

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Actividad pro-apoptótica e inmunorregulatoria de la
Fludarabina**

**Tesis para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

Autora: Paula Ximena Fernández Calotti

Directora de Tesis: Dra. Mirta Giordano

Laboratorio de Inmunología Oncológica
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Medicina
Buenos Aires

Buenos Aires, 2006.

Agradecimientos

Esta Tesis fue realizada con el apoyo y colaboración de muchas personas a quienes quiero agradecer:

- En primer lugar un especial agradecimiento a mi directora de tesis, Mirta, por el apoyo que me brindaste, por todo lo que me enseñaste con tanto esmero en estos años de trabajo juntas. Por la transmisión de tus conocimientos, por tu insuperable dedicación y seguimiento de mi trabajo cotidiano y en la escritura de esta Tesis. Porque a tu lado confirmé lo mucho que amo la ciencia y porque crecí ¡Gracias Mir!
- A Jorge, por tu excelente predisposición a toda hora y porque para mí sos un ejemplo de persona y de investigador.
- A Moni, porque sos una persona incondicional, por tu constante ayuda y compañerismo todos estos años ¡Gracias por tu cariño Moni!
- A Karu, por tu amistad y por la buena energía que me das siempre!
- A Romi, por enseñarme con paciencia y por responder todas mis preguntas. Gracias por estar a mi lado tantas veces.
- A Lauri, Jere, Cristian y Mercedes por hacer muy amenos los seminarios semanales del grupo LLC-B y porque son lo más chicos!
- A mis amigos Euge, Gaby, Diego, Martita, Juan, que hacen que cada día sea tan único y divertido, y porque siempre puedo contar con ustedes!
- A Analía, por tu buena voluntad cada vez que necesité tus consejos y ayuda.
- A Carlos Galmarini, por enseñarme un mundo nuevo, por compartir conmigo tus conocimientos y, fundamentalmente, por valorarme y confiar en mí. ¡Gracias Carlos!
- A Mónica Costas, por abrirme las puertas al mundo molecular...y a tu laboratorio, durante tanto tiempo! Por ayudarme y contestar mis miles de preguntas diarias.
- A Selma, Evelina, Fede y Fernanda por su colaboración, voluntad y buena onda que hacen que el ambiente de trabajo sea cálido y divertido.

- A mis amigas y amigos de mi Patagonia querida y de la vida por su apoyo y amor. Por las horas de risas y diversión que siempre me llenan de fuerzas y ganas de seguir adelante.
- A mi familia, por su apoyo constante. Por valorarme y amarme tanto. Porque siempre me alentaron en todas mis decisiones y aquí estoy gracias a ustedes!! Los amo.
- A Fran, porque sos mi compañero de vida. Por tu infinita comprensión y por soportar mis horas de escritura, lectura y silencio durante esta Tesis. Por tu inmensa generosidad y compañerismo. Por todo el amor que me das.

A la vida y a Fran,

INDICE

• Resumen	1
• Abstract	3
• Introducción	5
1. Análogos de nucleósidos (AN).....	5
a) Características generales	5
b) Transportadores de nucleósidos y AN	6
c) Metabolismo de nucleósidos y AN	8
2. Fludarabina (Flu).....	11
a) Características generales	11
b) Transporte y metabolismo de Flu	12
c) Actividad citotóxica de Flu	13
d) Mecanismos de resistencia a Flu	15
3. Apoptosis.....	16
a) Características generales	17
b) La familia Bcl-2 y la apoptosis.....	19
c) La familia de quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la apoptosis.....	20
4. Leucemia linfática crónica de células B (LLC-B).....	23
a) Generalidades	23
b) Microambiente y LLC-B.....	25
c) Subpoblaciones leucocitarias en LLC-B	28
d) Tratamiento de la LLC-B	29
• Objetivos	32
• Materiales y Métodos	33
1. Soluciones, medios de cultivo, reactivos	33
a) Tampón fosfato salino	33
b) Solución de Ficoll-Triyosom	33

c) Solución de Percoll	33
d) Solución de Dextrán	33
e) Solución de Turk para el recuento de células	33
f) Medio de cultivo	33
g) Fludarabina	34
h) Inhibidores	34
i) Citoquinas	34
j) Reactivos para la evaluación de apoptosis	34
k) Anticuerpos	34
2. Obtención de las muestras de leucocitos periféricos	35
3. Obtención de células mononucleares totales	36
4. Obtención de monocitos	36
5. Obtención de granulocitos neutrófilos y eosinófilos	37
6. Obtención de linfocitos	37
7. Obtención de células dendríticas	37
8. Línea celular U937	38
9. Cultivos celulares	38
a) Cultivos en presencia de Flu	38
b) Cultivos en presencia de inhibidores	39
10. Evaluación de la apoptosis celular por microscopía de fluorescencia ..	39
11. Evaluación de la apoptosis celular por cuantificación de núcleos hipodiploides	39
12. Evaluación de la apoptosis celular mediante Anexina-V FITC	40
13. Evaluación de la expresión de antígenos de membrana por citometría de flujo	40
14. PCR Cuantitativa en tiempo real	41
15. Western-blot	42
16. Determinación de la secreción de IL-8	43
17. Evaluación de la activación del factor de transcripción AP-1	43
18. Análisis estadísticos de los datos	44
• Resultados	45
1. Sensibilidad de las poblaciones leucocitarias de sangre periférica a la inducción de apoptosis por Flu	45

a) Sensibilidad de los monocitos a Flu	45
b) Sensibilidad de los granulocitos neutrófilos a Flu.....	49
c) Sensibilidad de los granulocitos eosinófilos a Flu.....	51
d) Sensibilidad de los linfocitos a Flu.....	53
e) Sensibilidad de las células dendríticas a Flu.....	57
2. Susceptibilidad diferencial de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ a Flu	59
a) Sensibilidad de las subpoblaciones T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ a Flu	59
b) Sensibilidad de las subpoblaciones T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ a Flu en pacientes LLC-B	63
c) Expresión de hENT1, dCK y cN-II en las subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de dadores sanos.....	67
3. Actividad pro-inflamatoria de Flu en células monocíticas humanas.....	69
a) Flu induce la apoptosis de las células U937.....	69
b) Flu induce la activación/diferenciación de las células U937	73
c) Flu debe ingresar a las células U937 a través del transportador hENT1 para inducir apoptosis y diferenciación.....	76
d) La vía de MAPK/ERK está involucrada en la activación/diferenciación de células U937 inducida por Flu	78
e) Flu induce la fosforilación de ERK en las células U937.....	81
f) La activación/diferenciación de células U937 inducida por Flu es independiente de la vía de NF-κB.....	82
g) La activación/diferenciación de células U937 inducida por Flu depende, en parte, de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno.....	85
h) Flu induce la activación de AP-1 en células U937.....	86

- **Discusión**.....89
- **Referencias**.....101
- **Publicaciones a las que dió lugar el Trabajo de Tesis**.....118

Abreviaturas

AHA	anemia hemolítica autoinmune
AcMo	anticuerpo monoclonal
ADA	adenosina deaminasa
ALLN	N-acetyl-leucinyI-leucinyI-norleucina
AN	análogo de nucleósido
CDA	citidina deaminasa
CDs	células dendríticas
CMT	células mononucleares totales
CNT	transportador de nucleósidos concentrativo
dATP	deoxiadenosina trifosfato
dCK	deoxicitidina quinasa
DCMP	deoxicitidilato deaminasa
dGK	deoxiguanosina quinasa
dNTP	deoxirribonucleótidos trifosfatos
EMSA	ensayo de movilidad electroforética
ENT	transportador de nucleósidos equilibrativo
F-ara-A	fludarabina desfosforilada
Flu	fludarabina
GM-CSF	factor estimulador de colonias granulocitos y macrófagos
IP	ioduro de propidio
IRO	intermediario reactivo del oxígeno
IFN	interferón
IL	interleuquina
LLC-B	leucemia linfática crónica de células B
LPS	lipopolisacárido
MAPK	quinasas activadas por mitógenos
NAC	N-acetil cisteína
NBTI	nitrobenziltioinosina
5'-NT	5'-nucleotidasa
NDPK	quinasa de nucleósidos di fosfatos

PBS	tampón de fosfato salino
PD	PD98059
PKC	proteína quinasa C
PMA	ácido forbol mirístico
RR	ribonucleótido reductasa
SB	SB203580
SFB	suero fetal bovino
SP	SP600125
SSZ	sulfasalazina
TNF- α	factor de necrosis tumoral- α
TK	timidina quinasa
UK	uridina quinasa

Resumen

La Fludarabina (Flu) es un análogo de adenosina utilizado para el tratamiento de enfermedades linfoproliferativas de bajo grado, en particular la leucemia linfática crónica de células B (LLC-B). La terapia con Flu suele provocar reacciones adversas, siendo las más frecuentes la inmunosupresión que se asocia con complicaciones infecciosas y la aparición de fenómenos autoinmunes. Teniendo en cuenta que se desconoce si las distintas poblaciones leucocitarias circulantes son igualmente sensibles a la acción citotóxica de Flu, el primer objetivo de esta Tesis fue investigar la susceptibilidad de monocitos, granulocitos neutrófilos, eosinófilos, linfocitos B y T, células NK y células dendríticas a la Flu. Los resultados obtenidos demuestran que todas las poblaciones de células mononucleares periféricas son susceptibles a la actividad pro-apoptótica de Flu, mientras que, por el contrario, los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos resultaron ser resistentes.

Dado que el tratamiento de pacientes leucémicos con Flu induce una marcada linfopenia T que afecta particularmente a la subpoblación $CD4^+$, se analizó la susceptibilidad *in vitro* de las poblaciones T $CD4^+$ y $CD8^+$ a la droga. Llamativamente, el cultivo con Flu indujo mayores niveles de apoptosis en los linfocitos T $CD8^+$ que en los $CD4^+$, tanto en dadores normales como en pacientes LLC-B. Para tratar de identificar las causas subyacentes en la distinta susceptibilidad a la Flu de las poblaciones de linfocitos T se analizaron los niveles de expresión de las principales moléculas involucradas en el transporte y metabolismo de Flu. Se encontró que la población T $CD8^+$ presenta una relación quinasa dCK/nucleotidasa cN-II superior a la que presenta la población T $CD4^+$, lo que sugiere que la mayor susceptibilidad de los linfocitos T $CD8^+$ a Flu *in vitro* podría deberse a una acumulación aumentada del metabolito activo de Flu, F-ara-ATP.

En la segunda parte de esta Tesis se investigó si la Flu era capaz de alterar la funcionalidad celular, más allá de su actividad pro-apoptótica. Estos experimentos se llevaron a cabo en la línea monocítica U937. Los resultados obtenidos demuestran que bajas concentraciones de Flu inducen la activación/diferenciación de las células U937, evidenciada en el incremento del tamaño y complejidad celular, como así también en la mayor expresión de ICAM-1 e IL-8. Mediante el empleo de inhibidores específicos se demostró que la inducción de ICAM-1 e IL-8 por Flu depende de la activación de la vía de MAPK/ERK y de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno. Estas evidencias plantean la posibilidad de que algunos efectos secundarios asociados al tratamiento con Flu sean consecuencia de la actividad inmunorregulatoria de Flu y no de su capacidad citotóxica.

Abstract

Fludarabine (Flu) is an adenosine analog employed for the treatment of low grade lymphoproliferative disorders, particularly chronic lymphocytic leukemia of B cells (B-CLL). Flu therapy usually provokes adverse reactions, being immunosuppression which is associated to infectious complications and autoimmune phenomena the most frequently observed. Since it is presently unknown whether the different leukocyte populations in circulation are equally sensitive to the cytotoxic effects of Flu, the first purpose of this Thesis was to analyze the susceptibility of monocytes, neutrophils, eosinophils, B and T lymphocytes, NK cells and dendritic cells to Flu. The results obtained show that all of the mononuclear populations from peripheral blood are susceptible to the cytotoxic effects of Flu, while polymorphonuclear leukocytes neutrophils and eosinophils were found to be resistant.

Taking into account that Flu treatment of leukemic patients induces a strong T lymphopenia that particularly affects the CD4⁺ subset, the *in vitro* susceptibility of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes to Flu was assessed. Unexpectedly, exposure to Flu induced higher levels of apoptosis in CD8⁺ T cells from both, healthy donors and B-CLL patients. In an attempt to identify the subjacent causes responsible for the different susceptibility of T cell subsets to Flu, we analyzed the level expression of the most relevant molecules involved in its transport and metabolism. It was found that CD8⁺ T lymphocytes present a dCK kinase/ nucleotidase cN-II ratio higher than that from CD4⁺ T cells, suggesting that the increased susceptibility of the CD8⁺ subset to Flu *in vitro* could be attributed to an enhanced accumulation of the active metabolite, F-ara-ATP.

The second part of the Thesis was aimed to determine whether Flu, besides its pro-apoptotic effects, was able to modify cell function. These experiments were carried out with the monocytic cell line U937. The results show that low doses of Flu induce the activation/differentiation of U937 cells,

which becomes evident for the increase in size and cellular complexity, as well as for the higher levels of ICAM-1 and IL-8 expression. By employing specific inhibitors, it was shown that the induction of ICAM-1 and IL-8 by Flu depends on the activation of the MAPK/ERK pathway and on the production of reactive oxygen species. Together, these evidences raise the possibility that some of the secondary effects associated to Flu treatment could be the consequence of the immunoregulatory activity of Flu rather than of its cytotoxic activity.

INTRODUCCION

1. Análogos de nucleósidos

1 a) Características generales:

Los análogos de nucleósidos (AN) constituyen una importante clase de agentes quimioterápicos introducidos para el tratamiento de enfermedades hematológicas y, más recientemente, de tumores sólidos. Esta familia de compuestos incluye una gran variedad de nucleósidos derivados de purinas y pirimidinas que actúan como antimetabolitos compitiendo con los nucleósidos fisiológicos e interactuando con un gran número de “blancos” intracelulares para, finalmente, inducir citotoxicidad (1,2).

Los AN mimetizan a los nucleósidos fisiológicos en términos de entrada a la célula y metabolismo. Dado que la mayoría de los AN son moléculas hidrofílicas, requieren transportadores específicos para ingresar a la célula. Una vez dentro de la misma, deben ser activados a través de una serie de pasos metabólicos hasta su derivado trifosfato. Estos derivados activos de los AN pueden ejercer su acción citotóxica al ser incorporados y alterar las macromoléculas de ADN o ARN que están siendo sintetizadas, lo que resulta en la inmediata inhibición de la síntesis y en la terminación de la cadena de ADN o ARN. Por otra parte, algunas de estas drogas inhiben la actividad de enzimas claves involucradas en la generación de nucleótidos (purinas y pirimidinas), favoreciendo de esta manera su propia incorporación al ADN. Finalmente, pueden interferir con enzimas involucradas en la síntesis de ADN, como la ADN polimerasa, o activar directamente la cascada de las caspasas, lo que resulta en la inducción de la apoptosis celular.

En los últimos años se han identificado y caracterizado los principales transportadores y enzimas involucradas en el metabolismo de los nucleósidos. Por otro lado, se han estudiado también los mecanismos moleculares por los

cuales los AN ejercen su actividad anticancerígena (2) ofreciendo, de esta forma, oportunidades de potenciar sus efectos antitumorales.

Como se ha señalado, estos compuestos comparten algunas características generales como el requerimiento de transportadores de membrana específicos, el metabolismo y la interacción con blancos intracelulares. Sin embargo, difieren en cuanto al tipo de transportador que con mayor eficiencia ingresa un compuesto determinado a la célula y en cuanto a la “preferencia” por el sustrato con el que interaccionan. Estas diferencias explicarían por qué algunos AN son más efectivos contra tumores con alta tasa de proliferación y otros contra neoplasias con una evolución más lenta.

1 b) Transportadores de nucleósidos y AN:

Los transportadores de nucleósidos son proteínas integrales de membrana que han sido clasificados según sus características cinéticas. Hasta el momento, se han descrito siete actividades de transporte diferentes, que pueden incluirse dentro de dos grandes categorías:

- **Transportadores de nucleósidos concentrativos (CNT):** se clasifican en función de su especificidad de sustrato. Estos transportadores median la entrada de nucleósidos naturales y AN a las células por un transporte dependiente de sodio (Na^+) con una estequiometría Na^+ /nucleósido de 2:1 para la forma CNT3 y de 1:1 o 1:2 para las otras (Figura 1) (3,4). Se han identificado tres isoformas de transportadores CNT (5-8). Los CNTs humanos son proteínas de 649, 658 y 698 aminoácidos (CNT1, CNT2 y CNT3 respectivamente) que poseen trece posibles dominios transmembrana (8). CNT1 es un transportador de pirimidina, CNT2 transporta preferentemente purinas y el recientemente clonado CNT3 transporta nucleósidos de ambos tipos.

