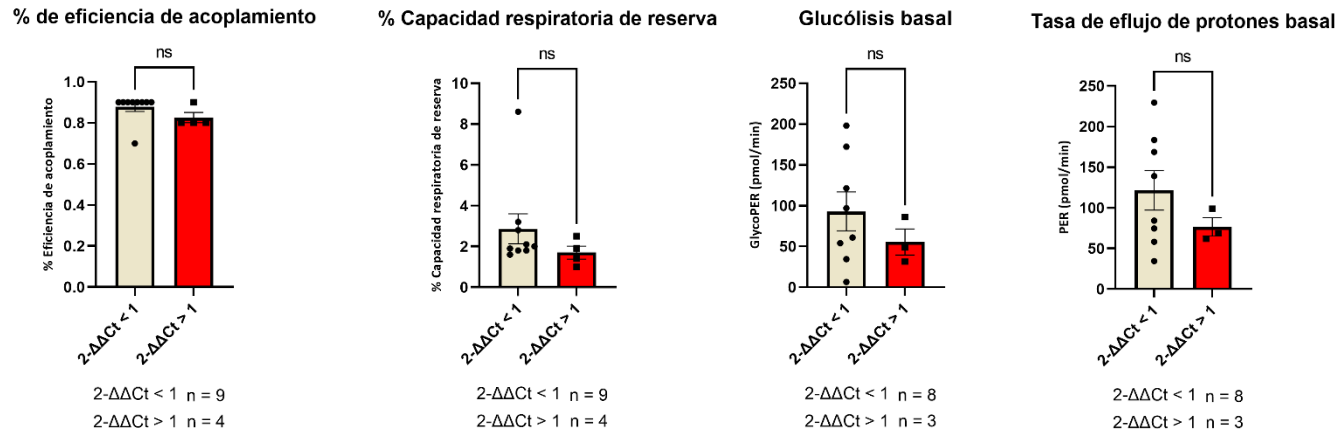


Acidificación posterior a 2-DG



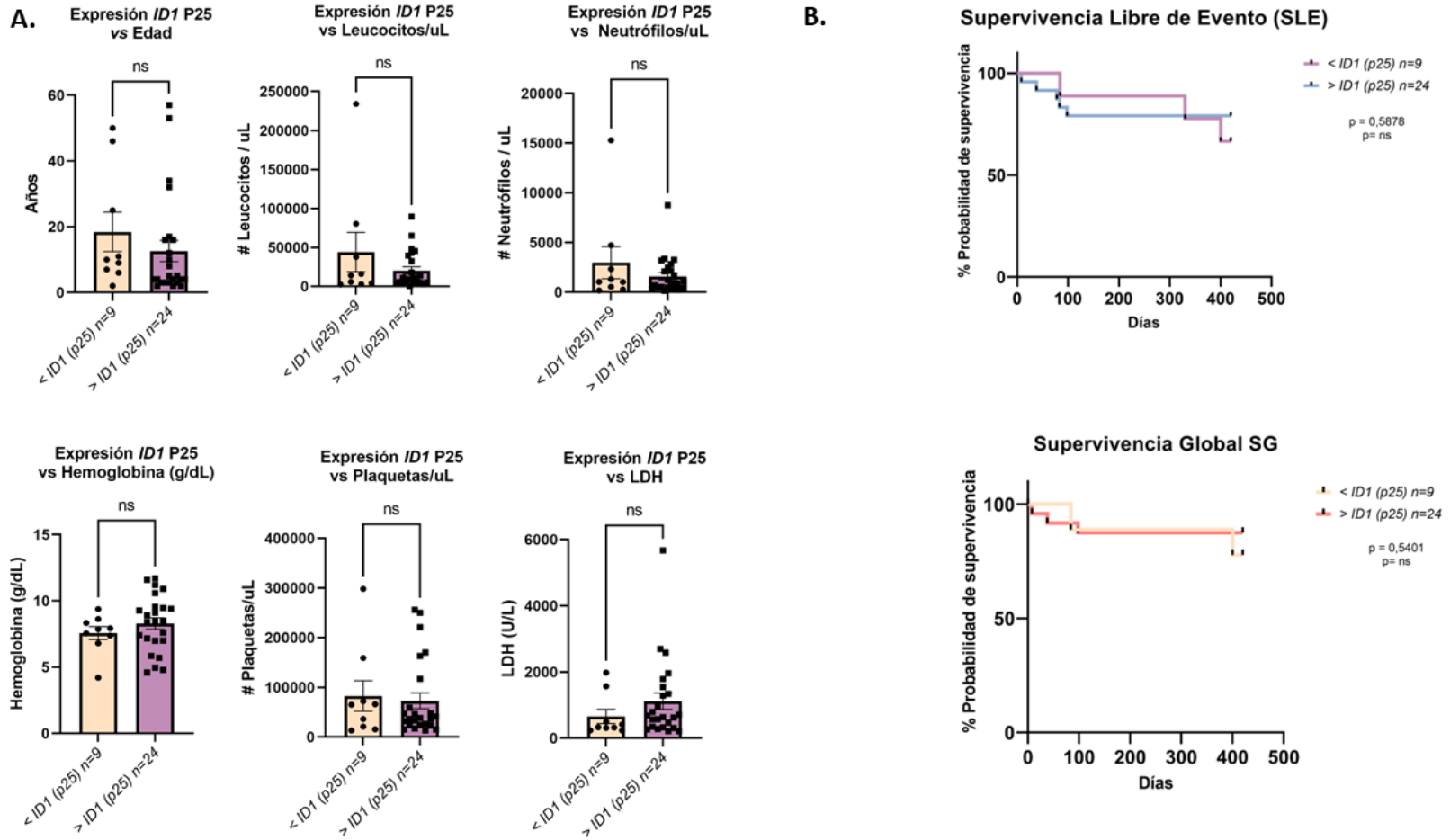
Y. Expresión del gen *ID1*, *ID3* e *IGJ* ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$) versus variables metabólicas.