- **Transportadores de nucleósidos equilibrativos (ENT):** facilitan la difusión de los nucleósidos a través de la membrana plasmática, según su gradiente de concentración, equilibrando las concentraciones extracelulares e intracelulares, tanto de los nucleósidos naturales como de los AN. Son independientes de sodio, transportan los nucleósidos de manera bi-direccional (Figura 1) y presentan una amplia especificidad de sustratos, aceptando tanto las purinas como las pirimidinas. Los ENTs son los transportadores de nucleósidos más ampliamente expresados en células o tejidos de mamíferos. Existen al menos cuatro isoformas de ENTs, aunque sólo dos son transportadores de nucleósidos presentes en la membrana plasmática. Se pueden dividir en un grupo sensible a la nitrobenziltioinosina o NBTI (es), que se inhibe con concentraciones del orden nanomolar de NBTI, y otro insensible a NBTI (ei) que se inhibe sólo con concentraciones de NBTI superiores a 1 μ M (5-10). El NBTI es un análogo estructural de la adenosina y la cantidad de moléculas de NBTI que se une a los transportadores es proporcional al grado de inhibición observado, con una estequiometría inhibidor/transportador de 1:1. Los transportadores sensibles a NBTI se denominan ENT1 y los insensibles ENT2. Todos los ENTs poseen once dominios transmembrana y presentan un 50% de identidad de secuencia entre las dos isoformas de membrana plasmática de 450 y 452 aminoácidos, ENT1 y ENT2 respectivamente.

Más recientemente, se han identificado dos nuevas isoformas denominadas ENT3 y ENT4 en tejidos humanos y de ratón (11,12). hENT3, de 475 residuos, presenta una baja homología con hENT1 (29%) en contrapartida con la isoforma murina mENT3 (74%). Tanto hENT3 como mENT3 se caracterizan por presentar una región amino terminal extensa y muy hidrofílica. hENT4, de 530 residuos, presenta una homología del 86% con su ortólogo murino (13). Ambas isoformas presentan una ubicación intracelular, no obstante, y hasta la fecha, se desconocen las características cinéticas y funcionales de estos dos transportadores.

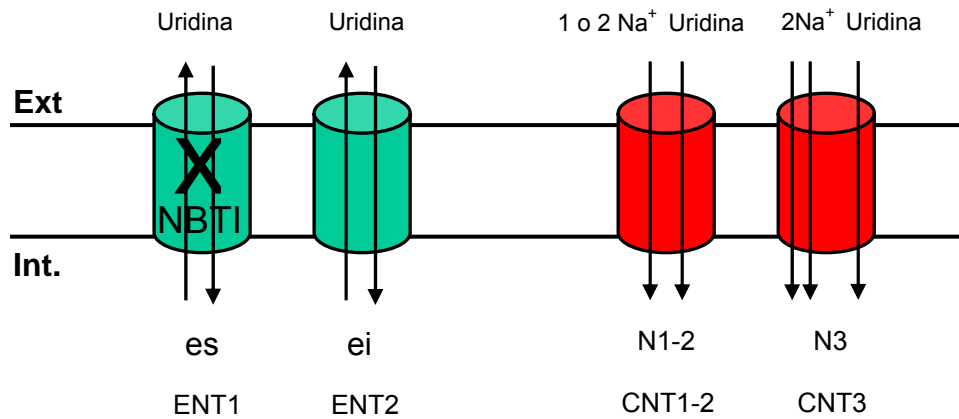


Figura 1: Transportadores de nucleósidos

es y ei: transporte equilibrativo y ENTs sus entidades moleculares
 N: transporte concentrativo Na⁺ dependiente y CNTs sus entidades

1 c) Metabolismo de nucleósidos y AN:

La síntesis y reparación del ADN requiere un continuo y balanceado *pool* de deoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs). Existen dos vías metabólicas que determinan el *pool* de nucleótidos intracelular. La primera vía es la llamada “*de novo*” y se activa en células que están proliferando. Los nucleótidos sintetizados por esta vía se utilizan en la síntesis de ADN. La segunda vía es la “*salvataje*”, que es la vía principal de producción de dNTPs en células en reposo o en G1 del ciclo celular. Los dNTPs sintetizados por esta vía son utilizados preferentemente en la reparación del ADN (14,15). Esta vía involucra el reciclado de nucleósidos producidos por el catabolismo de ácidos nucleicos (16). (Figura 2).

Los nucleósidos extracelulares y los AN que fueron incorporados a la célula por los transportadores de membrana ya mencionados, son luego fosforilados por quinzas específicas para transformarse en nucleósidos monofosfatos. En mamíferos hay seis quinzas descritas para estas vías llamadas deoxicitidina quinasa (dCK), timidina quinasa 1 y 2 (TK1 y TK2),

deoxiguanosina quinasa (dGK) y uridina quinasa 1 y 2 (UCK1 y UCK2). Los nucleósidos o AN monofosfatos son posteriormente fosforilados por quinasas monofosfatos (UMP-CMPK, timidilato quinasa, guanilato quinasa and adenilato quinasa) y finalmente por quinasas de nucleósidos di fosfatos (NDPK) para convertirse en dNTPs o AN trifosfato funcionalmente activos.

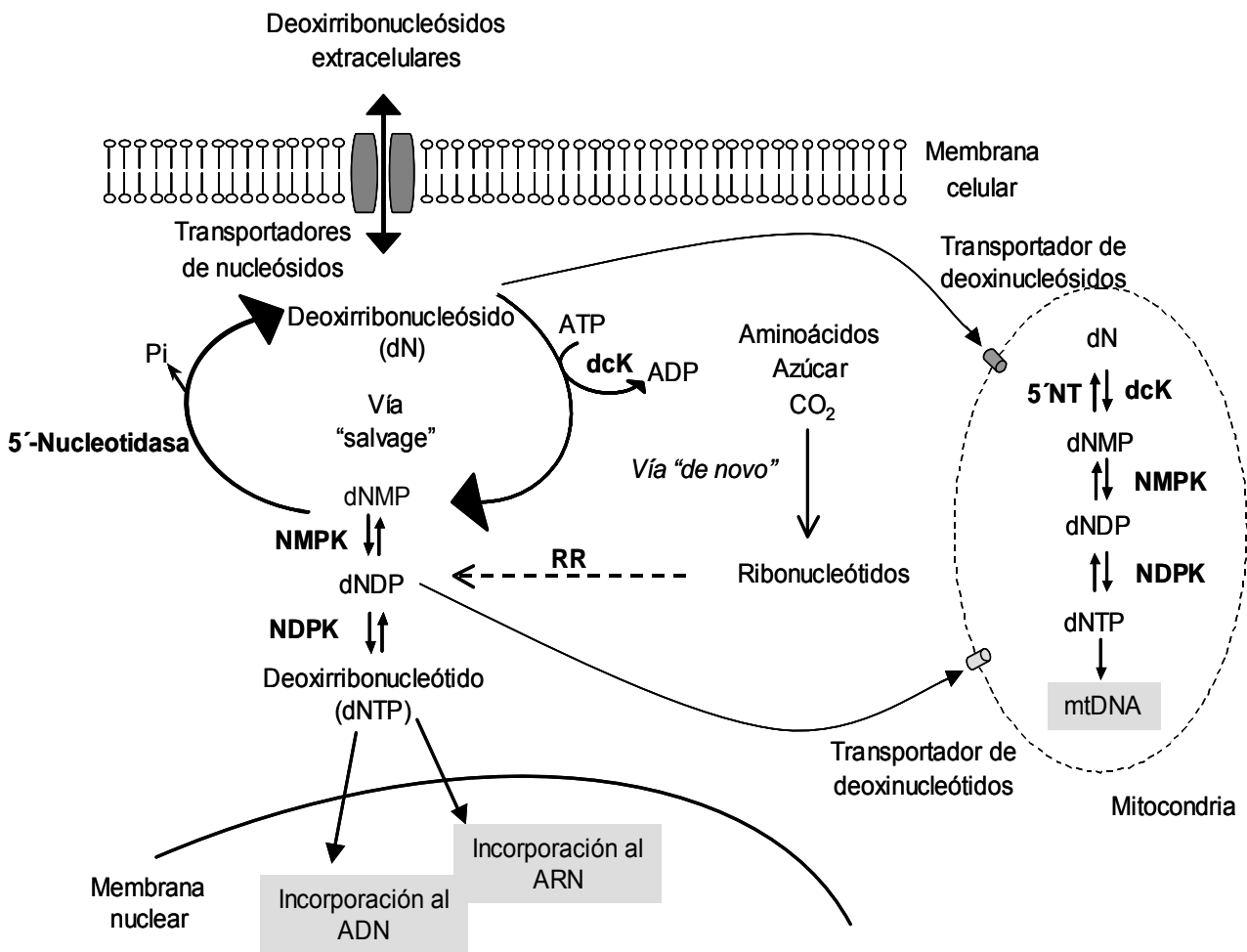


Figura 2: Representación esquemática del metabolismo de nucleósidos.

Los nucleósidos son sintetizados en la vía *de novo* o son incorporados a la célula por transportadores de membrana específicos para la síntesis mediante la vía *salvaje*. En este caso, los nucleósidos son fosforilados por dCK, NMPK y NDPK hasta su derivado trifosforilado. La actividad de la enzima citoplasmática 5'-nucleotidasa se opone a la de dCK, defosforilando los monofosfoderivados. Tanto los deoxirribonucleósidos como los deoxirribonucleósidos difosfatos (dNDP) en el citosol pueden ingresar a la mitocondria a través de transportadores específicos de membrana. Finalmente los deoxirribonucleótidos son incorporados al ADN o ARN que está siendo sintetizado.

Dado que las concentraciones de dNTPs intracelulares deben estar controladas, si el *pool* de dNTPs excede los requerimientos de la célula para la replicación del ADN y su reparación, el excedente es degradado y eliminado de la célula como deoxirribonucleótido (17). Existen dos vías catabólicas principales: la primera es mediada por deaminasas intracelulares como la citidina deaminasa (CDA), adenosina deaminasa (ADA) y deoxicitidilato deaminasa (DCMP-deaminasa). Estas enzimas deaminan deoxirribonucleótidos monofosfatos (MP) o no fosforilados y ciertos AN. Algunos AN han sido sintetizados de forma tal que sean insensibles a la acción de estas deaminasas, impidiendo su degradación y potenciando, de esta forma, su acción. La otra vía catabólica es exclusiva para derivados MP, que son sustratos de la 5'-nucleotidasa. Esta enzima posee un papel opuesto al de las quinasas de nucleósidos, disminuyendo los niveles de deoxinucleósidos o AN fosforilados dentro de la célula. Se han caracterizado varias 5'-NT que se distribuyen en tres clases principales (18):

- 5'-NT unidas a membrana, como CD73.
- 5'-NT citosólicas llamadas cN-I (A y B), cN-II, cN-III y cdN.
- 5'-NT mitocondriales, llamadas mdN.

En resumen, cuando la célula requiere dNTPs, los deoxirribonucleósidos son incorporados a través de transportadores específicos, siendo rápidamente fosforilados e incorporados a los ácidos nucleicos. Estos mecanismos de transporte y fosforilación/defosforilación tan finamente regulados proveen a la célula de un continuo y balanceado *pool* de dNTPs (17). Mimetizando a los nucleósidos fisiológicos, también son incorporados a los ácidos nucleicos los AN pero, en este caso, su incorporación conducirá en última instancia a la muerte de la célula.

2- Fludarabina

2 a) Características generales:

La molécula 9-beta-D-arabinosyl-2-fluoroadenina conocida como fludarabina (Flu) es un análogo sintético y halogenado de adenosina (Ado) (Figura 3) que presenta la característica de ser resistente a la deaminación por la enzima adenosina deaminasa (ADA) (19, 20).

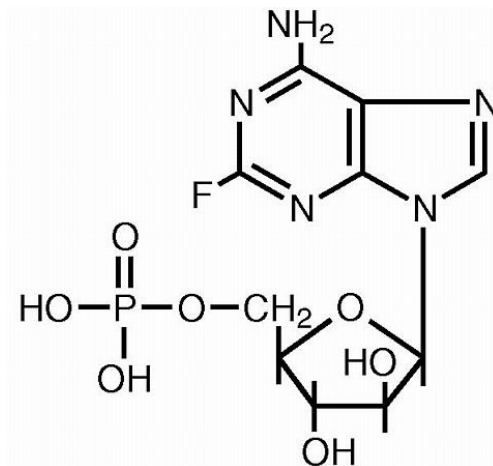


Figura 3: Estructura química de 9-b-D-arabinosyl-2-fluoroadenina (Flu).

Fludarabina es un análogo de deoadenosina que contiene un átomo de flúor en su molécula.

Flu se administra en su forma 59-monofosfato, dado que el grupo fosfato en la posición 59 de la arabinosa le confiere la característica de ser liposoluble. Antes de ingresar a la célula, Flu es rápidamente convertida a su forma defosforilada (F-ara-A) por la actividad de ecto-5'nucleotidasas (CD73) que se encuentran ancladas a la membrana plasmática de diversas poblaciones leucocitarias (1).

Flu es ampliamente utilizada en oncología para el tratamiento de diversas neoplasias hematológicas. Se ha observado que tiene mayor eficacia en algunos trastornos caracterizados por una baja tasa de replicación, como la leucemia linfática crónica y el linfoma folicular (20,21). También se la ha empleado en la terapia de linfomas agresivos y de leucemias agudas y, con menor éxito, en el tratamiento de tumores sólidos (22). Más recientemente Flu se ha incorporado a los esquemas de reducción celular como quimioterapia condicionante para el trasplante de médula ósea, ya que induce un potente efecto inmunosupresor no mieloablativo (23-25). En este sentido, el potencial citotóxico de Flu contra los linfocitos T la tornan particularmente interesante para esquemas de quimioterapia e inmunomodulación en el contexto del trasplante alogénico en leucemia. De hecho Flu se ha transformado en un pilar esencial en los regímenes quimioterápicos combinados para el trasplante de precursores hematopoyéticos no mieloblásticos en pacientes con leucemia, linfoma y otras neoplasias (23-25). Los regímenes preparativos de intensidad reducida (minitransplante) para el trasplante de células pluripotenciales hematopoyéticas son utilizados en pacientes portadores de neoplasias hematológicas para los cuales no resulta apropiado el condicionamiento mieloablativo convencional, sea por su bajo rendimiento, edad avanzada o por presencia de comorbilidades. El esquema propuesto con Flu, en cambio, produce mínima toxicidad y facilita la rápida adaptación de las células del donante, el desarrollo de quimerismo de donante y la generación de efectos “injerto *versus* leucemia” (24).

2 b) Transporte y metabolismo de fludarabina:

El transporte y metabolismo de Flu están basados en el metabolismo de los deoxirribonucleótidos fisiológicos, como se mencionara anteriormente para los demás AN. Existen tres posibles transportadores de nucleósidos que son capaces de mediar la entrada de Flu en distintos tipos celulares (26-28), estos

son hENT1, hENT2 y hCNT3. *Ex vivo*, se sabe que Flu ingresa a la célula por transportadores equilibrativos, casi exclusivamente por el transportador hENT1, por el cual tiene mayor afinidad. (28, 29). Sin embargo, un trabajo reciente ha demostrado que existe una correlación entre la expresión del transportador hENT2 y el ingreso de Flu en células leucémicas *ex vivo*, siendo ésta la primera prueba de que hENT2 también jugaría un papel importante en la acción de Flu(30). En cuanto al transportador hCNT3, se vió que el mismo no se expresa en la membrana plasmática de células leucémicas, aunque sí se detecta su ARNm en dichas células e incluso la proteína en el citoplasma. Por el momento, se acepta que el transporte de Flu no es dependiente de sodio en células leucémicas (31).

Una vez dentro de la célula, Flu es metabolizada como cualquier otro precursor de nucleósido o AN. Deoxicitidinaquinasa (dCK) es la enzima inicial y es el paso limitante en la serie de fosforilaciones necesarias para transformar a Flu en su forma trifosfato-activa (F-ara-ATP) (32). De forma inversa, si la concentración de Flu es alta en el interior celular, es catabolizada mediante desfosforilación por la 5'-nucleotidasa cN-II (33), revirtiendo la acción de la dCK.

2 c) Actividad citotóxica de fludarabina:

La ventaja del tratamiento con Flu frente a otras drogas quimioterápicas radica en que, dados sus múltiples mecanismos citotóxicos, tiene actividad no sólo sobre células en división sino también sobre células en reposo (Figura 4):

- En células en división, F-ara-ATP compite con las deoxiadenosinas trifosfatos (dATP) por la incorporación en los sitios A de la hebra de ADN en elongación durante la fase S del ciclo celular. Al incorporarse provoca daño al ADN que se evidencia en la terminación de la elongación de la cadena (34). Por otro lado, F-ara-ATP puede inhibir la síntesis de ADN

interfiriendo con enzimas como la ADN polimerasa, la ADN primasa, ADN ligasa y topoisomerasa II. También puede inhibir a la ribonucleótido reductasa (RR), causando una reducción en el *pool* de dNTPs que resulta en su propia potenciación (35).

- En células en reposo, el efecto citotóxico de Flu involucra diversos mecanismos tales como la inhibición de la reparación del ADN y la inhibición de la transcripción del ARNm (15). La incorporación de F-ara-ATP al ADN por la maquinaria de reparación termina con el proceso de exicición y reparación causando un daño irreversible. Otros mecanismos que inducen citotoxicidad se observan al incorporarse F-ara-ATP al ARNm de células en reposo, lo que inhibe su función como templado para la síntesis proteica (36). F-ara-ATP también es capaz de inhibir la síntesis de ARN al suprimir la actividad de la ARN polimerasa II (36). Finalmente, Flu afecta a la mitocondria pero sólo como un evento tardío, sugiriendo un mecanismo indirecto relacionado con la vía apoptótica de p53 (36).