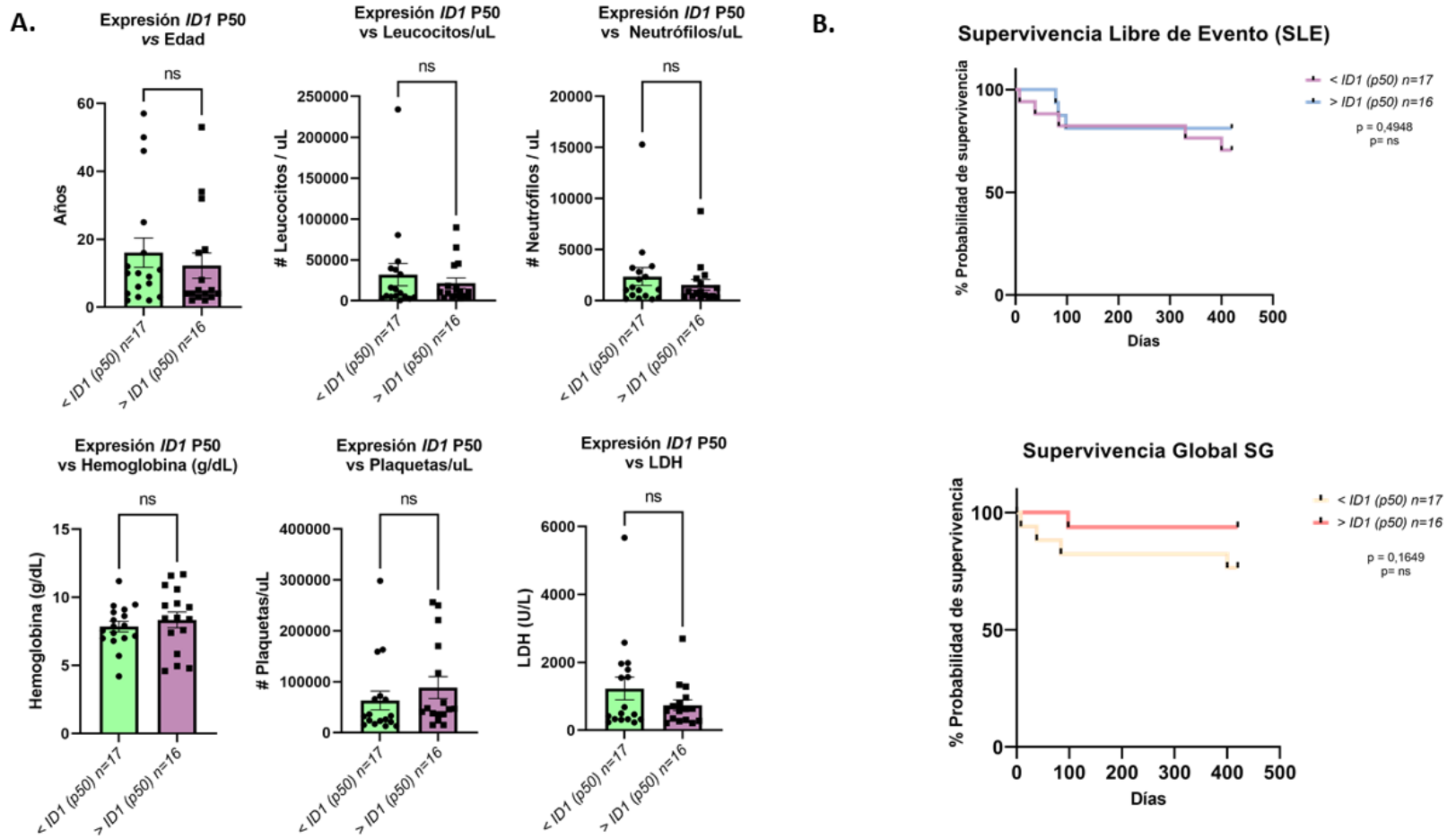


Apéndice I. Evaluación de la expresión génica con variables clínicas de la LLA-B

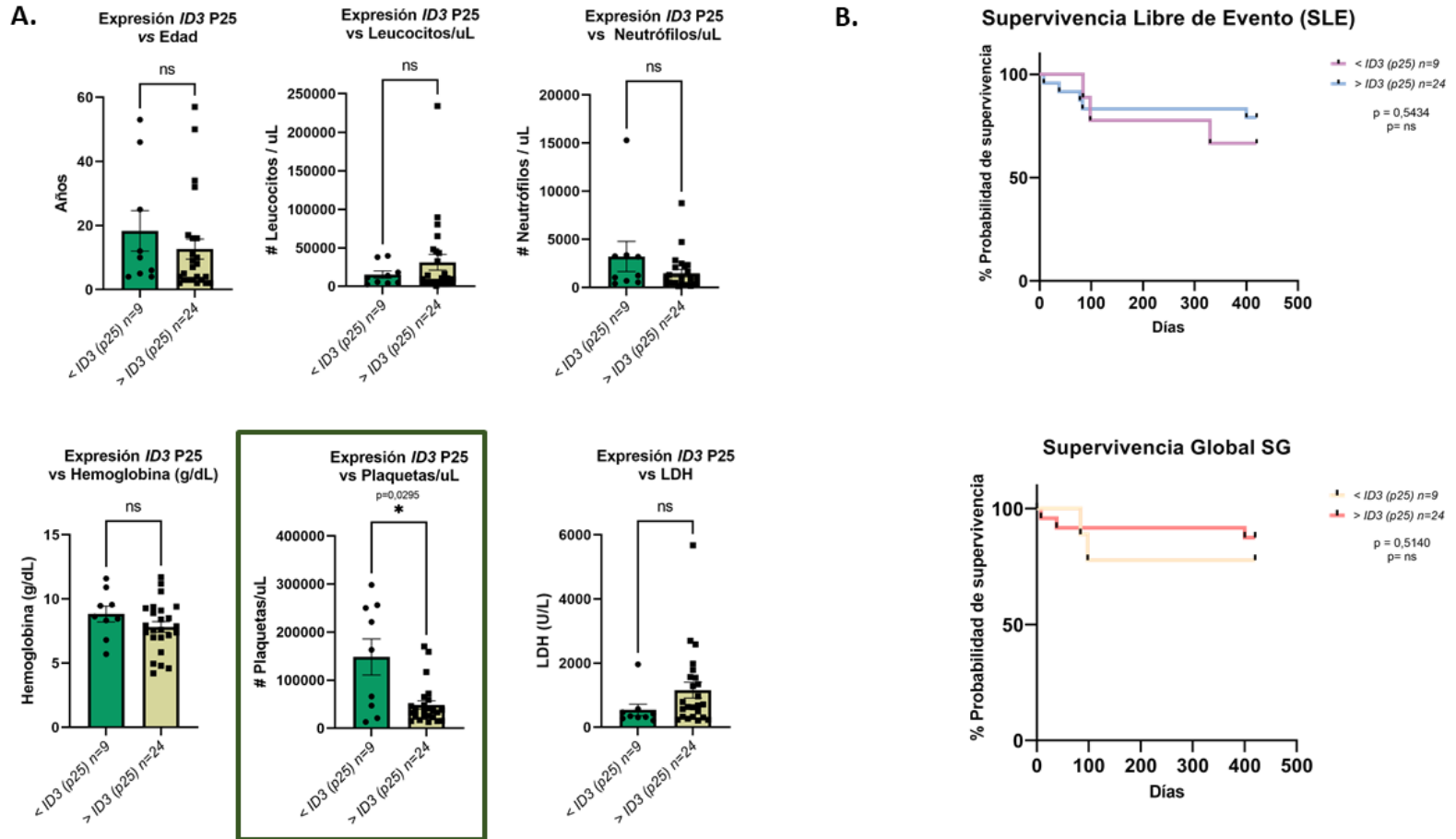
A. Expresión génica de *ID1* percentil 25 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.