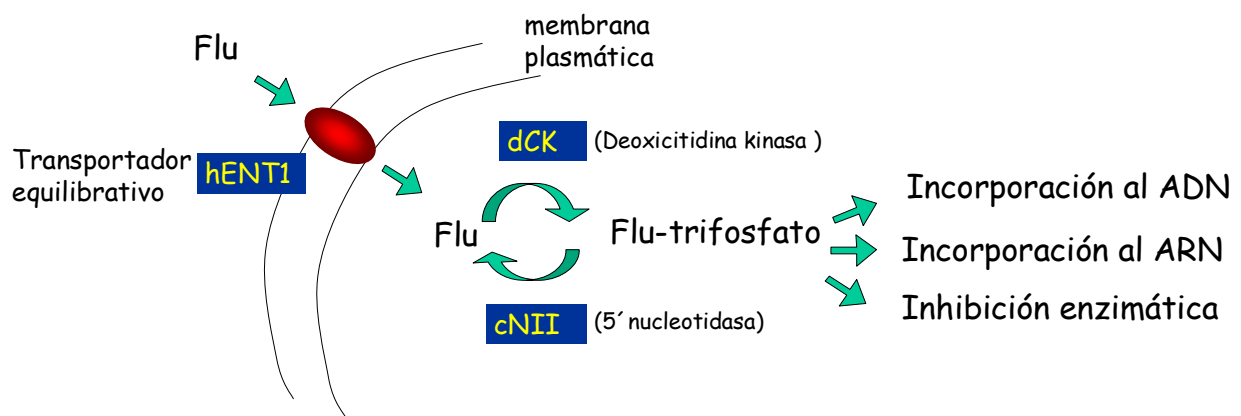


Figura 4: Características en el metabolismo y acción de Fludarabina.

Flu ingresa a la célula a través del transportador específico de membrana hENT1. Una vez dentro de la célula es activada por sucesivas fosforilaciones, siendo la primera de ellas llevada a cabo por la dCK. La Flu-3P puede ejercer su acción citotóxica al ser incorporada al ADN o ARN, alterándolo o interfiriendo con enzimas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos. Estas acciones resultan en la inhibición de la síntesis de ADN o ARN y en la apoptosis celular.

En conjunto, estos efectos inducen la *down-regulación* de proteínas necesarias para la supervivencia celular como Bcl-2 (20) y la activación de otras como APAF-1 y la consecuente activación de caspasa-9 y caspasa-3 (37), responsables de desencadenar la cascada apoptótica.

2 d) Mecanismos de resistencia a Flu:

Diversos estudios clínicos han demostrado que el tratamiento de pacientes leucémicos con Flu es efectivo en alrededor del 65% de los pacientes vírgenes, pero sólo en el 35% de los que ya habían sido tratados (21,38,39). La resistencia que desarrollan las células tumorales a Flu es una de las mayores limitaciones al empleo de esta droga, quedando los individuos no-respondedores igualmente expuestos a las serias complicaciones asociadas con la terapia como la mielosupresión y la anemia hemolítica autoinmune. Los mecanismos responsables de la resistencia a Flu se originan en alteraciones ya sea en el nivel de expresión y/o la actividad de las distintas proteínas involucradas en el metabolismo de Flu: transportadores, quinasas y nucleotidasas, como así también en defectos en las vías de inducción de apoptosis.

Como se comentó anteriormente, el transporte de los AN a través de la membrana plasmática es un requisito para que el AN ejerza su acción proapoptótica, ya que estos compuestos no cruzan la membrana por difusión. En este sentido, se ha demostrado que la actividad biológica de los transportadores ENTs en LLC-B correlaciona con la citotoxicidad de Flu *in vitro* (10,28,30). En cuanto a las deficiencias en la enzima dCK se sabe que son un factor determinante en la resistencia a AN (1,40-42). Las causas en la deficiencia de dCK incluyen: mutaciones o deleciones en la secuencia codificante, expresión de alguna forma de *splicing* alternativo de dCK que dé como resultado un ARNm que codifique para una proteína inactiva, o inhibición de la expresión de ARNm por la metilación de la región promotora (43-45).

También se han reportado deficiencias en la actividad de la dCK sin que se observe disminución en la expresión a nivel de ARNm, lo que sugiere que habrían mutaciones genéticas o modificaciones post-transcripcionales o post-transduccionales que estarían afectando la actividad de la enzima.

Otro punto a tener en cuenta al analizar la posible resistencia a Flu es el *pool* de dNTPs presente en las células, ya que se ha observado que las altas concentraciones de dNTPs inhiben a la dCK. De esta forma Flu ingresa a las células y no puede ser activada y si lo es, debe competir con altas concentraciones de dNTPs por la ADN polimerasa para ser incorporada al ADN en elongación. Estos factores también estarían contribuyendo a la resistencia de estas células a Flu (42).

Dado que, tanto las enzimas activadoras (especialmente dCK) como las inactivadoras (cN-II) de AN están involucradas en la biodisponibilidad de Flu, también es de suma importancia evaluar la actividad y expresión de cN-II. En este sentido, muchos modelos de resistencia a AN *in vitro* correlacionan con alta expresión de las nucleotidasas cN-II y cN-IA (1,33,46-48).

Tomando en cuenta ambos tipos de enzimas que determinan la biodisponibilidad de los AN en las células, la relación relativa de las quinasa de nucleósidos dCK respecto de la 5'-nucleotidasas cN-II tiene un valor clínico predictivo respecto de la resistencia a la droga en cuestión (49).

3-Apoptosis

3 a) Características generales:

La apoptosis, descrita originalmente por Kerr y colaboradores en el año 1972 (50), deviene de la activación de un mecanismo intrínseco suicida

programado genéticamente. El mismo conduce, en última instancia, a la eliminación de células potencialmente perjudiciales para el organismo (51-53). Todas las células presentes en mamíferos poseen la capacidad de activar este programa suicida, cuya ejecución suele asociarse a cambios morfológicos y bioquímicos que presentan un patrón común en diferentes tipos celulares. A diferencia de la necrosis, la apoptosis se relaciona con fenómenos de homeostasis, los cuales cumplen un papel crítico en procesos tan diversos como desarrollo embrionario, reparación tisular, fisiología del sistema inmune y desarrollo tumoral (51-53).

Durante el desarrollo del proceso apoptótico se manifiesta un conjunto de alteraciones morfológicas comunes a distintos tipos celulares. Ya en etapas tempranas se observa una disminución en el tamaño de la célula, proceso asociado a la pérdida de agua. Estudios realizados en timocitos, luego generalizados a otros tipos de linfocitos, demostraron una reducción en el volumen celular cercana al 30%. Este proceso de condensación celular hace que las diferentes organelas, manteniendo una morfología inalterada, se muestren francamente agrupadas al estudiarlas por microscopía electrónica (52,53).

El colapso nuclear constituye un fenómeno crítico en el proceso apoptótico observándose una marcada condensación de la cromatina en áreas asociadas a la envoltura nuclear. En relación con la membrana citoplasmática, se observan profundos pliegues y arrugas, generadas a través de un proceso denominado zeiosis. Es importante destacar, no obstante, que la membrana citoplasmática no muestra pérdida de su integridad o alteraciones mayores en su permeabilidad (52,53).

Paralelamente a los cambios morfológicos se producen una serie de procesos bioquímicos, como la activación de ciertas endonucleasas dependientes de iones como Ca^{2+} y Mg^{2+} que cortan el ADN genómico por los espacios internucleosomales, generándose fragmentos de unos 180 pares de

bases o múltiples de esta medida. Al hacer una electroforesis del ADN extraído de las células apoptóticas, estos fragmentos formarán una escalera típica. Otros cambios bioquímicos que tienen lugar durante la apoptosis son la pérdida del potencial mitocondrial y cambios en la membrana plasmática, los residuos de fosfatidilserina, normalmente presentes en la cara interna de la membrana celular, aparecerán en la cara externa, lo que permite el reconocimiento de estas células apoptóticas por los macrófagos y su consiguiente fagocitosis (54-56).

Por último, dependiendo del tipo celular, suele observarse en etapas tardías fragmentación celular en forma de cuerpos apoptóticos, los cuales mantienen sus gradientes osmóticos (53-55). El destino final de la célula apoptótica es ser endocitada por fagocitos profesionales u otros tipos celulares como fibroblastos y células epiteliales, a través de un proceso que no conduce a la liberación de mediadores inflamatorios (55). Este proceso de remoción de células apoptóticas es sumamente eficiente.

El proceso de apoptosis en la mayoría de las células depende de la activación de una familia de cisteín-proteasas denominadas caspasas, las cuales pueden ser clivadas proteolíticamente a formas activas luego del estímulo apoptótico (56,57). Dentro del conjunto de estímulos que pueden dar lugar a la activación de las caspasas se encuentran, entre otros, la activación de receptores de muerte, la hipoxia, el daño directo al ADN y la ausencia de ciertos factores de supervivencia (58). La activación de estas cisteín-proteasas está gobernada directa o indirectamente por una variedad de otras proteínas (59,60) que promueven o inhiben la apoptosis, entre las que se destacan las pertenecientes a la familia Bcl-2 (61).

3 b) La familia Bcl-2 y la apoptosis:

La molécula Bcl-2 da el nombre a toda una familia de proteínas homólogas que están repartidas en dos grupos, el de los miembros anti-

apoptóticos o factores de supervivencia, que inhiben la muerte celular por apoptosis como el propio Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 (62-65), y el formado por los miembros pro-apoptóticos o promotores de la apoptosis, siendo Bax el miembro mejor estudiado, además de Bcl-XS, Bak, Bad, Bik, Bid, etc. Diversos mecanismos regulatorios operan sobre estas proteínas, tanto a nivel transcripcional (63-66) como post-traducciona (67) modulando, de ese modo, su actividad. Aparentemente, la capacidad del Bcl-2 de prevenir la activación de las caspasas involucra múltiples mecanismos que interfieren con los activadores de dichas proteasas, inhibiendo su liberación y/o secuestrándolas a través de interacciones físicas (64).

El incremento en la expresión de Bcl-2 (o Bcl-XL), como así también la baja expresión de Bax, favorecen la carcinogénesis al prolongar la vida de las células y facilitar la acumulación de mutaciones. De hecho, los niveles de estos factores se han relacionado con la progresión tumoral y con mal pronóstico en distintos tipos de cáncer, como por ejemplo, los neuroblastomas, gliomas, linfomas, adenocarcinomas de colon y próstata, melanomas etc. (52,65). Por otra parte, la sobreexpresión de Bcl-2 es capaz de inhibir la apoptosis inducida por ciertos agentes quimioterapéuticos e inducir resistencia a estos tratamientos anticancerosos (66).

Mcl-1 es otro miembro anti-apoptótico de la familia de Bcl-2 que puede promover la sobrevida celular. Por el momento no se conoce exactamente el mecanismo de acción de Mcl-1, pero se cree que involucraría la supresión de la liberación de citocromo c de las mitocondrias en etapas tempranas (67,68). Mcl-1 tiene una vida corta y es una proteína altamente regulada, inducida por un amplio rango de señales de sobrevida y señales de diferenciación, tales como citoquinas y factores de crecimiento (69). La expresión de Mcl-1 disminuye en la célula que sufre el proceso apoptótico. Por el contrario, los niveles altos de Mcl-1 en células malignas se han asociado con la supresión de apoptosis. En este sentido, se observó que la depleción de Mcl-1 mediante el empleo de oligonucleótidos antisentido inducía la apoptosis en células cancerígenas normalmente resistentes

(70,71). Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de Mcl-1 en ratones transgénicos resulta en una mayor incidencia de linfomas, lo que sugiere que Mcl-1 puede contribuir directamente con el desarrollo del proceso maligno (72).

3 c) La familia de quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la apoptosis:

Una gran variedad de procesos celulares son modulados por mecanismos de fosforilación y desfosforilación de los componentes moleculares participante. La existencia de eventos secuenciales de fosforilación en los cuales una serie de proteínas quinasas fosforila y regula la actividad de la siguiente ha dado lugar a la definición del concepto de “cascada de proteínas quinasas”. Un ejemplo clásico de este fenómeno está dado por la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la cual es activada como respuesta celular a una gran variedad de estímulos (73-75). Las MAPKs son proteínas quinasas activables por la fosforilación dual de aminoácidos treonina (T) y tirosina (Y), que se encuentran separados por un aminoácido X (TXY), donde la letra X puede representar varios aminoácidos distintos. Las MAPKs son enzimas conservadas evolutivamente. Responden a estrés físico y químico, controlando supervivencia y adaptación y están implicadas en procesos de crecimiento y diferenciación. En mamíferos existen tres grupos de MAPKs: ERK, p38 y JNK. ERK y p38 están relacionados con MAPKs encontradas en levaduras y se fosforilan en los motivos Thr-Glu-Tyr y en Thr-Gly-Tyr. Las JNKs han sido descritas sólo en mamíferos y se fosforilan en el motivo Thr-Pro-Tyr (73-76) (Figura 5).

Las MAPKs participan en multitud de procesos celulares como diferenciación celular, motilidad, proliferación y apoptosis. ERK-1 y ERK-2 se han relacionado preferentemente con proliferación y diferenciación (77,78), mientras que JNK y p38, preferentemente con respuestas a estrés como

inflamación y apoptosis (78,79), aunque hay excepciones, y tanto JNK como p38 pueden mediar proliferación (80-82).

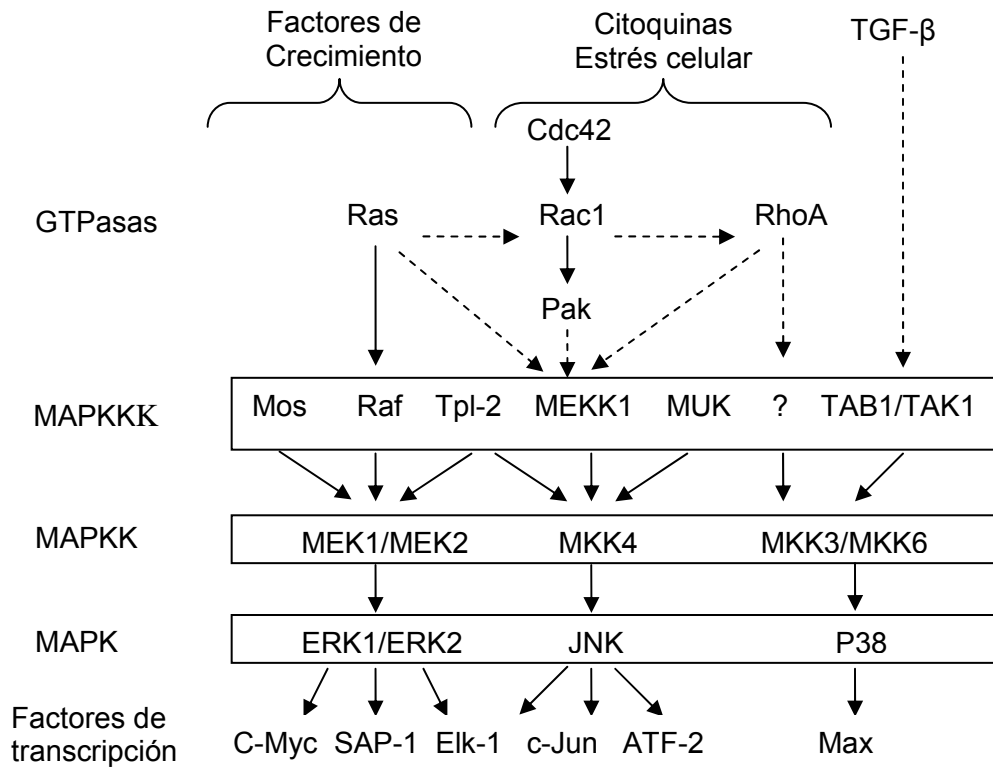


Figura 5: MAPKs en mamíferos.

En la parte superior se incluyen algunos estímulos que activan estas vías. En la parte inferior se muestran los factores de transcripción en los cuales converge la señal. Las áreas encuadradas sirven para indicar los módulos centrales de estas cascadas de transducción de señales que consisten de: una proteína que une GTP (por ejemplo Ras y Rho), una quinasa de serina o treonina que actúa como MAPKKK (por ejemplo Raf o MEKK), una quinasa de fosforilación dual que actúa como MAPKK (por ejemplo MEK) y la MAP quinasa correspondiente. Las MAPKKK activadas pueden a su vez activar una o varias MAPKK, sin embargo, las MAPKK son relativamente específicas para las MAPK. Una vez activadas, las MAPK fosforilan factores de transcripción, los cuales controlan procesos como crecimiento, diferenciación y apoptosis.

Como se muestra en la figura 5, las MAPKs a su vez son activadas a través de cascadas compuestas por MAPK quinasa, (MAPKK, MKK o MEK), y las MAPKK quinasa o MEK quinasas (MAPKKK o MEKK). Estos módulos pueden ser activados por STE20 quinasas o proteínas de unión a GTP monoméricas, siendo desactivadas por MAPK fosfatasas (83). Cada MAPKK puede ser activada por más de una MAPKKK, aumentando la complejidad y la diversidad de las señales. Es posible que cada MAPKKK sea responsable de la respuesta a estímulos específicos (83). Así por ejemplo, c-Raf es la responsable de la respuesta de ERK 1 y 2 frente a factores de crecimiento, mientras que otras MAPKKK activarían ERK 1 y 2 en respuesta a estímulos proinflamatorios (83). MEKK 1 participa en la activación de JNK en células madre embrionarias y en fibroblastos por agentes desorganizadores de microtúbulos, agentes proinflamatorios y factores de crecimiento (84,85), mientras que participa en la activación de JNK por TNF e IL-1 en células madre embrionarias, pero no en fibroblastos (85). Si bien las distintas vías de MAPKs comparten algunos componentes corriente arriba, la activación de una vía por señales extracelulares no produce la activación de otras que contienen componentes compartidos (86).