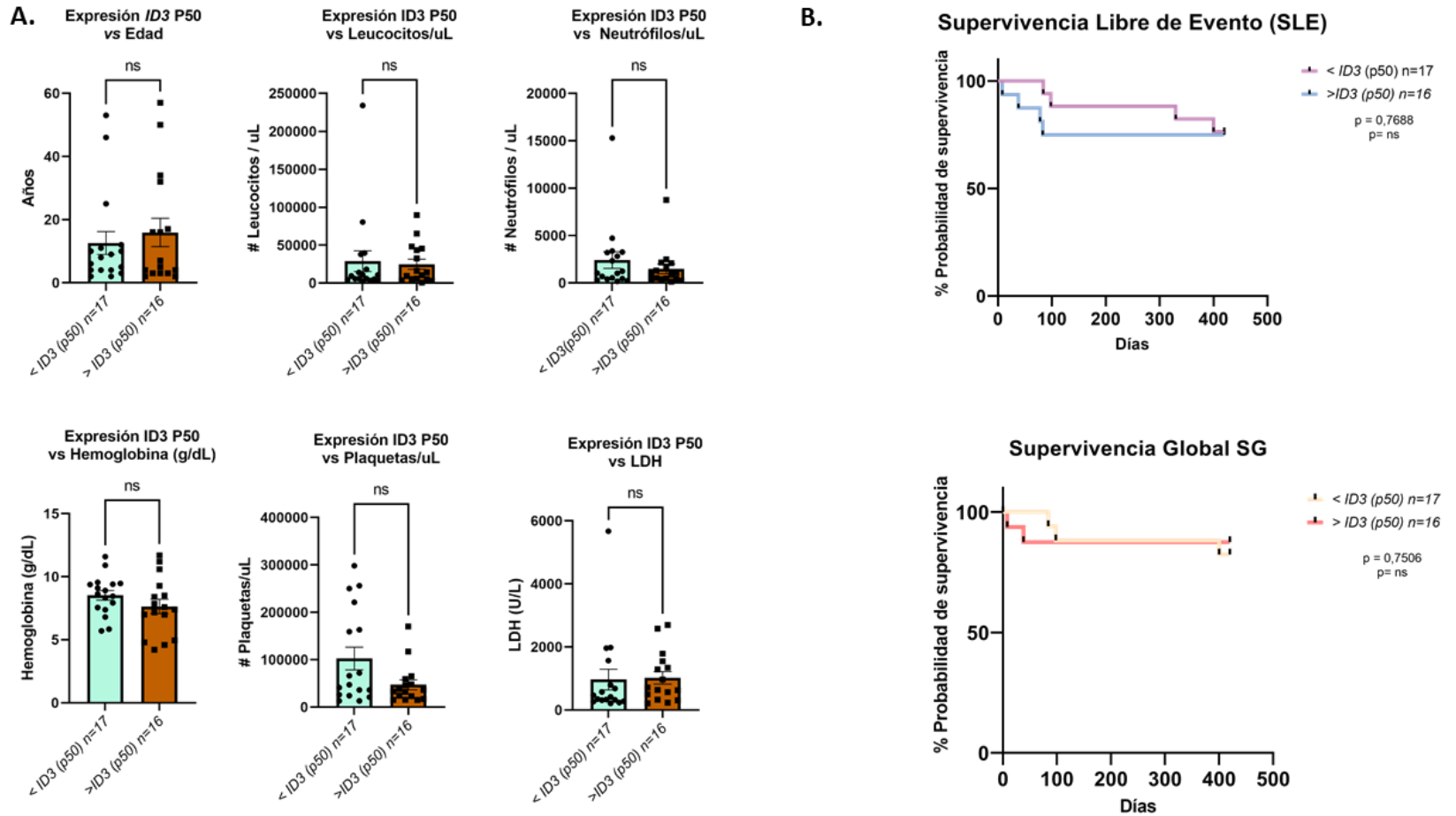
B. Expresión génica de *ID1* percentil 50 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.



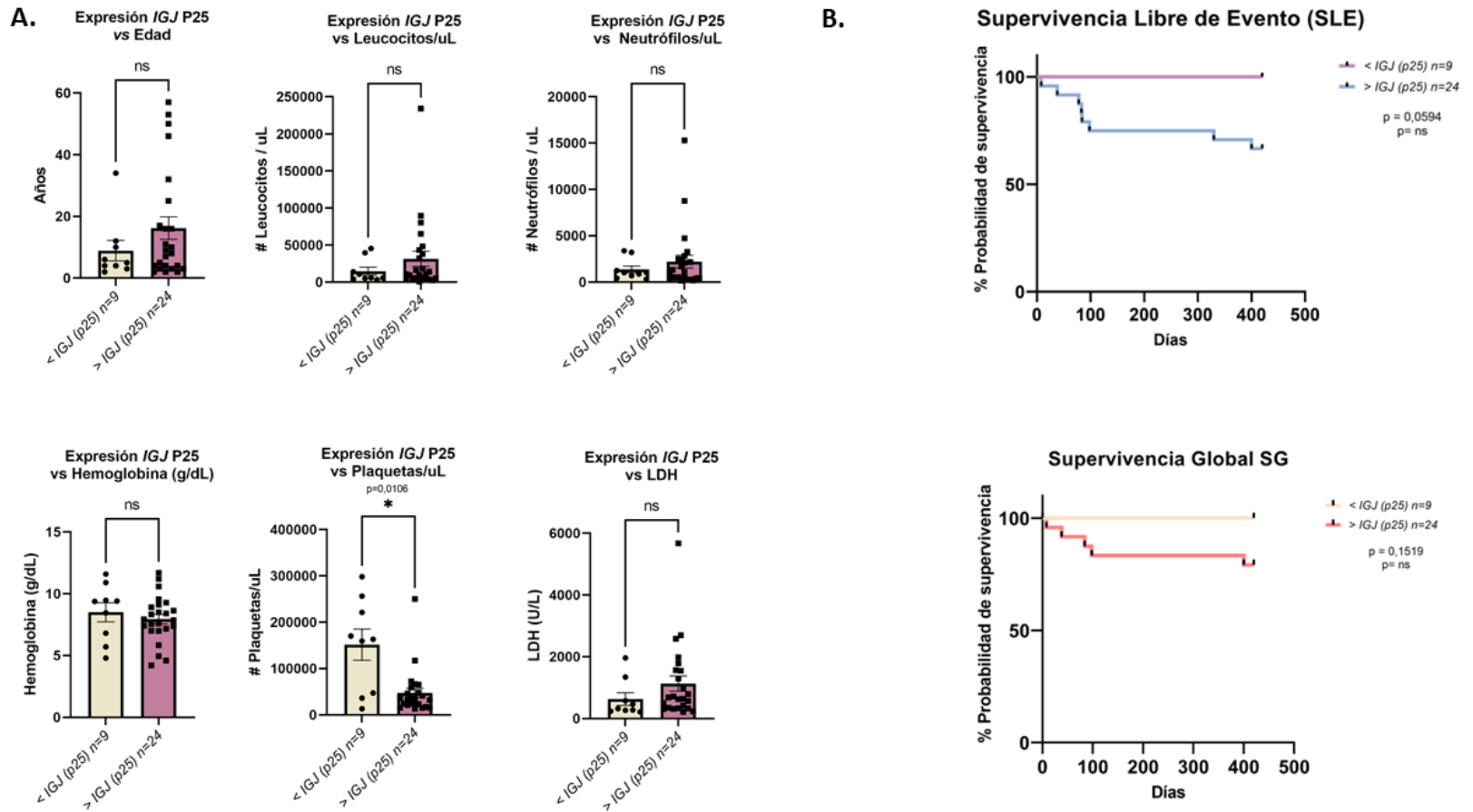
C. Expresión génica de *ID3* percentil 25 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.