JNK es una MAPK perteneciente al subgrupo de SAPK o proteínas quinasas de respuesta a estrés. Además de fosforilar a c-Jun en aminoácidos específicos, JNK fosforila a otras proteínas AP-1 como son JunB, JunD, y ATF-2 (76) y se ha encontrado correlación entre el daño al ADN y la activación persistente de JNK seguido de inducción de apoptosis. Por otro lado, la activación de JNK también se ha descrito como protectora frente a apoptosis. Tal es el caso de un estudio en timocitos, donde la activación de JNK protege frente a la apoptosis mediada por CD3 y CD95 (87). Asimismo, en cultivos primarios de fibroblastos, la vía de señalización de JNK está implicada en la supervivencia celular mediada por la interacción de integrinas con fibronectina, en ausencia de suero (88). El hecho de que JNK induzca respuestas tanto apoptóticas como antiapoptóticas, incluso en el mismo tipo celular, puede deberse a la participación de diferentes isoformas con funciones opuestas. Otra

posibilidad es que los efectos biológicos inducidos por JNK dependan de la activación simultánea de otras rutas, siendo la acción de JNK más permisiva que inductora (89). Por último, también se ha propuesto que la duración de la activación de JNK determina el tipo de respuesta. Así, una activación sostenida estaría relacionada con apoptosis, mientras que una activación transitoria se asociaría con supervivencia (90).

La proteína p38 es también una MAPK perteneciente al grupo de las SAPK2 o quinasas de respuesta a estrés. Esta enzima es activada por estímulos proinflamatorios como citoquinas, factores de estrés y factores de crecimiento. La estimulación de p38 conduce a la activación de numerosos factores de transcripción que inducen la producción de citoquinas proinflamatorias o la apoptosis celular (91-94).

El subgrupo de las MAPK/ERK fue originalmente identificado como proteínas fosforiladas que interaccionaban con la proteína asociada a microtúbulos-2 en respuesta a la activación de receptores con actividad tirosina quinasa (95). La vía de señalización de ERK fue la primera vía de MAPK estudiada en mamíferos. La activación de la vía Ras/Raf/MEK/ERK gobierna los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia (96). Originalmente se describió que la vía de señalización de ERK se activa a través de receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa, acoplados a proteínas G e integrinas.

4-Leucemia linfática crónica de células B

4 a) Generalidades:

La leucemia linfática crónica de células B (LLC-B) es la patología más frecuente en el Hemisferio Occidental, comprende alrededor del 25% de las

leucemias que se diagnostican anualmente (97-99). Es una patología que afecta a personas mayores, con un pico de incidencia en el rango que va de los 60 a los 70 años y una prevalencia mayor en hombres que en mujeres, en una relación aproximada de 2:1. La expectativa de vida de los pacientes con LLC-B al momento del diagnóstico es muy variable y oscila entre aquellos que viven durante años con una enfermedad estable y sin medicación a otros que mueren a los pocos meses aún bajo tratamiento quimioterápico. A pesar de la implementación de nuevos recursos terapéuticos, no ha habido mejoras sustanciales en el tiempo de supervivencia de los pacientes con LLC-B en los últimos 40 años (100).

La LLC-B se caracteriza por la progresiva acumulación en la periferia de linfocitos B clonales morfológicamente maduros que expresan antígenos pan-B como CD19 y CD20, junto con otros antígenos que no se encuentran en la mayoría de los linfocitos B circulantes como CD5 y CD23. Asimismo, las células LLC-B expresan niveles muy bajos de inmunoglobulina (Ig) en la superficie que, generalmente, es de isotipo M (IgM), habiendo en algunos casos co-expresión IgM/IgD (97,100,101). La LLC-B es un claro ejemplo de una enfermedad oncohematológica causada principalmente por defectos en el proceso apoptótico, ya que la enorme mayoría de las células en periferia se encuentran en la fase G₀ del ciclo celular (102). Las anomalías en el proceso apoptótico de las células LLC-B se han intentado asociar con la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. En el linfoma folicular, la sobreexpresión de Bcl-2 se da como consecuencia de la traslocación t(14;18) en la que el gen Bcl-2 situado en el cromosoma 18 pasa al cromosoma 14 bajo la regulación de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (103). En la LLC-B las translocaciones del gen Bcl-2 son poco frecuentes (aproximadamente un 10%) (103), pero la expresión tanto del ARN mensajero como de la proteína para Bcl-2 es una constante, que se ha atribuido a la hipometilación del gen que codifica para esta proteína (104). El clon leucémico de muchos pacientes con LLC-B expresa, no sólo Bcl-2 sino además otros miembros de esta familia, como por ejemplo Mcl-1 y BAG, que presentan actividad anti-apoptótica, y Bax, capaz de

inducir la muerte celular (105). Aún cuando existen discrepancias entre los grupos de trabajo no se ha podido correlacionar inequívocamente mayor expresión de Bcl-2 en LLC-B con un estadio más avanzado de la enfermedad. En cambio, parecería que existe una asociación entre una mayor relación Bcl-2:Bax con resistencia al tratamiento y progresión de la leucemia (106). Finalmente cabe señalar que los pacientes resistentes al tratamiento con Flu expresan niveles más altos de Mcl-1 en sus células leucémicas que aquellos sensibles a la quimioterapia, lo que indicaría que Mcl-1 es relevante en la resistencia a drogas en LLC-B (105).

4 b) Microambiente y leucemia linfática crónica:

Como se señalara anteriormente, la progresiva acumulación de las células leucémicas en LLC-B se debería a una apoptosis defectuosa. Sin embargo, al ser cultivadas *in vitro*, estas células mueren por apoptosis con relativa facilidad, lo que sugiere que factores del microambiente *in vivo* podrían influenciar la prolongada sobrevida de las células LLC-B (107-109). Existe un gran número de factores tanto solubles como dependientes del contacto celular que son capaces de prolongar la sobrevida de las células LLC-B (108,110,111). Muchas de estas señales de sobrevida provienen de células que acompañan a las leucémicas en la circulación o en los tejidos linfáticos, como lo son los linfocitos T, las células NK, los monocitos, las células estromales y las dendríticas. Pero también se ha demostrado que las propias células LLC-B secretan factores solubles capaces de regular en forma autócrina su ciclo de vida.

En la Figura 6 se señalan sólo algunos de estos factores de sobrevida.

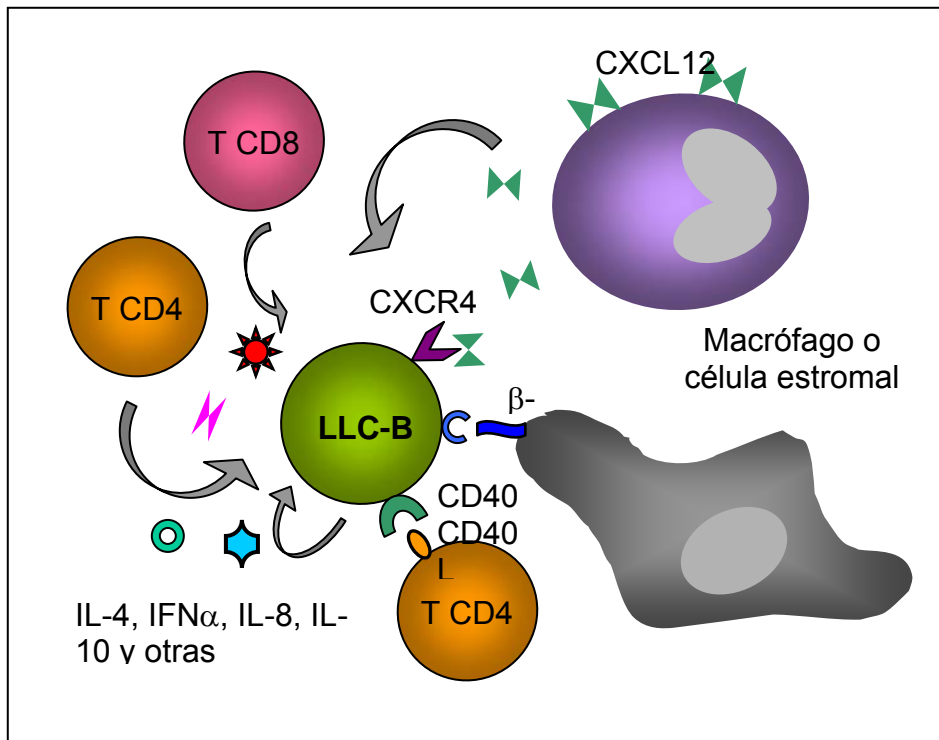


Figura 6: Factores que podrían modular en forma autócrina y/o parácrina la supervivencia de las células LLC-B *in vivo*.

Una gran variedad de citoquinas presentan la capacidad de inhibir la apoptosis espontánea de las células LLC-B en cultivo (112-117). Entre ellas las mejor caracterizadas son el IFN α , la IL-4 y la IL-8. En relación al IFN α es interesante señalar que se han encontrado mayores niveles en el suero de pacientes LLC-B en comparación con donadores normales lo que sugiere un papel relevante *in vivo* (114). Con respecto a la IL-4, distintas evidencias indican que el microambiente *in vivo* de los pacientes LLC-B es particularmente “rico” en esta citoquina secretada mayormente por los linfocitos TH2 (115). IL-4 no sólo retarda la apoptosis espontánea sino también la inducida por quimioterápicos como clorambucilo, fludarabina o dexametasona (116-118). En cuanto a la IL-8 se ha demostrado que ejerce su efecto anti-apoptótico incrementando los niveles de la proteína Bcl-2 (119). Es interesante señalar

que la IL-8 puede ser secretada por una gran variedad de poblaciones celulares, como monocitos, células dendríticas, neutrófilos, células endoteliales, plaquetas, linfocitos y las propias células LLC-B, por lo que actuaría en forma parácrina o autócrina para prolongar la supervivencia de la célula leucémica. En cuanto a su posible relevancia *in vivo* como factor anti-apoptótico, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de IL-8 en pacientes LLC-B correlacionan con la progresión de la enfermedad (120).

Con respecto a las interacciones célula-célula capaces de modular la apoptosis en LLC-B, se ha visto que el contacto de las células leucémicas con las estromales de médula ósea a través de $\beta 1$ y $\beta 2$ integrinas prolonga su supervivencia (121). En igual sentido, otros autores han descrito que la interacción de C3b_i con $\beta 2$ integrinas presentes en la membrana de las células leucémicas, inhibe la apoptosis de las mismas (122). La interacción de la molécula CD40 presente en la membrana de las células LLC-B con su ligando específico, el CD40L, estaría también involucrada en la regulación de la supervivencia de las células leucémicas. Asimismo, la activación *in vitro* de la molécula CD40 induce un marcado incremento en la expresión de moléculas de adhesión y de coestimulación, además de un aumento en la proliferación y producción de diversas citoquinas (123).

Considerados en conjunto, estas evidencias sugieren que la progresiva y lenta acumulación de las células LLC-B en la periferia no sólo depende de factores intrínsecos a las células leucémicas, como por ejemplo la expresión preferencial de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, sino también de señales del microambiente, en particular las provistas por los leucocitos no malignos (monocitos, células NK y linfocitos T) y células dendríticas y estromales de médula ósea y órganos linfáticos secundarios.

4 c) Subpoblaciones leucocitarias en LLC-B:

Numerosos estudios han demostrado distintas anomalías, tanto en la distribución como en el fenotipo y funcionalidad de las poblaciones leucocitarias en LLC-B. Así por ejemplo, los monocitos presentan una mayor expresión de antígenos de activación como moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), receptores para el complemento (CR3) y receptores para el fragmento Fc de la IgG (RFc γ) (124). Las células NK suelen presentar una capacidad citotóxica disminuida debido a un menor contenido de gránulos citotóxicos (125). Pero entre todas las poblaciones leucocitarias son los linfocitos T los que han sido más estudiados en LLC-B. Un hecho significativo es el aumento en el número absoluto de linfocitos T observado en muchos pacientes aún cuando su porcentaje está disminuido como consecuencia de la expansión del clon leucémico (126). Por otra parte, se ha encontrado una alteración en la relación de las subpoblaciones T CD4⁺/CD8⁺, por un aumento en el número de linfocitos T CD8⁺, hecho que podría deberse a cambios en la distribución de las poblaciones T, con prevalencia de las CD4⁺ en médula ósea y en los ganglios comprometidos (127). Cabe destacar, asimismo, que en una gran proporción de los enfermos, existe expansión oligoclonal tanto en las poblaciones T CD4⁺ como en las CD8⁺ (128). Las células leucémicas serían responsables en gran medida de los cambios que se observan en las poblaciones T de los pacientes LLC-B. Recientemente se ha demostrado que el cultivo de linfocitos T de dadores normales con células LLC-B provoca defectos a nivel de la expresión génica de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ similares a los defectos que se observan en los linfocitos T de los pacientes (129). Por ejemplo, el contacto de las células LLC-B con linfocitos T CD4⁺ normales disminuye la expresión de varios genes de las vías de JNK y p38 MAPKs que se encuentran inhibidos en los linfocitos T CD4⁺ de los pacientes. Este mismo contacto provoca en los linfocitos T CD8⁺ la desregulación de genes involucrados en la formación de vesículas secretorias y actividad citotóxica. Los cambios reportados probablemente sean responsables de la baja capacidad de

respuesta inmune que presentan los pacientes LLC-B. En este mismo sentido, resultados publicados por Motta y col (130) demostraron recientemente que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes LLC-B presentan una expresión aumentada de la molécula CTLA-4, la cual cumple un papel relevante en el bloqueo de la activación linfocitaria.

En resumen, numerosas evidencias indican que las poblaciones de linfocitos T en los pacientes LLC-B aún cuando se encuentran expandidas en la periferia no funcionan en forma adecuada frente al estímulo antigénico, lo que conduce a inmunosupresión y falta de respuesta adecuada frente a infecciones.

4 d) Tratamiento de la LLC-B:

Debido a su lenta progresión, la LLC-B fue considerada durante mucho tiempo como una enfermedad “indolente” y que no requería tratamiento. Sin embargo, en la gran mayoría de los pacientes la enfermedad progresa, se incrementa el número de células leucémicas en circulación, se presentan adenopatías, esplenomegalia y la infiltración medular provoca, usualmente complicaciones que hacen necesario el tratamiento. Hasta hace poco tiempo, la terapia para LLC-B consistía en regímenes basados en agentes alquilantes como Clorambucilo o Ciclofosfamida, solos o combinados con corticoides. En algunos casos los agentes alquilantes se utilizaron en combinaciones tales como CVP (Ciclofosfamida, Vincristina y Prednisona) y CHOP (Ciclofosfamida, Adriamicina, Vincristina y Prednisona) (131,132).

La introducción de análogos de nucleósidos como Flu, pentostatina y cladibrina en los ensayos clínicos a finales de los años ochenta significó un cambio sustancial en la terapia de la LLC-B (133,134). Flu es considerada desde entonces como el mejor tratamiento como monodroga para LLC-B debido a la excelente respuesta obtenida y a la buena tolerancia. Posteriores

investigaciones en la década pasada se focalizaron en el desarrollo de la combinación de regímenes con Flu con el objetivo de mejorar la remisión completa y la supervivencia global de los pacientes. Los mejores resultados se obtuvieron con la combinación Flu-ciclofosfamida (135-138).

Más recientemente aún, se introdujeron al tratamiento de la LLC-B los anticuerpos monoclonales Campath-1H y Rituximab (131). El anticuerpo monoclonal Campath-1H es un anticuerpo humanizado dirigido contra la molécula de superficie CD52 que se expresa en más del 95% de los linfocitos B y T maduros, mientras que Rituximab es un anticuerpo quimérico dirigido contra la molécula CD20 expresada en los linfocitos B maduros. Muchos grupos han sumado rituximab o campath a los regímenes de Flu obteniendo muy buenos y alentadores resultados en pacientes LLC-B sin previo tratamiento (132,139-141).

La superioridad del tratamiento con Flu, ya sea sola o combinada con ciclofosfamida o Rituximab, sobre los tratamientos convencionales basados en agentes alquilantes, ha sido ampliamente demostrada en diversos estudios (38,142-143). Sin embargo, existen dos grandes limitaciones al empleo de Flu, por un lado, esta droga, al actuar también sobre linfocitos T, induce una importante inmunosupresión en el paciente, con el concomitante incremento de las infecciones oportunistas. Por otra parte, el tratamiento con Flu se asocia con la aparición o agravamiento de la anemia hemolítica autoinmune (AHA) en un alto porcentaje de los pacientes (144-146) provocando una hemólisis en muchos casos extremadamente severa. Este efecto se ha atribuido a la desregulación de las poblaciones T, en particular la población CD4⁺, que normalmente controlarían la aparición de clones autorreactivos (147). Sin embargo, no está claro por el momento de qué manera Flu podría afectar a los linfocitos T favoreciendo la producción de los autoanticuerpos responsables de la AHA.