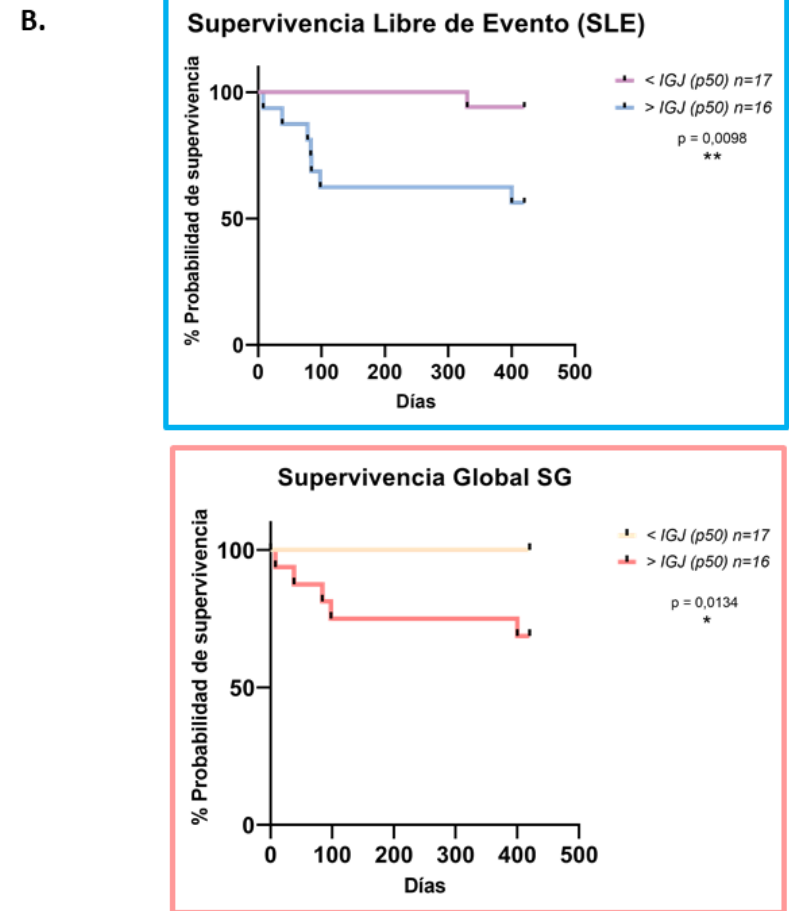
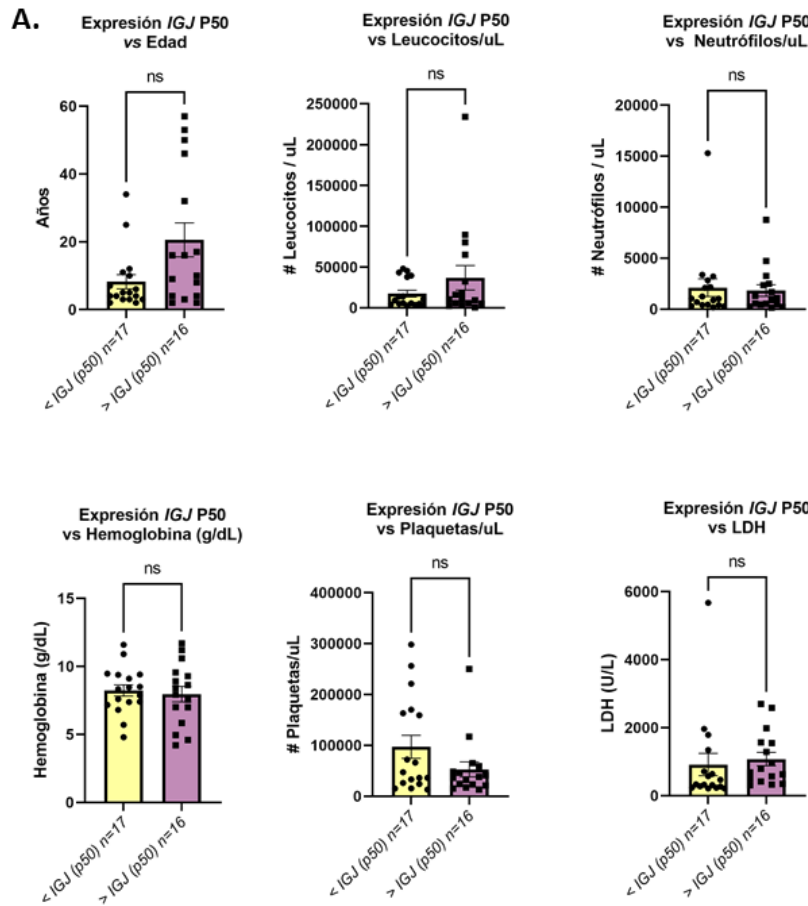
D. Expresión génica de *ID3* percentil 50 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.



E. Expresión génica de *IGJ* percentil 25 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.



F. Expresión génica de *IGJ* percentil 50 en relación con las variables clínicas, SLE y SG de la LLA-B.



Apéndice J. Consideraciones éticas y normatividad.

Principios éticos. Este proyecto involucró la investigación en muestras de pacientes humanos con Leucemia Aguda. Por lo anterior, en el presente documento se consignan los procedimientos que garantizarán los principios éticos en la investigación.

Beneficencia: Se aplicó el principio de beneficencia, ya que, este estudio representó un beneficio para la población, sin presentar un riesgo mayor para ella; y se logró describir el comportamiento metabólico relacionado con variables biológicas y clínicas de la enfermedad de impacto pronóstico. Lo encontrado en el presente estudio descriptivo, podría impactar a largo plazo en la salud de los pacientes con leucemia en población colombiana porque brindaría información relevante para la toma de decisiones en el tratamiento a seguir.

Los pacientes que voluntariamente aceptaron participar en el estudio no recibieron ningún procedimiento adicional a los que de manera habitual se requieren para el diagnóstico de su enfermedad. Por esta razón, se aclaró que la muestra utilizada para este trabajo fue una alícuota de la muestra tomada inicialmente para realizar el diagnóstico del paciente.

Respeto a las personas: Los pacientes decidieron de manera autónoma acerca de su participación en el estudio y así mismo, se protegieron los derechos de autonomía de los menores de edad. La población pediátrica participante en el estudio leyó el asentimiento informado donde se le suministró la información correspondiente a las actividades que se realizaron con su muestra, los riesgos y consecuencias de su participación, así como el beneficio de esta. De esta manera, los pacientes menores de edad consultaron su decisión con familiares, amigos y personas de confianza para decidir su deseo de donar su muestra o no. El consentimiento informado autorizó la participación en la investigación con pleno conocimiento de la realización del estudio y de los

riesgos a los que se sometieron en decisión libre de su participación o no. Así mismo, prevaleció el criterio del respeto a la dignidad y la protección de los derechos y bienestar de todos los participantes contemplado en el artículo 5 de la Resolución 8430 del Ministerio de Salud de Colombia. Adicionalmente, la participación fue completamente voluntaria y se garantizó que el paciente tuviera plena libertad de hacer o no parte de este estudio, así como libertad de abandonar el estudio en cualquier momento que lo desee.

Justicia: El paciente que voluntariamente aceptó participar, no recibió ningún beneficio económico por su participación en esta investigación ni recibió un tratamiento o alguna intervención terapéutica diferente a lo establecido por su centro tratante para el manejo de la enfermedad en pacientes con leucemia aguda. El conocimiento descrito en esta investigación puede permitir a los médicos y científicos en un futuro desarrollar formas de diagnóstico, tratamiento y seguimiento más efectivas para esta enfermedad. Esto podrá beneficiar, a futuro, a otros pacientes colombianos de la misma manera independiente de su sexo, edad o estrato social. Por lo tanto, se incluyeron todos los pacientes que cumplen con los criterios de inclusión y de exclusión que aceptaron entrar al estudio.

Tratamiento de datos personales. Es de tener en cuenta lo reglamentado a nivel nacional en la ley estatutaria 1581 de 2012, el decreto 1377 de 2013 y la resolución de rectoría de la UIS No. 1227 de 2013 sobre el tratamiento de datos personales, los cuales tienen por objeto la protección de datos personales en Colombia, las muestras que se tomaron para los análisis requeridos en el estudio fueron identificadas con un número asignado completamente al azar de manera que no se pueda identificar quién es el dueño de cada muestra. Con ese mismo código se identificó al paciente dentro de la base de datos donde se depositó la información correspondiente a su enfermedad y desenlace clínico. Esta información fue y será de conocimiento exclusivo del

investigador principal y de los miembros del equipo de investigación que él mismo designó. A las muestras no se les realizó ningún procedimiento adicional de los análisis explicados en la metodología del presente proyecto.

Únicamente el investigador principal, las personas del equipo de estudio designadas por el mismo y las personas asignadas por la Universidad para verificar que los datos registrados son verídicos tendrán acceso al archivo donde están estos datos. Este archivo estará bajo custodia del investigador principal y reposará en la Universidad Industrial de Santander en un sitio seguro.

De acuerdo con lo anterior, dentro del consentimiento y asentimiento informado se le explicó al paciente acerca de la confidencialidad de los datos y quienes podrán acceder a dicha información. El párrafo está redactado según lo plasmado en el título II capítulo I artículo 15 de la resolución 8430: “La seguridad que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad”.

Adicionalmente, con respecto a la confidencialidad, la identidad de los individuos participantes en el estudio se mantuvo en reserva y su identificación en las bases de datos fue codificada. Para garantizar la confidencialidad de los datos, en el momento de la inclusión de los pacientes al estudio se les asignó un código compuesto por un número y tres iniciales correspondientes al primer nombre y los dos apellidos. Tanto los formatos de recolección de datos como las muestras generadas de cada uno de los pacientes fueron marcados con la codificación mencionada anteriormente. Los datos obtenidos fueron manejados con absoluta confidencialidad y fueron archivados bajo llave de manera que solo puedan ser conocidos por el Investigador principal y el coordinador del estudio. Adicionalmente, cada una de las personas que hagan parte del equipo de investigación firmó el formato de acuerdo de confidencialidad.

Clasificación del riesgo de la investigación. Todos los pacientes con sospecha de leucemia aguda requieren para su diagnóstico la realización del procedimiento conocido como aspirado y biopsia de médula ósea. En este procedimiento se tomaron las muestras para realizar las pruebas necesarias para una adecuada clasificación de la enfermedad lo que permite planear un tratamiento adecuado. Igualmente, después del tratamiento de inducción se toma otra muestra de médula ósea para determinar la respuesta al tratamiento y definir su conducción final de tratamiento.

Para el desarrollo del objetivo 1, se obtuvieron las muestras a través del proyecto 8746 "Evaluación de los mecanismos de resistencia tumoral relacionados con la firma de expresión génica de mal pronóstico ID1/ID3/IGJ y su efecto en la plasticidad metabólica de leucemia linfoblástica aguda" dirigido por la Dr. José Arturo Gutiérrez Triana, dicho proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI). Para lo cual, se recogió la muestra sobrante luego de realizar los análisis de diagnóstico de los pacientes que voluntariamente aceptaron participar. Por lo anterior, y de acuerdo con lo estipulado en la Resolución 8430, Artículo 11, Numeral B, el estudio representó un riesgo mínimo, ya que incluyó un componente prospectivo que empleó el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en la recolección de una muestra biológica.