Una de las características más peculiares de la LLC-B es su asociación

con fenómenos de naturaleza autoinmune debidos a la producción de autoanticuerpos policlonales de clase IgG, fundamentalmente dirigidos contra antígenos expresados en células hematopoyéticas (146,148,149). La producción de autoanticuerpos es la responsable de la inducción de anemia hemolítica autoinmune en un porcentaje importante de los pacientes (25%), y en menor medida, púrpura trombocitopénica y neutropenia (146). Cabe señalar que los autoanticuerpos no son producidos por el clon leucémico, ya que se trata de Igs policlonales de isotipo IgG. Paradójicamente a la producción de autoanticuerpos, los pacientes con LLC-B suelen desarrollar una hipogamaglobulinemia a medida que progresa la enfermedad, cuya severidad no tiene paralelo en otras patologías oncohematológicas y constituye la principal causa de morbilidad y mortalidad, debido a la incidencia de infecciones bacterianas (106,149,150).

Objetivos

La Fludarabina (Flu) hizo su aparición como agente quimioterápico hace ya 20 años y desde entonces es ampliamente utilizada por sus efectos anti-neoplásicos, particularmente en enfermedades linfoproliferativas de bajo grado, como la leucemia linfática crónica de células B. La casi totalidad de los estudios en relación a la actividad citotóxica de Flu se llevaron a cabo en células leucémicas, ya que son éstas sus principales “blancos” terapéuticos. Sin embargo, los prolongados tratamientos *in vivo* con Flu pueden afectar muchas otras poblaciones celulares siempre que posean los transportadores y enzimas necesarias para su ingreso y metabolismo. Estas alteraciones a nivel sistémico son causa de los efectos secundarios de Flu, como la inmunosupresión y la inducción o agravamiento de la anemia hemolítica autoinmune. Conocer mejor la actividad biológica de Flu en las distintas poblaciones leucocitarias y los mecanismos que regulan su transporte y metabolismo ayudaría a controlar sus efectos secundarios mejorando su eficacia terapéutica. Teniendo en cuenta estas consideraciones, los objetivos de esta tesis fueron:

1. Investigar la actividad citotóxica de Flu en cada una de las poblaciones de leucocitos humanos de sangre periférica.
2. Determinar si Flu posee efectos inmunorregulatorios independientes de su actividad pro-apoptótica utilizando como modelo *in vitro* las células de estirpe monocítica U937.
3. Analizar los mecanismos responsables de la actividad biológica de Flu en células U937.

| **MATERIALES Y METODOS**

1. Soluciones, medios de cultivo, reactivos:

a) Tampón fosfato salino (PBS).

La solución fue preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na₂HPO₄ 0,078M y KHPO₄ 0,015M; pH=7,4.

b) Solución de Ficoll-Triyosom.

Para la purificación de células mononucleares y granulocitos polimorfo- nucleares de sangre periférica se utilizó una solución isotónica de Ficoll 400 (Amersham Biosciences) y Triyosom 50 (aminotriozato sódico 50%) (Justesa Imagen), densidad 1,077 g/l.

c) Solución de Percoll.

Para la purificación de monocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica se utilizó una solución de Percoll (Amersham Biosciences).

d) Solución de Dextrán.

Para la obtención de granulocitos polimorfonucleares se utilizó una solución de Dextrán (266 kD (Sigma) al 6% en solución fisiológica

e) Solución de Turk para el recuento de células.

Se preparó una solución con violeta de genciana (100mg), ácido acético glacial (31,25ml) y agua destilada (c.s.p. 500ml). Para el recuento de células se realizó una dilución 1:20 en esta solución y se procedió al conteo en cámara de Neubauer.

f) Medio de cultivo.

Se empleó medio de cultivo RPMI 1640 de Invitrogen (Grand Island, N.Y, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por

calentamiento a 56 °C durante 30 minutos, estreptomicina (100µg/ml) y penicilina (100U/ml), de GIBCO Invitrogen.

g) Fludarabina.

Fludara[®] 50 mg (fludarabina fosfato) se obtuvo de Schering Argentina (Buenos Aires). La preparación viene liofilizada y se reconstituyó con agua bidestilada para obtener una solución isotónica de 10 mg/ml. La preparación se alicuotó y congeló inmediatamente a -70°C. Las alícuotas se descongelaron inmediatamente antes de su empleo y se diluyeron en medio de cultivo protegiéndose de la luz.

i) Inhibidores

Los siguientes reactivos se adquirieron en Calbiochem (Torrey Pines, USA): PD98059 (PD), SB203580 (SB), SP600125 (SP), Sulfasalazina (SSZ) y N-acetil-leucinil-leucinil-norleucinal (ALLN). N-acetilcisteína (NAC) y nitrobenzil tioinosina (NBTI) se obtuvieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

j) Citoquinas.

Las citoquinas empleadas en la diferenciación de células dendríticas fueron interleuquina 4 (IL-4) y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) de Peprotech (Rocky Hill, USA).

k) Reactivos para la evaluación de apoptosis.

Los colorantes Ioduro de Propidio, bromuro de etidio y Naranja de Acridina fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. Para la determinación de la apoptosis mediante la técnica de Anexina V, se utilizó Anexina V-FITC de Immunotech (Marseille, France).

l) Anticuerpos.

Anticuerpos monoclonales utilizados:

Anti-CD4 FITC, anti-CD8 FITC, anti-CD3 PE, anti-ICAM-1-FITC y anti-CD11b-PE (Immunotech, Marseille, Francia).

Anti-CD19 FITC (Beckman Coulter, Fullerton, USA).

Anti-CD1a FITC, anti-CD4 PE, anti-CD8 PE y anti-CD14 PE, anti-CD19 PE, anti-CD2 PE, anti-CD3 FITC, anti-CD9 FITC y anti-CD23 PE Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA).

Anti-fosfo ERK (Cell Signalling, Beverly, USA).

Anti-β actina y anti-ERK 1/2 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA).

Los anticuerpos secundarios anti-Ig G de conejo y anti-IgG de ratón marcados con peroxidasa fueron adquiridos a JacksonImmunoResearch (Bar Harbor, USA).

2. Obtención de las muestras de leucocitos periféricos:

Las muestras de sangre periférica de dadores normales se obtuvieron de voluntarios que concurren al Hemocentro Buenos Aires, quienes fueron informados acerca de los objetivos del estudio y otorgaron su consentimiento firmado.

Las muestras de sangre periférica de pacientes con leucemia linfática crónica (LLC-B) se obtuvieron en el Laboratorio Central del Instituto de Investigaciones Hematológicas, de la Academia Nacional de Medicina. Los pacientes concurren para su atención al Departamento de Clínica Hematológica del Instituto y otorgaron su consentimiento informado para la utilización de sus muestras de sangre en este estudio. La enfermedad se diagnosticó de acuerdo a los parámetros clínicos y los criterios de laboratorio recomendados por el *National Cancer Institute-sponsored working group* (151). Al momento del análisis los pacientes eran vírgenes de tratamiento o, en su defecto, no habían recibido quimioterapia citoreductora por lo menos 3 meses antes de comenzar la investigación. Los pacientes se encontraban libres de complicaciones infecciosas relevantes cuando fueron estudiados.

3. Obtención de células mononucleares totales (CMT):

Las CMT fueron obtenidas a partir de sangre periférica de donadores sanos y de pacientes LLC-B recogida sobre heparina. La sangre entera fue sembrada sobre una solución de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma, Oslo, Norway) formando un sistema bifásico que fue centrifugado a 1500 rpm durante 20 minutos a 20°C. De esta manera se obtiene una interfase de CMT y un sedimento de eritrocitos y granulocitos. La interfase que contiene las CMT fue lavada 2 veces con solución salina y finalmente las células se resuspendieron en medio de cultivo. El número de células se determinó con el colorante de Turk y la viabilidad con Azul Trypan. En todos los casos, la viabilidad fue superior al 98% y el grado de contaminación con PMN fue menor al 3%.

4. Obtención de monocitos:

Los monocitos se purificaron a partir de las CMT por centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll. Las CMT se resuspendieron en una solución libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} suplementada con 0.2% de EDTA y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Durante la incubación, la osmolaridad del medio se aumentó gradualmente de 290 a 360 osmol/l por adición de 9% de ClNa. Se prepararon tres fracciones de 50%, 46% y 40% de Percoll en tubos de polipropileno. Se sembraron $5-10 \times 10^6$ CMT y se centrifugaron a 400 g por 20 minutos a 4°C. Los monocitos se recuperaron en la interfase comprendida entre las fracciones de 50% y 46%. La pureza de la población de monocitos se verificó por marcación con el anticuerpo anti-CD14 y análisis por citometría de flujo.

5. Obtención de granulocitos neutrófilos y eosinófilos:

El sedimento de eritrocitos y granulocitos obtenido luego de la centrifugación sobre Ficoll-Hypaque fue diluido al medio con solución fisiológica. Luego se agregó dextrán al 6% en una proporción de tres volúmenes de suspensión celular a un volumen de dextrán (3:1). Se dejó sedimentar por 30 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante rico en granulocitos y se lavó con solución fisiológica. Los eritrocitos contaminantes fueron eliminados por shock osmótico con agua destilada durante 30 segundos a 4°C, restituyendo inmediatamente la isotonicidad. Las preparaciones contuvieron más del 95% de granulocitos, de los cuales 95-98% fueron neutrófilos y 2-5% eosinófilos, según pudo comprobarse por coloración y análisis al microscopio de fluorescencia.

6. Obtención de linfocitos:

Los linfocitos periféricos fueron obtenidos a partir de las CMT por depleción de las células adherentes. Para ello las CMT se cultivaron en medio RPMI 1640 en ausencia de SFB durante 2 horas en placas de Petri a 37°C, quedando adheridos los monocitos. Las células mononucleares no adherentes (linfocitos T, linfocitos B y células NK) se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con SFB 10% y antibióticos.

7. Obtención de células dendríticas:

Para obtener las células dendríticas (CDs), los monocitos purificados por Percoll se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 50 U/ml de penicilina, 50 ug/ml de streptomina a una concentración de 1-1,5 x

10^6 /ml en microplacas de 6 wells (Costar, Cambridge, MA), al que se agregaron IL-4 (10 ng/ml) y GM-SCF (10 ng/ml). Entre los días 5 y 7 de cultivo, se evaluó la diferenciación por aumento en la expresión de CD1a utilizando un anticuerpo marcado con FITC y análisis por citometría de flujo. En nuestros experimentos, más del 90% de las células expresaron altos niveles de CD1a.

8. Línea celular U937:

Las células de la línea U937, de tipo monocitoide, fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se mantuvieron en cultivo con medio RPMI 1640, suplementado con 10% de SFB y antibióticos, en estufa gaseada con 5% de CO₂. Para minimizar las modificaciones que normalmente sufren las líneas celulares *in vitro*, se procedió a descongelar una nueva alícuota cada 15 días. Las células se mantuvieron a una densidad de $2-3 \times 10^5$ células/ml, realizando entre 2 y 3 pasajes semanales. Los experimentos se realizaron con células en cultivo en la etapa de crecimiento exponencial.

9. Cultivos celulares:

a) Cultivos en presencia de Flu

Para evaluar el efecto de Flu sobre las distintas poblaciones leucocitarias, se realizaron cultivos en microplacas de 96 pocillos de fondo plano (Costar, Cambridge, MA). Las células se cultivaron a una concentración de $2,5 \times 10^6$ /ml, en estufa gaseada a una temperatura de 37°C. La Flu fue agregada al comienzo del cultivo en las concentraciones que se indican en las leyendas de las figuras.

En el caso de las células U937, los cultivos se realizaron en las mismas condiciones descritas más arriba, pero la concentración celular fue de $0,5 \times 10^6$ /ml).

b) Cultivos en presencia de inhibidores

Los distintos inhibidores (PD98059, SB203580, SP600125, NAC, SSZ, ALLN o NBTI) fueron agregados al cultivo en las concentraciones que se indican en las leyendas de las figuras 20 minutos antes al agregado de Flu.

10. Evaluación de la apoptosis celular por microscopía de fluorescencia:

A fin de evaluar la apoptosis por microscopía de fluorescencia se utilizaron los colorantes Naranja de Acridina (100 $\mu\text{g/ml}$), a fin de identificar a las células apoptóticas y Bromuro de Etidio (100 $\mu\text{g/ml}$), con el objeto de discriminar células viables y no viables. Con esta metodología, los núcleos de células no apoptóticas muestran variaciones en su intensidad de fluorescencia, reflejando la distribución de eucromatina y heterocromatina. Por el contrario, los núcleos apoptóticos se caracterizan por presentar una cromatina marcadamente condensada, que se tiñe de manera uniforme con el colorante Naranja de Acridina. Para establecer los porcentajes de células apoptóticas, se examinaron al menos 200 células en cada experimento.

11. Evaluación de la apoptosis celular por cuantificación de núcleos hipodiploides:

Los porcentajes de núcleos con contenido de ADN hipodiploide se determinaron de acuerdo al procedimiento de Nicoletti (152) con ligeras modificaciones. Los *pellets* celulares (2.5×10^6 células) fueron resuspendidos en 400 μl de una solución hipotónica de fluorocromo, conteniendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de

ioduro de propidio (IP) y 0.1 % de Tritón X-100. Luego de una incubación de 2 horas a 4°C, la fluorescencia de núcleos individuales coloreados por el IP se determinó por citometría de flujo. La fluorescencia emitida por núcleos con contenido de ADN diploide fue fijada a nivel del canal 250 en la escala logarítmica. Los núcleos apoptóticos (hipodiploides) emitieron fluorescencia en los canales 4 a 200 de la misma.

12. Evaluación de la apoptosis celular con Anexina-V FITC:

Los niveles de apoptosis tempranos se estudiaron evaluando la unión de Anexina-V FITC a fosfatidil-serina, molécula que se transloca desde la cara citoplasmática a la cara externa en las células apoptóticas. Para ello se utilizó el *kit* comercializado por Coulter-Immunotech y se siguieron las instrucciones correspondientes. Las células se marcaron simultáneamente con Anexina-V FITC y con ioduro de propidio que permite distinguir las células apoptóticas más tardías, ya que ingresa al interior celular una vez que la membrana plasmática ha perdido su integridad.

13. Evaluación de la expresión de antígenos de membrana por Citometría de Flujo:

La expresión de antígenos en la membrana celular se analizó por marcación directa o indirecta utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Para ello, las células se lavaron con PBS suplementado con 1% de albúmina bovina (AB) y se centrifugaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Alícuotas de $2-5 \times 10^5$ células resuspendidas en un volumen de 20 μ l de PBS-AB se incubaron con los anticuerpos respectivos en concentraciones saturantes (5-20 μ g/ml)

durante 30 minutos a 4°C. Luego las células fueron lavadas en PBS-AB, resuspendidas en tampón Isoflow (Becton Dickinson) y analizadas inmediatamente en un citómetro FACScan (Becton Dickinson) con el programa CellQuest.

14. PCR cuantitativa en tiempo real:

Los niveles de ARN mensajero (ARNm) del transportador hENT1 y las enzimas dCK y cN-II fueron evaluados por PCR cuantitativa en tiempo real en linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ provenientes de dadores sanos. Para ello, se purificaron las subpoblaciones T utilizando perlas magnéticas cubiertas con anticuerpos anti-CD4 o CD8 (Dyna). La pureza de cada población fue chequeada por análisis citométrico y fue mayor al 95%. La extracción de ARN se realizó a partir de 3x10⁶ linfocitos utilizando TRIZOL *Reagent* (Gibco, Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir del ARN total, utilizando el *Superscript II reverse transcriptase kit* (Life Technologies, Grand Island, NY). La PCR cuantitativa se realizó en un ciclador de Roche (Lightcycler detection System). Para ello el cADN (5 µl) fue mezclado con oligonucleótidos de secuencias específicas (300 nM cada uno), LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) (hENT1) o con sondas de hibridización de LightCycler-FastStart DNA (Roche) (18S, dCK and cN-II), y sondas (130 nM; si era necesario) en un volumen total de 20 µl por 40 cycles. Las secuencias de los primers y sondas son las siguientes:

Para dCK:

primer forward: 5'-AAACCTGAACGATGGTCTTTTACC,

primer reverse: 5'-CTTTGAGCTTGCCATTCAGAGA

la sonda: 5'-FAM-CAAACATATGCCTGTTCTCAG TCGAATAAGAGCTCC-TAMRA.

Para cN-II:

primer forward: 5'-ACCTGCTGTATTACCCTTTCAGCTA,

primer reverse: 5'-GCTCCACCGTTGATTCATGA

sonda: 5'-FAM-CTCTTCAGGGCTGCCCATGTC TTGA-TAMRA.

Para ENT1:

primer forward: 5'-CACCAGCCTCAGGACAGATACAA,

primer reverse: 5'-GTGAAATACTGAGTGGCCGTCAT

sonda: 5'-FAM-CCACGGGAGCAGCGTTCCCA.

Los datos se expresan como C_t , que es el ciclo de la PCR en el cual la fluorescencia acumulada en cada reacción se cruza con el nivel umbral. Todas las muestras fueron analizadas en tres experimentos independientes y los valores medios de C_t de cada muestra para el gen de estudio se normalizó con respecto a los niveles de expresión de ARN ribosomal 18S de la misma muestra ($\Delta C_t = C_t$ medio de la muestra $- C_t$ medio del control). Los resultados fueron expresados como $2^{-(\Delta C_t)}$ unidades arbitrarias de PCR.