Normatividad nacional e internacional específica relacionada con los aspectos éticos que apliquen al proyecto. La realización del presente trabajo siguió 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. De acuerdo con esta resolución, en el artículo 11 éste trabajo se

considera con riesgo mínimo, puesto que es un estudio que incluyó un componente prospectivo el cual empleó muestras de médula ósea.

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

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

Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos. Elaboradas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), Ginebra, 2016.

Resolución 3492 de 1998, Resolución 2935 de 2001 del Instituto Colombiano Agropecuario, Decisión 391 de la Comunidad Andina de Naciones. Decreto 309 del 2000 del Ministerio de Medio Ambiente.

Buenas prácticas de laboratorio (BPL).

Procedimientos específicos para abordar a los participantes.

Para el análisis prospectivo, en el consentimiento y asentimiento informado entregado al paciente bajo el proyecto 8746 "Evaluación de los mecanismos de resistencia tumoral relacionados con la firma de expresión génica de mal pronóstico ID1/ID3/IGJ y su efecto en la plasticidad metabólica de leucemia linfoblástica aguda", liderado por la Dr. Gutiérrez, se especificó que el paciente debe tomarse el tiempo suficiente para decidir si participa o no en el estudio. Se le recomendó leer cuidadosamente el formato y que formulará las preguntas necesarias al respecto.

Así mismo, se hace la claridad que la participación fue completamente voluntaria y que estuvo en plena libertad de hacer o no parte de este estudio, así como en libertad de abandonar el estudio en cualquier momento. Adicionalmente, la persona encargada de impartir el consentimiento transmitió la información verbalmente a cada uno de los pacientes.

Beneficios que genera este proyecto y beneficios directos potenciales del mismo. El paciente que voluntariamente aceptó participar no recibió ningún beneficio económico por su participación en esta investigación. Al participar en el mismo, tuvo la posibilidad de colaborar con la investigación en esta área, dirigida a pacientes colombianos con leucemias agudas. El conocimiento que se generó está investigación, en un futuro permitirá a los médicos y científicos desarrollar formas de diagnóstico, tratamiento y seguimiento más efectivas para esta enfermedad. Esto podrá beneficiar, a futuro, a otros pacientes con esta misma enfermedad. Finalmente, los resultados serán socializados con los especialistas tratantes.

Riesgo del proyecto para los participantes. Durante la participación de los pacientes en el estudio no se realizaron procedimientos adicionales a los que de manera habitual se requieren para el diagnóstico de su enfermedad. Para la realización del procedimiento de aspirado y biopsia de médula ósea el paciente debió firmar el consentimiento informado de su centro tratante para tal fin. Los riesgos principales relacionados con este procedimiento son que se presente dolor durante el mismo, riesgo de sangrado y riesgo de infección local. Dado que la muestra requerida para este estudio es el material sobrante de la muestra tomada para su diagnóstico y no se requiere tomar ninguna muestra adicional, no se espera ningún riesgo adicional a los que son esperados para el mismo.

Riesgo del proyecto para los investigadores y el equipo de investigación. El trabajo en el laboratorio de investigación puede presentar una serie de riesgos relacionados con la

manipulación de muestras biológicas, sustancias químicas tóxicas y residuos de riesgo biológico. Por lo anterior, en el presente proyecto se implementarán las normas de buenas prácticas clínicas en el laboratorio relacionados con:

- 1) Hábitos personales como no comer, beber, fumar, ni aplicar cosméticos en el laboratorio y uso de gafas de seguridad.
- 2) Manipulación de reactivos químicos y muestras biológicas: conocimiento de sus posibles riesgos y procedimientos seguros antes de su manipulación, adoptar las precauciones que se deben tener en cuenta en cada caso para su manipulación, uso de bata, gorro, guantes y tapabocas.
- 3) Correcto etiquetado de envases.
- 4) Almacenamiento de reactivos inflamables y se asegurará siempre la separación de productos en función de sus compatibilidades químicas.
- 5) Correcta disposición de residuos tóxicos y biológicos.

Según el artículo 63 de la Resolución 8430 del Ministerio de Salud, se tuvo en cuenta todas las normas de bioseguridad para investigación con microorganismos patógenos. Para esto se cuenta con las instalaciones necesarias para el procesamiento de muestras biológicas en el laboratorio central de investigaciones de la Fundación Cardiovascular de Colombia. También se tomaron todas las precauciones pertinentes para disminuir el riesgo en el investigador y se utilizó los elementos de protección personal y los protocolos establecidos en los procedimientos.

Normas y pólizas de riesgo. Como no se realizaron procedimientos adicionales a los que se requiere para el diagnóstico de la enfermedad, no se espera ningún daño por la participación en este estudio.

Permisos. En el presente proyecto incluyó muestras de médula ósea de pacientes pediátricos y adultos con diagnóstico confirmado de LLA-B que asistieron a la consulta de hematología en el Hospital Internacional de Colombia (HIC), el Hospital Universitario de Santander (HUS), y la Clínica San Luis, que aceptaron voluntariamente participar en el estudio mediante la aprobación del consentimiento informado aprobado por los comités de ética de las instituciones. El reclutamiento de pacientes al estudio se realizó con la colaboración de los Hemato-Oncólogos de los respectivos centros tratantes.

Los permisos respectivos por parte de los comités de ética de cada institución y el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI) se encuentran aprobados. Es de tener en cuenta que el proyecto fue favorecido para financiación por Colciencias dentro de la convocatoria 807 de 2018. El proyecto fue sometido para aval de todos los centros participantes con el fin de tener visto bueno para iniciar el reclutamiento de pacientes y demás actividades metodológicas necesarias para llevar a cabo el cumplimiento de los objetivos propuestos.

Permiso para uso de muestras. Según los principios éticos del código de Nuremberg para uso de muestras de seres humanos vivos, en el presente estudio se impartió un consentimiento informado voluntario a cada paciente, se evitó el sufrimiento, se evitó la muerte intencional o discapacidad de estos, se protegió a los sujetos del dolor, los sujetos tuvieron libertad de abandonar el estudio en el momento que deseen y los investigadores tuvieron la posibilidad de detener el estudio si llegase a ocurrir algún daño a los sujetos. Así mismo, se siguieron las indicaciones incluidas en la Declaración de Helsinki relacionadas con la investigación de material humano. Una vez cumplidos estos criterios y los demás requisitos propios de las instituciones participantes, fueron depositados de manera clara en los formatos de consentimiento informado y en el

documento del proyecto y se sometieron a revisión y aprobación de todos los comités de ética de los centros participantes, con el fin de obtener la autorización para la selección de pacientes a incluir, así como para el impartimiento de consentimiento informado y uso de las muestras biológicas.

Consentimiento y asentimiento informado. Para el desarrollo del objetivo 1, se siguieron las instrucciones de la Resolución 8430 del Ministerio de Salud y Protección social acerca de la exigencia del consentimiento informado, el proyecto 8746 "Evaluación de los mecanismos de resistencia tumoral relacionados con la firma de expresión génica de mal pronóstico ID1/ID3/IGJ y su efecto en la plasticidad metabólica de leucemia linfoblástica aguda" al cuál se encuentra anidado este estudio, se realizó el consentimiento informado para pacientes mayores de edad y adicionalmente el asentimiento informado para pacientes menores de edad y para sus papás o representantes legales que deseen participar en el estudio. En el documento de consentimiento y/o asentimiento se incluye de manera breve y clara la justificación y los objetivos del estudio, los procedimientos que se realizarán con la muestra del paciente y su propósito, las molestias o los riesgos esperados, los beneficios que puedan obtenerse, así como la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, incomodidades, molestias, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto. Adicionalmente se aclaró en el documento que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad.

Para el desarrollo de los objetivos 2 y 3, que requirió la consulta de las historias clínicas, el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993, dispone que la investigación sin riesgo corresponde a “estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables

biológicas, fisiológicas, sociológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio”. Por lo tanto, el análisis retrospectivo es una investigación sin riesgo, la resolución 8430 de 1993 indica en el párrafo primero del artículo 16 que “tratándose de investigaciones sin riesgo, el comité de ética podrá dispensar al investigador de la obtención del consentimiento informado”.

Adicionalmente, las pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos elaboradas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la pauta 11 hacen la siguiente consideración acerca de la autorización para investigaciones con materiales almacenados cuando la investigación representa un riesgo no mayor del riesgo mínimo: “Cuando los materiales y datos biológicos, almacenados en el pasado sin consentimiento informado específico o amplio contengan datos importantes que no puedan obtenerse de otra forma, un comité de ética de la investigación debe decidir si se justifica su uso. La justificación más común para usar datos o materiales recolectados en el pasado sin consentimiento es que sería inviable o prohibitivamente costoso ubicar a las personas cuyos materiales o datos se examinarán”.

Impacto ambiental. La Universidad Industrial de Santander tiene debidamente protocolizado el programa de gestión general de residuos que incluye residuos biológicos y químicos generados en la metodología de este estudio, el laboratorio central de investigaciones de la Facultad de Salud, así mismo el Laboratorio de Investigaciones de la Fundación Cardiovascular de Colombia. Por tanto, no se contempla algún efecto adverso sobre el medio ambiente. Los procedimientos de tratamiento de desechos acogen las normas generales de los aspectos ambientales y de salud ocupacional de la Universidad Industrial de Santander: <http://www.uis.edu.co/webUIS/es/gestionAmbiental/documentos/programasAmbientales/Gestion%20Integral%20de%20Residuos.pdf>.

Apéndice K. Protocolo para el procesamiento de muestras de médula ósea de pacientes con LLA-B.

PARTE I: Tinción de Wright

1. Marcar un tubo eppendorff con el código del paciente.
2. Tomar 50ul de muestra de médula ósea del paciente, dentro de la cabina de flujo laminar.
3. Trasladar la alícuota a la zona de tinciones.
4. Marcar la lámina con el código de la muestra y con Dx/15/33 según corresponda (Realizar dos láminas por paciente).
5. Tomar 5ul de la alícuota inicial y ponerlo sobre una lámina desengrasa y limpia.
6. Inmediatamente tomar una lámina extensora y colocarla por la parte anterior de la gota formando un ángulo de 45 grados. Esperar a que toda la muestra se distribuya por capilaridad en el borde de la lámina extensora.
7. Deslizar la lámina extensora suavemente sobre el portaobjetos en sentido longitudinal.
8. Dejar secar el frotis a temperatura ambiente.
9. Colocar las láminas sobre gradilla de tinción adecuada.
10. Cubrir la lámina con 1 o 3 ml de colorante de Wright durante 1 minuto.
11. Agregar Buffer (pH 7.0) y soplar para homogenizar hasta obtener un brillo verde metálico (Espejo).
12. Dejar actuar 8 minutos.
13. Lavar con agua corriente, dejar secar a temperatura ambiente.
14. Enfocar en el microscopio con el objetivo de 5x.

15. Agregar una gota de aceite de inmersión.
16. Enfocar con el objetivo de 100x.
17. Observar la lámina y determinar si hay presencia de blastos. (Características de los blastos: Cromatina laxa, células grandes, núcleo grande, citoplasma basófilo, presencia de nucléolos)

PARTE II: Separación de los PBMCs por Ficoll

1. Determinar el volumen de la muestra. (Realizar los cálculos respectivos y marcar los tubos con el código del paciente).
2. Realizar dilución 1:1 de la muestra con PBS 1x (Previamente atemperado a temperatura ambiente) (En un falcon de 15ml). Nota: Mezclar muy bien y suavemente la muestra con pipeta Pasteur. En caso de que haya coágulos tratar de desprenderlos suavemente al mezclar. Muestra _____ml PBS 1x _____ ml.
3. Calcular los tubos y el volumen de Ficoll a utilizar (IMPORTANTE: El Ficoll debe estar a temperatura ambiente) (En falcon de 15ml).

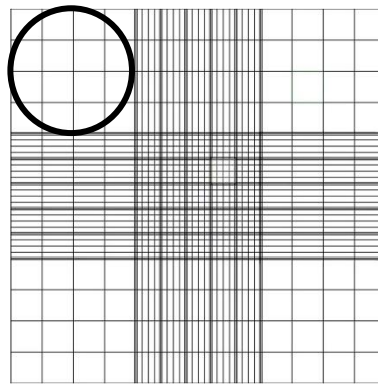
1,5 mL de muestra diluida → 1 mL de Ficoll

_____ mL → X

X = _____

4. Servir lentamente la muestra diluida en el Ficoll. (Despacio para no romper el gradiente de densidad del Ficoll. A medida que se hace se debe ir enderezando el tubo).
5. Centrifugar 20 minutos a 20°C a 400 gravedades o a 2000 RPM. (Aceleración: 7 Desaceleración: 3).
6. Recoger la nube y pasarlo a otro falcon de 15ml.
7. Resuspender hasta 10ml de PBS 1x. Mezclar bien para lavar.

8. Centrifugar durante 8 minutos a 1500 RPM a 20°C. (Aceleración: 7 Desaceleración:7).
9. Descartar sobrenadante.
10. Resuspender en 1ml de PBS 1x.
11. Realizar conteo celular en Cámara de Neubauer para determinar la viabilidad. Para lo cual:
12. Se mezcla 20 ul de solución de células en buffer Miltenyi con 20ul de azul de tripano.
13. Contar las células vivas y muertas de un solo cuadrante.