15. Western-blot:

Mediante esta técnica se evaluó la expresión de la MAPK ERK (fosforilada y total) y de actina en células U937. Para ello, las células U937 se expusieron a fludarabina en las concentraciones y tiempos indicados en la leyenda de la correspondiente figura y se lavaron con PBS frío. El *pellet* celular de cada muestra fue resuspendido en *loading buffer* (60mM Tris pH6.8, 2.3% SDS, 10% Glicerol, 0.01% azul de bromofenol y 5% β -Mercaptoetanol) siendo inmediatamente calentadas por 5 min a 96°C. El calentamiento de las muestras y la utilización de un agente reductor como el β -mercaptoetanol provocan la desnaturalización de las proteínas presentes. Las proteínas fueron luego corridas en geles de poliacrilamida (10%) y transferidas a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron primeramente con los anticuerpos dirigidos contra fosfo-ERK, ERK total o β -actina y luego, con los segundos anticuerpos conjugados con peroxidasa (HRP). Las bandas específicas se revelaron utilizando el *kit* de quimioluminiscencia ECL. Las bandas obtenidas

en los films de revelado se densitometraron empleando el Software ImageQuant.

16. Determinación de la secreción de IL-8:

Con el objeto de cuantificar los niveles de IL-8 liberados al sobrenadante de cultivo de células U937 se utilizó el método de enzoinmunoensayo (ELISA). Para ello, los sobrenadantes se recogieron en los tiempos indicados en las leyendas de las figuras correspondientes y se congelaron inmediatamente a -70°C hasta el momento de la medición. Las concentraciones de IL-8 se evaluaron con el *kit* comercial de R&D Systems (Minneapolis, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del test para la citoquina fue de 3 pg/ml.

17. Evaluación de la actividad del factor de transcripción AP-1:

Para el ensayo de movilidad electroforética (EMSA) las células se expusieron a Flu por distintos periodos de tiempo, luego fueron lavadas dos veces en PBS frío y los pellets se resuspendieron en un buffer (A) (10 mM HEPES (pH: 7.9), 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl_2 , 0.5 % Nonidet 40). Las proteínas nucleares se prepararon lavando el pellet nuclear con un buffer de alta sal (B) (10 mM HEPES (pH: 7.9), 1.5 mM MgCl_2 , 0.42 M KCl_2 , 0.25 M EDTA, 20 %Glycerol) mediante agitación constante durante 15 minutos a 4°C . Las reacciones de unión al ADN se realizaron en buffer C (10 mM HEPES (pH: 7.9), 60 mM KCl_2 , 0.25 M EDTA, 20 %Glycerol). Todos estos buffers contienen inhibidores de proteasas: leupeptina (10 $\mu\text{g/ml}$), aprotinina (10 $\mu\text{g/ml}$), pepstatina A (1 $\mu\text{g/ml}$), fenilmetilsulfoxil fluoride (1 mM) y dithiotreitol (1 mM).

Los extractos nucleares se almacenaron a -70°C y los EMSA se realizaron utilizando un oligonucleótido marcado con $[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ que comprendía la secuencia consenso para AP-1 (5'-CGCTTGATGCAGCCGGAA-3'). Cinco microgramos de cada extracto nuclear se incubaron en 20 μl de un buffer con la adición de 100 ng of poly(dI-dC), para eliminar el pegado inespecífico. Luego de 20 min de incubación a temperatura ambiente con el oligonucleótido marcado radioactivamente, los complejos de proteína y ADN se corrieron en un gel no desnaturizante 6% poliacrilamida en buffer TBE 0.25x. Los gels se secaron y fueron revelados por autorradiografía a -70°C . La identidad de cada banda se confirmó por ensayos de competencia mediante la adición de oligonucleótido consenso sin marcar (frío) y por la preincubación con un anticuerpo monoclonal específico para c-Jun (supershift).

18. Análisis estadísticos de los datos:

Para analizar estadísticamente los datos obtenidos se utilizó el test no-paramétrico de Wilcoxon.

RESULTADOS

1. Sensibilidad de las poblaciones leucocitarias de sangre periférica a la inducción de apoptosis por Flu

Como se ha indicado en la Introducción, Flu es utilizada en oncología para el tratamiento de diversas neoplasias hematológicas con baja tasa de replicación, en particular la leucemia linfática crónica (LLC-B) (20,21). Si bien se sabe que el tratamiento con Flu induce una linfopenia severa de células T y, en menor medida, una neutropenia, hasta el momento no se ha realizado un estudio comparativo de la sensibilidad de las distintas poblaciones leucocitarias de sangre periférica a Flu. Por lo tanto, el primer objetivo de este trabajo de tesis fue investigar la susceptibilidad de monocitos, granulocitos neutrófilos, eosinófilos, linfocitos B y T, células NK y células dendríticas a la acción citotóxica de Flu *in vitro*.

1.a) Sensibilidad de los monocitos a Flu:

Para obtener una población altamente enriquecida (>90% de células CD14⁺) de monocitos de sangre periférica humana se utilizó la técnica de centrifugación sobre gradientes de Percoll, tal como se describe en Materiales y Métodos. Una vez resuspendidos en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, los monocitos se incubaron durante 72 hs con distintas concentraciones de Flu. Diariamente se evaluaron los niveles de apoptosis mediante microscopía de fluorescencia utilizando la coloración con naranja de acridina y bromuro de etidio. En la Figura 1 se observan los porcentajes de apoptosis inducidos por Flu a 24, 48 y 72 horas (n=18).

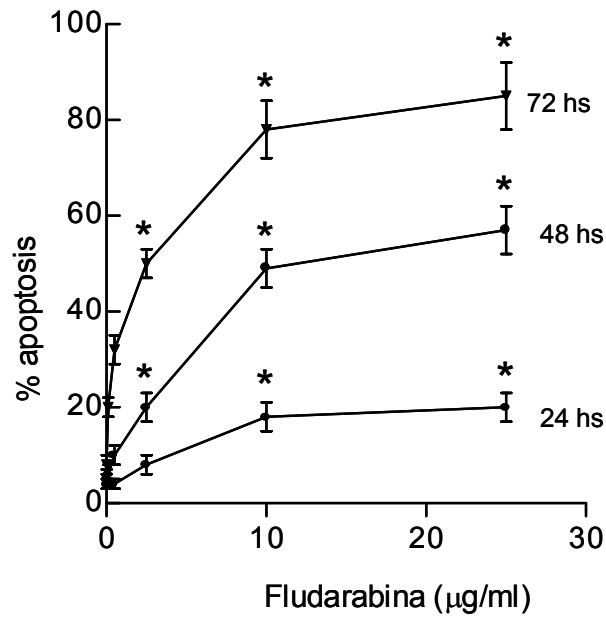


Figura 1: Inducción de apoptosis de monocitos por concentraciones crecientes de Flu.

Los monocitos ($2-3 \times 10^5/\text{ml}$) de sangre periférica se incubaron durante 72 hs con distintas concentraciones de Flu. La apoptosis de los cultivos celulares se determinó por microscopía de fluorescencia, según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como la media \pm ES de al menos 5 dadores diferentes.

* $p < 0.01$ comparado con las células incubadas en ausencia de Flu.

Como se muestra en la Figura 1, los monocitos periféricos humanos son sensibles a la actividad pro-apoptótica de Flu. Es así que concentraciones de Flu de $10 \mu\text{g/ml}$ durante 48 horas inducen niveles de apoptosis de alrededor de 50%.

La inducción de apoptosis por Flu fue corroborada por citometría de flujo mediante otras dos metodologías: a) cuantificación de hipodiploidía con yoduro de propidio y b) marcación con anexina V-FITC (Figura 2).

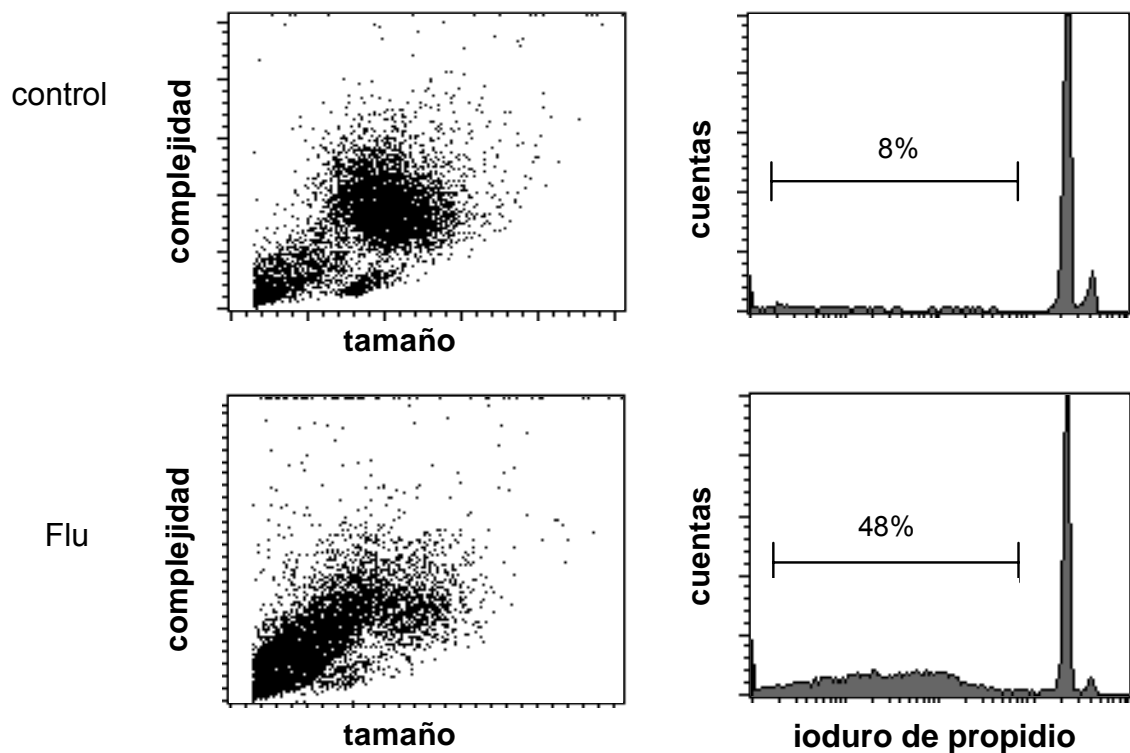


Figura 2: Evaluación de la apoptosis de monocitos inducida por Flu mediante determinación del contenido de ADN hipodiploide y análisis por citometría de flujo.

Los monocitos ($2-3 \times 10^5/\text{ml}$) de sangre periférica se incubaron con Flu ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) durante 48 hs. La apoptosis se determinó por cuantificación del contenido hipodiploide de ADN utilizando el colorante ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo (histogramas de la derecha). Los gráficos de dot plot (columna de la izquierda) corresponden a los parámetros FSC (tamaño, eje x) y SSC (complejidad granular, eje y) que permiten evaluar la inducción de apoptosis tomando en cuenta la disminución del tamaño de las células apoptóticas y su menor complejidad. Experimento representativo (n=5).

Los gráficos de *dot plot* de la Figura 2 muestran los cambios en el tamaño y la complejidad granular de las células expuestas a Flu. Como puede observarse, la población de células viables (de mayor tamaño y complejidad celular) disminuye significativamente al cultivarse en presencia de Flu, incrementándose la población de menor tamaño y menor complejidad (apoptóticas). Los histogramas de la columna de la derecha muestran el pico de ADN diploide correspondiente a las células viables y a la izquierda del mismo, la región correspondiente a ADN hipodiploide indicativo de pérdida de

ADN por apoptosis. Esta técnica utiliza el contenido de ADN nuclear como marcador de apoptosis valiéndose de la propiedad del yoduro de propidio de intercalarse entre las bases del ADN. Durante la apoptosis una porción del ADN nuclear se separa de la célula como cuerpo apoptótico, quedando en consecuencia la célula con un contenido menor de ADN. Como se puede observar en el ejemplo representativo de la Figura 2, al cultivar monocitos humanos con Flu 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 48 horas, la región hipodiploide correspondiente a las células apoptóticas aumenta de un 8% a un 48%.

La segunda técnica con la que se confirmó la capacidad pro-apoptótica de Flu sobre monocitos humanos fue la marcación de la membrana celular con Anexina V-FITC. Esta proteína de unión fosfolipídica calcio-dependiente tiene una alta afinidad por la fosfatidil-serina. Durante los eventos apoptóticos iniciales la membrana plasmática realiza la translocación de fosfatidil-serina desde la cara citoplasmática a la cara externa, siendo reconocida por la Anexina-V ya que presenta afinidad específica por este fosfolípido. En la Figura 3 se muestra un ejemplo representativo de monocitos controles e incubados por 48 hs con Flu (10 $\mu\text{g/ml}$), marcados simultáneamente con Anexina V-FITC y con yoduro de propidio (IP). El IP nos permite distinguir las células apoptóticas más tardías, ya que ingresa al interior celular una vez que la membrana plasmática ha perdido su integridad. Como podemos observar en la Figura 3, la mayor parte de los monocitos controles son negativos para Anexina V-FITC y para IP, mientras que en los expuestos a Flu por 48 hs se incrementa la población Anexina V positiva y también la que se marca doblemente con IP.

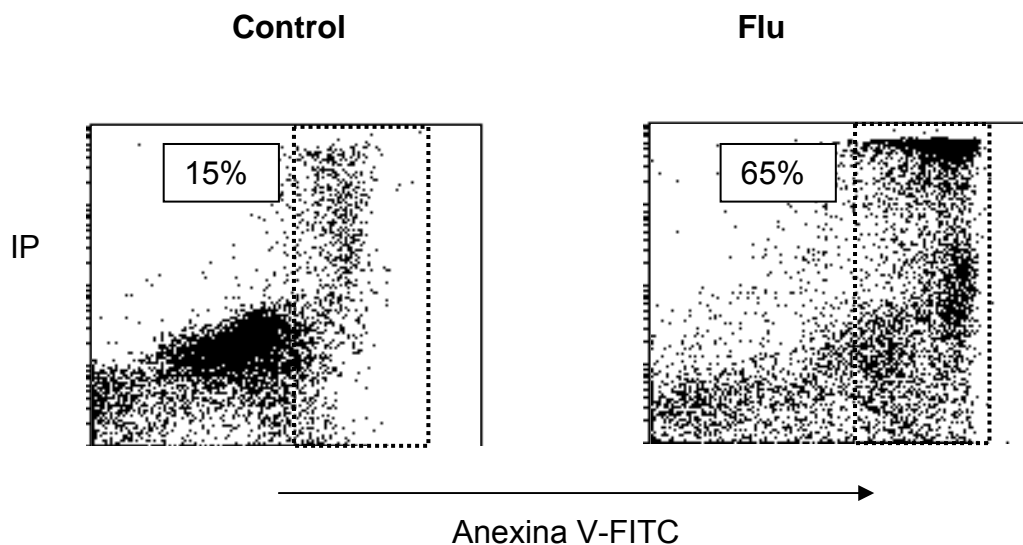


Figura 3: Evaluación de la apoptosis de monocitos inducida por Flu mediante la marcación con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP).

Los monocitos ($2-3 \times 10^5/\text{ml}$) de sangre periférica se incubaron con Flu ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) durante 48 hs. La apoptosis temprana se evaluó determinando la población que une Anexina V-FITC. La apoptosis tardía se evaluó por marcación simultánea con Anexina V-FITC y con IP. El análisis se realizó por citometría de flujo. El recuadro de línea punteada corresponde a las células Anexina V positivas. Se muestran resultados representativos de uno de ocho dadores estudiados.

1.b) Sensibilidad de los granulocitos neutrófilos a Flu:

A continuación se evaluó la sensibilidad a Flu de neutrófilos purificados a partir de sangre periférica por centrifugación sobre Ficoll-Triyosom, seguido de sedimentación en solución de dextrán al 6% y lisis osmótica de los eritrocitos acompañantes. Finalmente los neutrófilos se incubaron en medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino y se determinó el nivel de apoptosis por microscopía de fluorescencia.

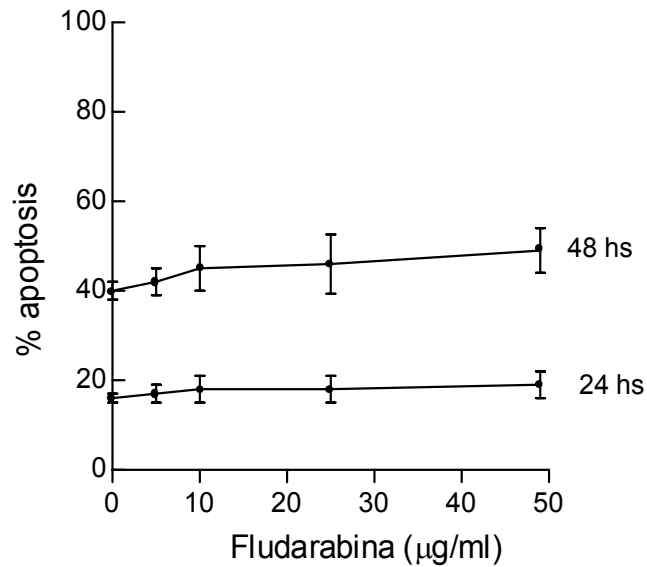


Figura 4: Incapacidad de Flu para inducir la apoptosis de granulocitos neutrófilos.

Los leucocitos polimorfonucleares (93-98% neutrófilos) purificados a partir de sangre periférica se incubaron durante 48 hs con distintas concentraciones de Flu. La apoptosis de los cultivos celulares ($2-3 \times 10^5/\text{ml}$) se determinó por microscopía de fluorescencia, según se describe en Materiales y Métodos, utilizando los colorantes naranja de acridina y bromuro de etidio. Los resultados se muestran como la media \pm ES de al menos 5 dadores diferentes.