Calcular el % de Viabilidad:

$$\% Viabilidad = \frac{\# Células Vivas}{\# Células Totales} \times 100$$

$$\% Viabilidad = \frac{\quad}{\quad} \times 100 =$$

Nota 1: Este paso es importante para determinar la cantidad inicial de células que hay para la separación celular por el marcador específico.

Nota 2: Se deben contar hasta 150 células por cuadrante, en caso de ser mayor el número contado, se debe realizar dilución.

Nota 3: En caso de requerir dilución 1:10, se diluyen 10 ul de la solución de células en 90 ul de buffer Miltenyi. Y luego si se mezcla 20ul de las células con 20ul de azul de tripano.

$$\# \text{Células en mL} = \frac{\sum C1 + C2 + C3 + C4}{\# \text{ de cuadrantes contados}} \times 2 \times 10 \times 10000$$

$$\# \text{Células/mL} = \frac{\quad}{\quad} \times \quad \times \quad \times 10000 =$$

$$\# \text{Células totales} = \frac{\# \text{Células}}{\text{ml}} \times \text{Volémen Total (ml)} |$$

$$\# \text{Células totales} = \quad \times \quad$$

PARTE III: Separación de la población celular CD34

Nota: Los volúmenes que se referencia en el protocolo es para un etiquetado magnético de hasta 100'000'000 de células CD19+. Sin embargo, la columna tiene la capacidad de procesar hasta de 200'000'000 de células totales y 10'000.000 de células etiquetadas.

Fijación de las perlas magnéticas a las células:

1. Tomar las células del paso 10 de la separación de MNN por Ficoll y centrifugar la suspensión celular a 1500 rpm durante 8 minutos.
2. Aspirar el sobrenadante por completo.
3. Resuspender el pellet en 300ul de Buffer Miltenyi y mezclar muy bien-
4. Agregar 50ul de reactivo de bloqueo FcR para un total de 10⁸ (100.000.000) células en total y mezclar muy bien.

5. Agregar 50ul de MicroBeads CD34 para un total hasta de 10^8 (100.000.000) células y mezclar muy bien.
6. Mezclar muy bien con micropipeta en incubar durante 30 minutos en el refrigerador (2-8°C). Mezclar cada 10 min (No por inmersión, sino por movimientos de un lado a otro suavemente). En total se debe mezclar tres veces.
7. Agregar 8ml de Buffer Miltenyi hasta para 10^8 células. Centrifugar a 300g o 1500 rpm durante 8 minutos. Aspirar el sobrenadante por completo. (Mientras se realiza esta centrifugación, realizar los pasos 1 y 2 de la separación magnética)
8. Resuspender las células en 2ml de buffer Miltenyi.

Separación magnética por columnas MS:

9. Colocar la columna en el campo magnético del separador MACS.
10. Preparar la columna enjuagando con 500ul de Buffer Miltenyi.
11. Aplicar suspensión celular sobre la columna en dos momentos. Para lo cual se debe pasar primero 1ml y luego el otro ml. (Este paso, se recoge las células no marcadas con CD34) (Para este paso se debe utilizar un falcon de 15ml).
12. Lavar con 500ul de Buffer Miltenyi la columna. Repetir este paso tres veces. (Este momento tengo en el falcon de 15ml la suspensión de células no marcadas y el buffer Miltenyi de lavado). Se debe esperar a que la columna se vacíe, entre lavado y lavado.
13. Retire la columna del separador (Magneto).
14. Adaptar la columna sobre un falcon nuevo de 15ml.
15. Agregar 1ml de buffer Miltenyi a la columna. Lave las células marcadas empujando firmemente el émbolo hacia la columna. Repetir este paso dos veces.

Separación de la población celular CD19

Fijación de las perlas magnéticas a las células:

Nota: Los volúmenes que se referencia en el protocolo es para un etiquetado magnético de hasta 10'000'000 de células CD19+. Sin embargo, la columna tiene la capacidad de procesar hasta de 200'000'000 de células totales y 10'000.000 de células etiquetadas. Los volúmenes relacionados a continuación corresponden para 20'000'000 de células mononucleares.

1. Tomar las células 20 millones de células MNC del paso 10. El volumen dónde se encuentran los 20'000.000 de MNCs, se calcula de la siguiente forma:

Células Mononucleares → Volumen en el cual se encuentran (ul o ml)

20'000'000 MNC → X

2. Centrifugar la suspensión celular a 1500 rpm durante 8 minutos.
3. Aspirar el sobrenadante por completo.
4. Resuspender el pellet en 160ul de Buffer Miltenyi y mezclar muy bien.
5. Agregar 40ul de MicroBeads CD19 para un total hasta de 10^8 (20.000.000) células y mezclar muy bien.
6. Mezclar muy bien con micropipeta en incubar durante 15 minutos en el refrigerador (2-8°C). Mezclar cada 5 min (No por inmersión, sino por movimientos de un lado a otro suavemente). En total se debe mezclar tres veces.
7. Agregar 4ml de Buffer Miltenyi hasta para 10^7 células.
8. Centrifugar a 1500 rpm durante 8 minutos. Aspirar el sobrenadante por completo. (Mientras se realiza esta centrifugación, realizar los pasos 1 y 2 de la separación magnética).
9. Resuspender las células en 2ml de buffer Miltenyi.

Separación magnética por columnas MS:

10. Colocar la columna en el campo magnético del separador MACS.
11. Preparar la columna enjuagando con 500ul de Buffer Miltenyi.
12. Aplicar suspensión celular sobre la columna en dos momentos. Para lo cual se debe pasar primero 1ml y luego el otro ml. (Este paso, se recoge las células no marcadas con CD19) (Para este paso se debe utilizar un falcon de 15ml).
13. Lavar con 500ul de Buffer Miltenyi la columna. Repetir este paso tres veces. (Este momento tengo en el falcon de 15ml la suspensión de células no marcadas y el buffer Miltenyi de lavado). Se debe esperar a que la columna se vacíe, entre lavado y lavado.
14. Retirar la columna del separador (Magneto).
15. Adaptar la columna sobre un falcon nuevo de 15ml.
16. Agregar 1ml de buffer Miltenyi a la columna. Lave las células marcadas empujando firmemente el émbolo hacia la columna. Repetir este paso dos veces. (Tomar las alícuotas para realizar el conteo en Cámara de Neubauer).
17. Centrifugar a 1500 RPM por 8 minutos y descartar el sobrenadante.
18. Resuspender en 3 ml de RPMI y mezclar muy bien.
19. Centrifugar nuevamente a 1500 RPM por 8 min y descartar el sobrenadante.
Resuspender en 1 ml de RPMI.