Como se observa en la figura 4, la incubación de neutrófilos con Flu por 48 hs no fue capaz de inducir apoptosis. Debido a que los neutrófilos sufren elevados niveles de apoptosis espontánea *in vitro*, los cultivos no pudieron prolongarse más que por 48 hs. Cabe señalar que concentraciones muy altas de Flu (100-200 µg/ml) tampoco lograron inducir apoptosis de los neutrófilos, lo que sugiere que este tipo celular no expresa los transportadores de nucleósidos responsables del ingreso de la droga a la célula y/o es deficiente en alguna de las enzimas necesarias para la fosforilación de Flu.

1.c) Sensibilidad de los granulocitos eosinófilos a Flu:

Los granulocitos eosinófilos constituyen una pequeña proporción de los leucocitos de sangre periférica (1-4%) y se caracterizan por la presencia en el citoplasma de abundantes gránulos que contienen moléculas biológicamente activas como histamina y proteasas . Para evaluar el efecto de Flu sobre la viabilidad de los eosinófilos, se trabajó con la misma población de polimorfonucleares descrita en el punto 1.b) identificándose a los eosinófilos por doble marcación con anticuerpos dirigidos contra los antígenos CD9 y CD23, ya que estas moléculas no se expresa en los neutrófilos.

En la Figura 5.A se muestra un ejemplo representativo del análisis realizado. Como puede observarse, el tratamiento con Flu (50 μ g/ml) *in vitro* no modificó la proporción de células CD9⁺ D23⁺ presente en la población granulocítica. Por el contrario, las células se mantuvieron con sus características de tamaño y complejidad granular tanto en presencia como en ausencia de Flu durante 24 o 48 hs. Como ocurrió en el caso de los neutrófilos, el cultivo en presencia de concentraciones muy altas de Flu (100 y 200 μ g/ml) tampoco fue capaz de inducir apoptosis de los eosinófilos (datos no mostrados). Los datos obtenidos por citometría de flujo se confirmaron por evaluación de la viabilidad celular al microscopio de fluorescencia (Figura 5.B). En conjunto, los resultados indican que los eosinófilos, al igual que los neutrófilos, son resistentes a la acción citotóxica de Flu.

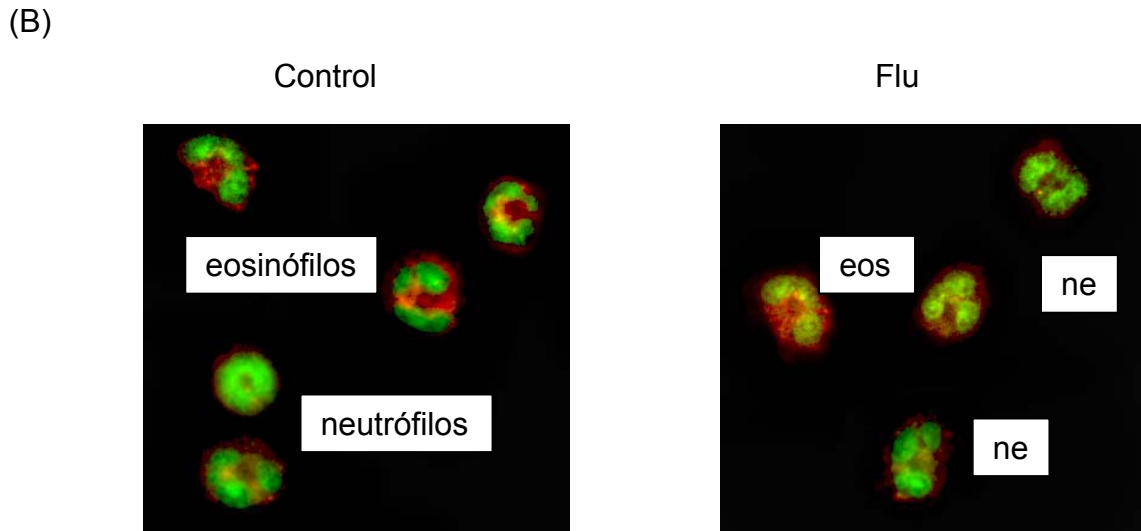
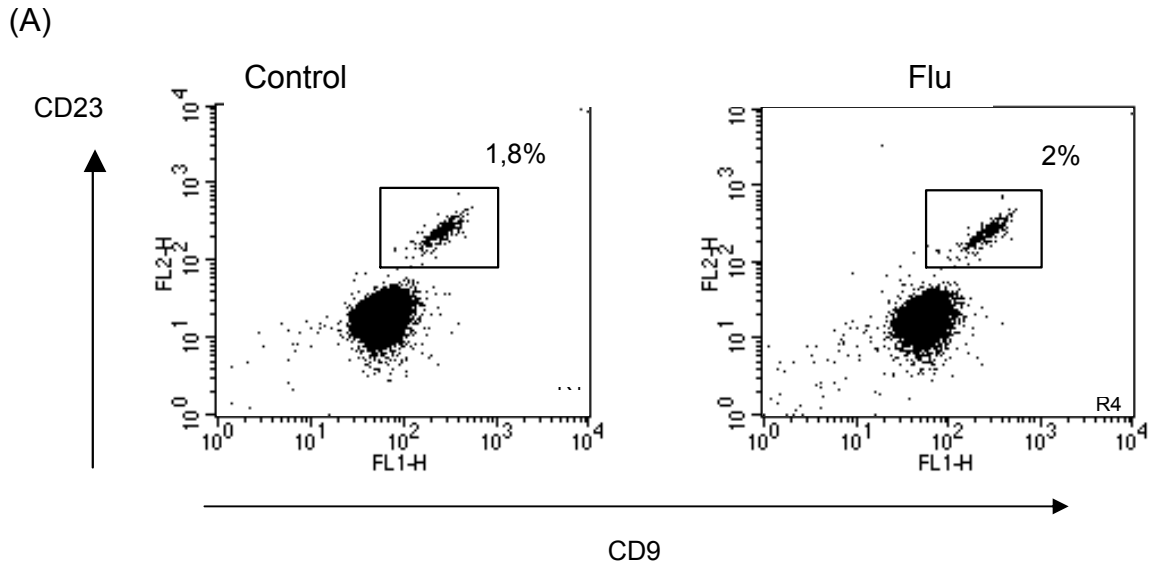


Figura 5: Incapacidad de Flu para inducir la apoptosis de granulocitos eosinófilos.

Los leucocitos polimorfonucleares (2-7% eosinófilos) purificados a partir de sangre periférica se incubaron en una concentración de $2-3 \times 10^5/\text{ml}$ en ausencia o presencia de Flu ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 48 hs. (A) Las células se marcaron con Acs anti-CD9 FITC y anti-CD23 PE y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran los *dot plots* de una muestra representativa de 4 analizadas. (B) La apoptosis se determinó por microscopía de fluorescencia utilizando los colorantes naranja de acridina y bromuro de etidio. Se muestran fotografías representativas (magnificación 400x).

1.d) Sensibilidad de los linfocitos a Flu:

A fin de evaluar el efecto de Flu en la población de linfocitos periféricos humanos, se separaron las células mononucleares no adherentes (linfocitos T, linfocitos B y células NK) tal como se describe en Materiales y Métodos. A continuación, estas células se incubaron en presencia de distintas concentraciones de Flu durante 72 hs, examinándose diariamente el porcentaje de células apoptóticas por microscopía de fluorescencia.

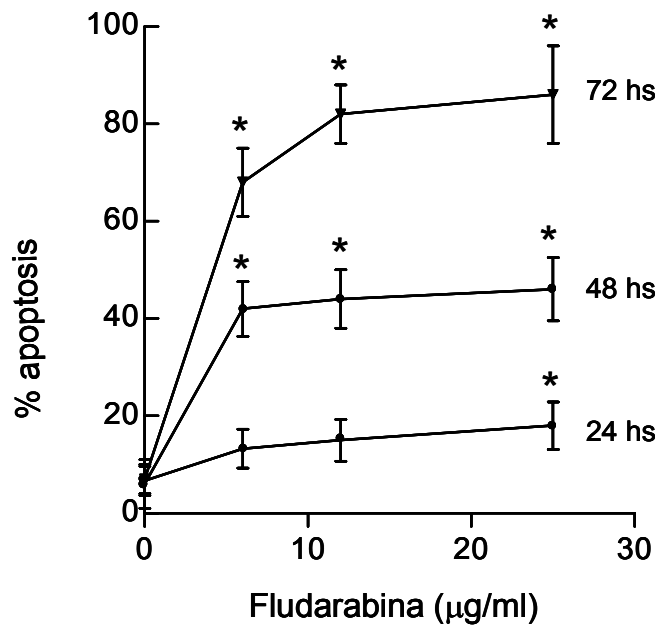


Figura 6: Inducción de apoptosis de linfocitos por concentraciones crecientes de Flu.

Los linfocitos ($2-3 \times 10^5/\text{ml}$) de sangre periférica se incubaron durante 72 hs con distintas concentraciones de Flu. La apoptosis de los cultivos celulares determinó por microscopía de fluorescencia, según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como la media \pm ES de al menos 5 dadores diferentes.

* $p < 0.01$ comparado con las células incubadas en ausencia de Flu.

Como se puede observar en la figura 6, los linfocitos periféricos son susceptibles a la apoptosis por Flu. Cabe destacar que a concentraciones de la droga mayores de 12.5 $\mu\text{g/ml}$, la curva tiende a tomar una forma estacionaria (plateau), indicando que dosis más altas de Flu no tendrían un efecto mayor en la inducción de apoptosis en linfocitos.

Teniendo en cuenta que la población de células no adherentes comprende a los linfocitos T, B y células NK, que podrían diferir en cuanto a su sensibilidad a Flu, se llevaron a cabo marcaciones con anticuerpos específicos para tratar de discriminar estas poblaciones. Para ello, se cultivaron células periféricas no adherentes en presencia de concentraciones crecientes de Flu y al cabo de 48 y 72 hs se realizó una doble marcación con anticuerpos específicos para linfocitos T (anti-CD3 FITC) y linfocitos B (anti-CD19 PE). A continuación se analizaron las células según su tamaño y complejidad granular, tal como se mencionó anteriormente (Figura 2), para tomar en cuenta sólo la región de células viables (Fig 7.A) tanto de las células controles (panel izquierdo) como de las células tratadas con Flu (panel derecho). En la Figura 7.B se muestran gráficos representativos de las poblaciones T y B no apoptóticas en los cultivos controles o expuestos a Flu (12,5 $\mu\text{g/ml}$). Como se puede observar, la población CD19^+ se redujo alrededor de un 50% en los cultivos con Flu, mientras que la población CD3^+ pasó del 71 al 83%. Estos resultados indican que los linfocitos B son más sensibles a la acción citotóxica de Flu que los linfocitos T *in vitro*.

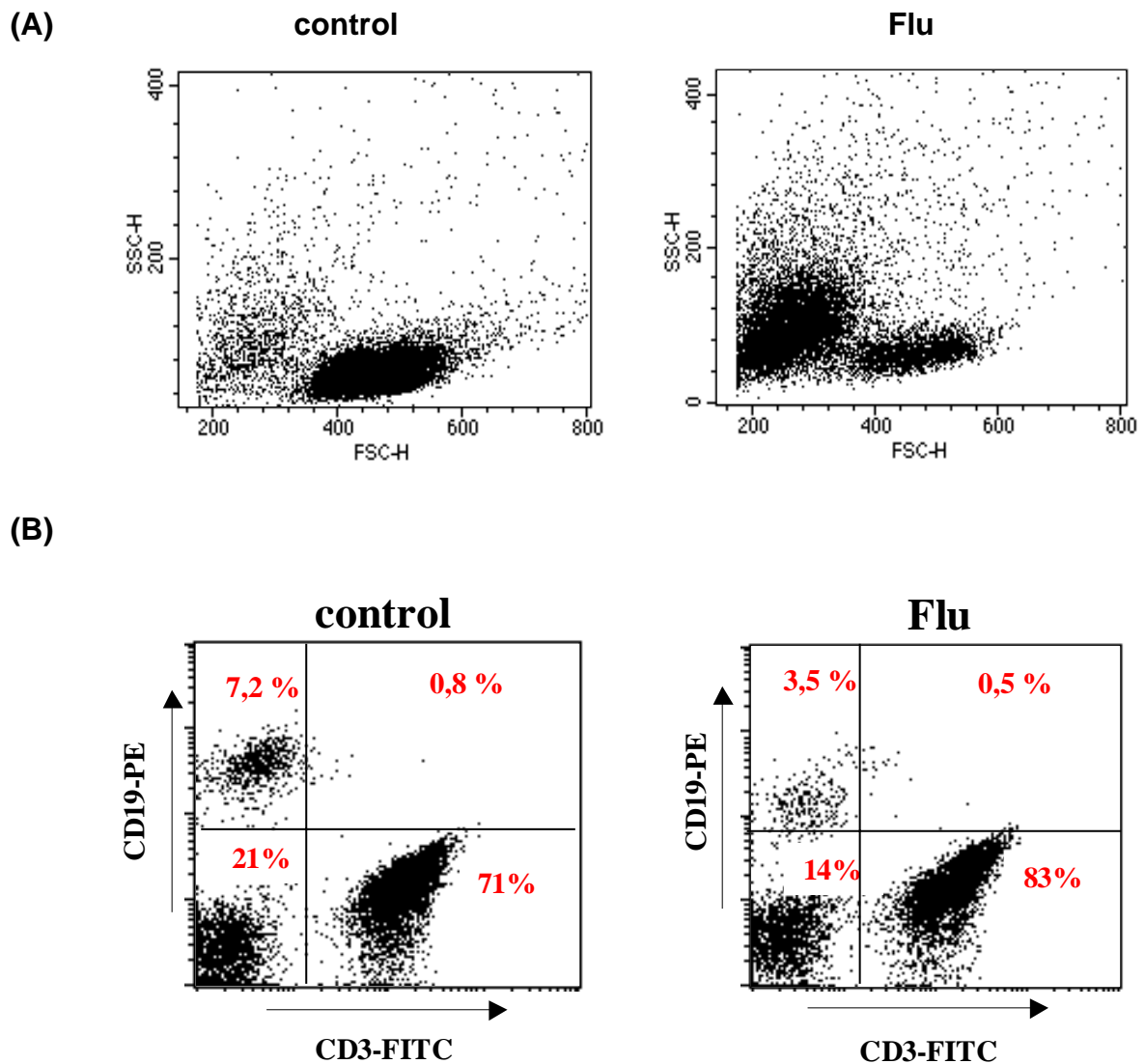


Figura 7: Inducción de apoptosis de linfocitos B y T por Flu y su análisis por citometría de flujo.

Las células mononucleares no adherentes de sangre periférica se cultivaron con Flu (12,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 hs. Las células se marcaron con anticuerpos anti-CD19 PE y anti-CD3 FITC, determinándose la proporción de linfocitos B y T en la región correspondiente a las células viables.

Los resultados son representativos de 4 donadores analizados.

Los resultados de la Figura 7.B también muestran que la proporción de linfocitos CD19⁻ CD3⁻ correspondiente a las células NK, disminuye por efecto de Flu. Para confirmar que la población NK es más sensible a la acción citotóxica de Flu que los linfocitos T, las células tratadas por 48 hs con la droga se marcaron con anticuerpos anti-CD3 (antígeno expresado por los linfocitos T) y anti-CD2 (antígeno expresado tanto por linfocitos T como por células NK). En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos con una de tres muestras evaluadas.

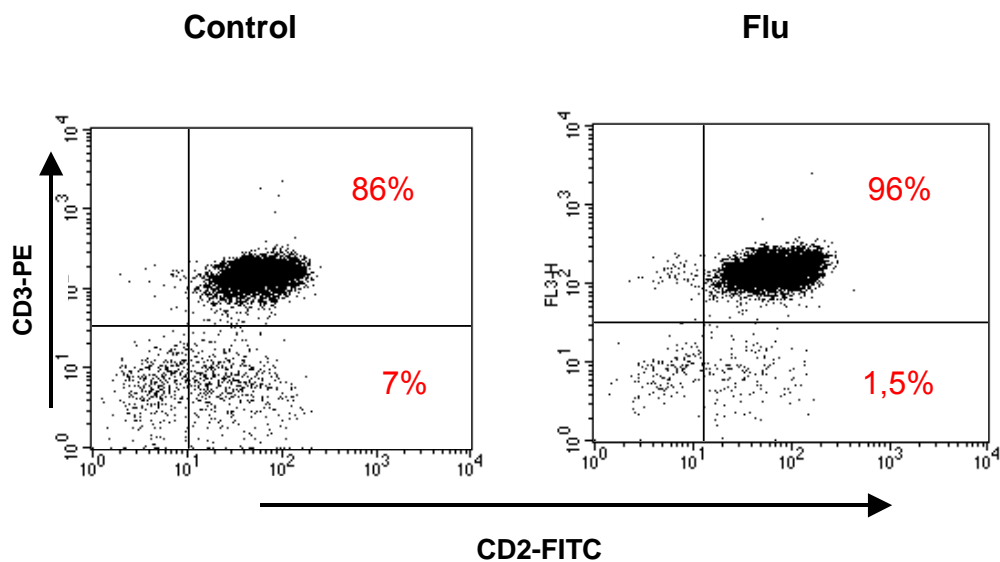


Figura 8: Análisis de las poblaciones T y NK por citometría de flujo luego de la exposición a Flu.

Las células mononucleares no adherentes de sangre periférica se cultivaron con o sin Flu (12,5 µg/ml) durante 48 hs y se marcaron con anticuerpos anti-CD3 PE y anti-CD2 FITC. El análisis se realizó en la región correspondiente a las células viables. Se muestran *dot plots* representativos de una de tres muestras analizadas

1.e) Sensibilidad de las células dendríticas a Flu:

Teniendo en cuenta que se desconoce si las células dendríticas son sensibles a la actividad citotóxica de Flu, se decidió investigar este punto en células dendríticas mieloides diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica. Para ello se cultivaron monocitos purificados por Percoll con IL-4 (10 ng/ml) y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-SCF, 10 ng/ml) durante 5 días. Al quinto día, más del 90% de las células expresaron altos niveles de CD1a, marcador específico de células dendríticas. Fue entonces que incubaron con distintas concentraciones de Flu y se evaluó la apoptosis a 24, 48 y 72 horas por microscopía de fluorescencia.

En la figura 9 se muestran las curvas dosis-respuesta de esta población leucocitaria ante la acción de Flu. Como se puede observar, las células dendríticas fueron sensibles a la inducción de apoptosis por Flu siendo su sensibilidad muy similar a la de los monocitos (ver Figura 1).

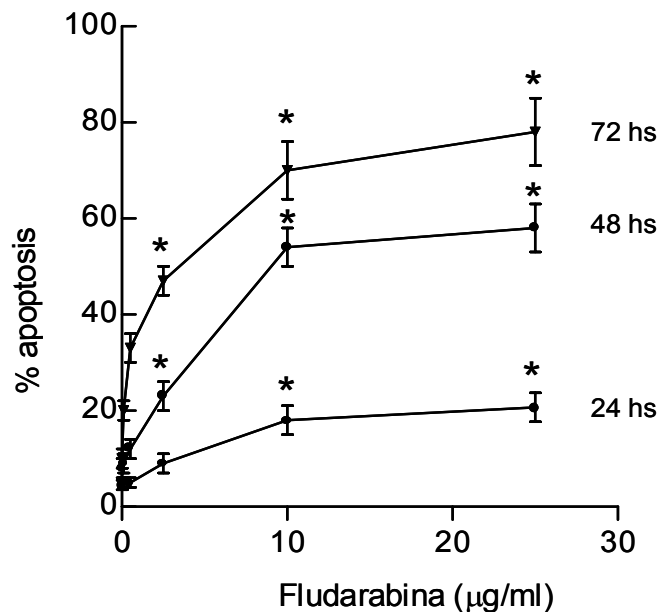


Figura 9: Inducción de apoptosis de células dendríticas por concentraciones crecientes de Flu.

Las células dendríticas ($2-3 \times 10^5/\text{ml}$) obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica se incubaron durante 72 hs con distintas concentraciones de Flu. La apoptosis de los cultivos celulares determinó por microscopía de fluorescencia, según se describe en Materiales y Métodos, utilizando los colorantes naranja de acridina y bromuro de etidio. Los resultados se muestran como la media \pm ES de al menos 5 dadores diferentes.

$p < 0.01$ comparado con las células incubadas en ausencia de Flu.

El conjunto de estos resultados indica que todas las poblaciones de leucocitos mononucleares provenientes de sangre periférica humana son sensibles a la acción pro-apoptótica de Flu siendo los linfocitos B y las células NK las poblaciones más sensibles. Por el contrario, los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos son resistentes.

2. Susceptibilidad diferencial de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a Flu

2.a) Sensibilidad de las subpoblaciones T CD4⁺ y CD8⁺ a Flu:

La administración de Flu en pacientes con leucemia linfática crónica induce una profunda y prolongada linfopenia que afecta preferentemente a los linfocitos T CD4⁺ (170, 171). Es así como, inmediatamente finalizado el tratamiento, el número absoluto de linfocitos CD4⁺ desciende hasta 10 veces mientras que el número de linfocitos CD8⁺ se reduce a una tercera parte. Esto da como resultado que la relación CD4:CD8 se invierta y permanezca de esta manera durante meses. El mecanismo responsable de la depleción preferencial de linfocitos T CD4⁺ no ha sido dilucidado aún. Si bien se propone que la población CD4⁺ sería especialmente sensible a la acción citotóxica de Flu, no puede descartarse que existan diferencias en la recuperación de las poblaciones T post-tratamiento. De hecho, se ha demostrado que los linfocitos T CD8⁺ se regeneran más rápidamente que los CD4⁺, en particular en personas mayores (153,154,155). Teniendo en cuenta estos antecedentes, el próximo objetivo planteado fue determinar si existen diferencias en la susceptibilidad de las subpoblaciones de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) a la inducción de apoptosis *in vitro* por Flu. Para tal fin, se trataron células mononucleares totales (CMT) provenientes de donadores normales con Flu (5 µg/ml) durante 72 hs. Luego se marcaron las células simultáneamente con anticuerpos anti-CD3-PE y antiCD4-FITC o anti-CD3-PE y anti-CD8-FITC y se aplicó el mismo criterio de análisis por citometría de flujo que fue descripto para el caso de las poblaciones de linfocitos T y B (ver página 56).

En la Figura 10 se muestran los resultados de un ejemplo representativo (n=17).

Como puede observarse en la Figura 10.A, las células apoptóticas se diferencian de las viables por su tamaño y complejidad celular, evidenciándose la inducción de apoptosis con Flu. Es así que a las 72 hs de cultivo, la proporción de linfocitos apoptóticos pasa del 25% en el control al 58% en presencia de Flu (10 μ g/ml). En el panel B se muestran los resultados obtenidos al realizar el análisis por citometría de flujo de las células marcadas con anticuerpos anti-CD3/anti-CD4 (columna izquierda) y anti-CD3/anti-CD8 (columna derecha). Se encontró que la proporción de linfocitos T CD4⁺ viables se incrementó en los cultivos expuestos a Flu (72% vs 90%, control vs Flu)(Figura 10.B). De manera concomitante, la población T CD8⁺ disminuyó del 28% al 10% como consecuencia del tratamiento con Flu, lo que da como resultado una relación CD4:CD8 aumentada. Los datos obtenidos demostraron que los linfocitos T CD8⁺ son más sensibles a la inducción de apoptosis por Flu que los CD4⁺.

La Figura 11.A muestra los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ viables luego de 72 hs de incubación en presencia o no de Flu para el total de las muestras analizadas. Puede observarse que en 15 de las 17 muestras evaluadas se produjo un aumento en la proporción de linfocitos T CD4⁺ viables y una concomitante baja en los T CD8⁺ como consecuencia del tratamiento con Flu. Estas diferencias dieron como resultado una relación CD4:CD8 incrementada en los cultivos tratados con respecto a los controles (Figura 11.B).

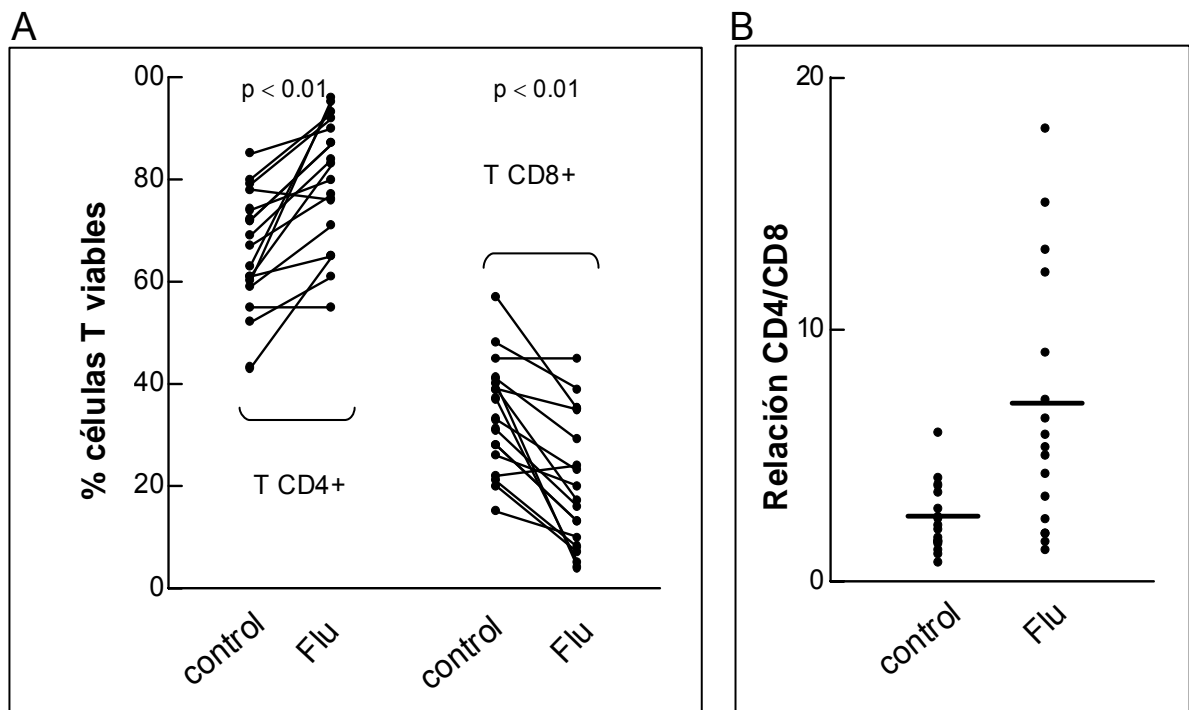


Figura 11: Susceptibilidad diferencial de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a Flu en 17 dadores sanos.

(A) Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ viables luego de 72 hs en ausencia (control) o en presencia de Flu (10 µg/ml). (B) Relación CD4:CD8 en los cultivos tratados con Flu (p<0.01). Cada punto representa una muestra individual. Las medias se indican con una línea.

La mayor susceptibilidad de los linfocitos T CD8⁺ a la apoptosis inducida por Flu se confirmó por marcación de las células con Anexina-V FITC y análisis por citometría de flujo. Como puede verse, el tratamiento con Flu aumentó el porcentaje de células Anexina-V positivas tanto en la población CD4⁺ como en la CD8⁺. Sin embargo, el aumento alcanzado fue significativamente mayor en los linfocitos T CD8⁺.

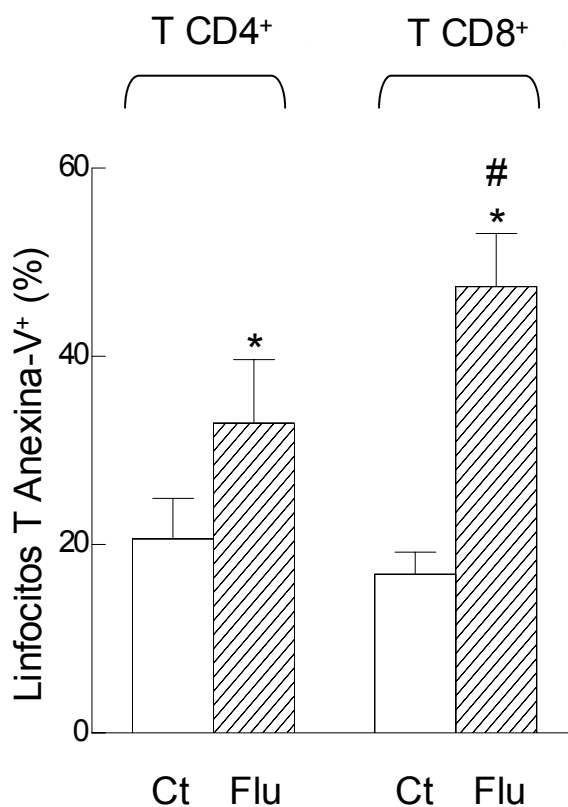


Figura 12: Inducción de apoptosis de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ por Flu evaluada por unión de Anexina-V FITC.

Las células mononucleares de sangre periférica de dadores normales se cultivaron por 72 hs en presencia o ausencia de Flu (10 µg/ml). El porcentaje de células Anexina-V positivas en las poblaciones de linfocitos T se evaluó por doble marcación con anticuerpos anti- CD4⁺ o anti-CD8⁺ PE y Anexina-V-FITC. Los resultados se expresan como la media ± ES de ocho muestras evaluadas.

(*) Estadísticamente significativo ($p < 0,01$) comparado con células controles.

(#) Estadísticamente significativo ($p < 0,05$) comparado con linfocitos T CD4⁺ tratados con Flu.

2.b) Sensibilidad de las subpoblaciones T CD4⁺ y CD8⁺ a Flu en pacientes LLC-B:

La mayor susceptibilidad de los linfocitos T CD4⁺ a la apoptosis inducida por Flu *in vitro* contrasta con lo observado durante el tratamiento de pacientes

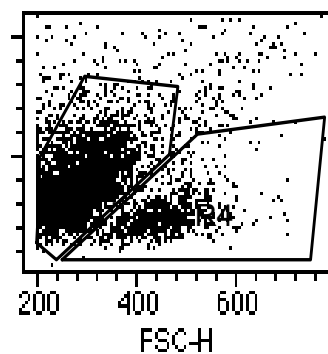
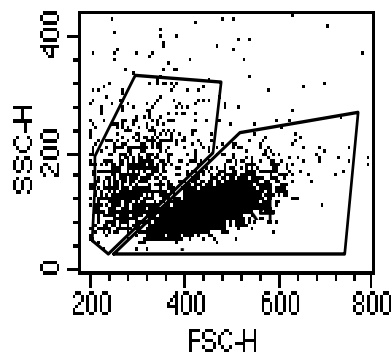
LLC-B, ya que Flu induce una prolongada linfopenia T CD4⁺ que revierte la relación CD4:CD8 normal (156,157). Como se mencionara en la Introducción de esta tesis, los linfocitos T de los pacientes LLC-B presentan numerosas alteraciones tanto fenotípicas como funcionales (126,127,128) que podrían explicar un comportamiento particular a Flu. Por lo tanto, resultaba necesario investigar si la diferencia en la susceptibilidad de las subpoblaciones de linfocitos T a Flu ocurre en los pacientes LLC-B de manera similar a lo observado en normales. Para ello se purificaron células mononucleares de sangre periférica de pacientes LLC-B y se cultivaron con Flu (10 µg/ml) durante 72 hs. Los linfocitos T se marcaron con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 y se realizó el mismo análisis por citometría de flujo detallado en el punto anterior.

En la Figura 13, se muestran resultados de un paciente representativo. Como puede observarse, la población de linfocitos T CD4⁺ viables se incrementó de un 69% a un 88% como consecuencia del tratamiento con Flu, mientras que la población CD8⁺ se redujo del 31% al 12% (panel B), indicando que, como ocurre en los dadores sanos, los linfocitos T CD8⁺ de pacientes LLC-B son más sensibles *in vitro* al efecto pro-apoptótico de Flu.

(A)

Control

Flu



(B)

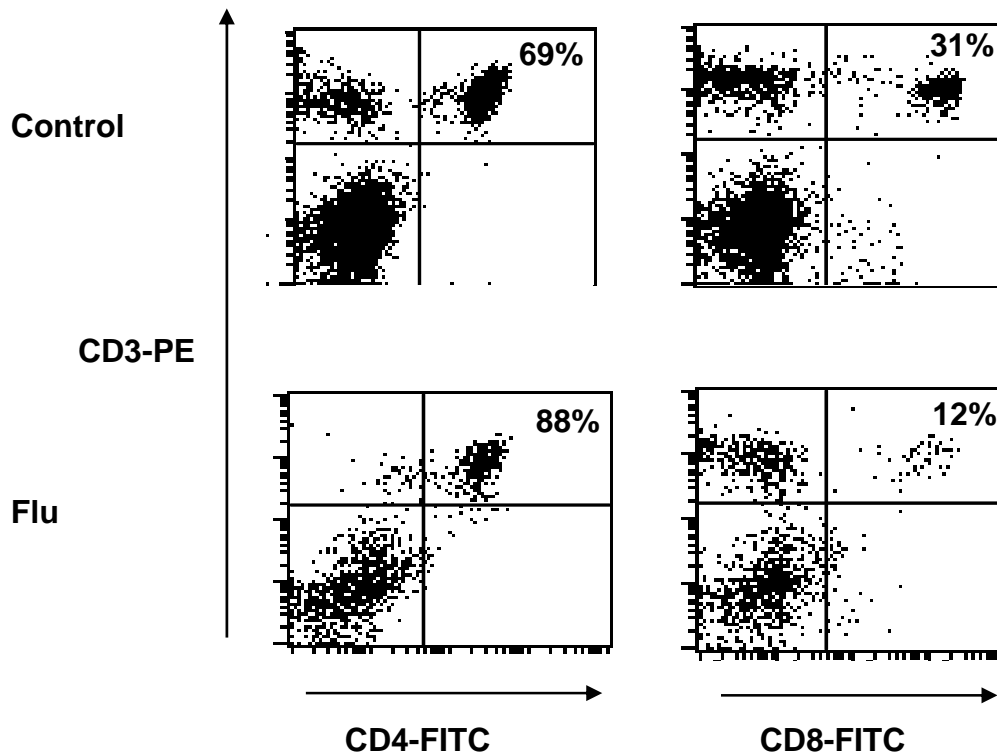


Figura 13: Inducción de apoptosis de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes LLC-B por cultivo *in vitro* con Flu.

Las células mononucleares ($2 \times 10^6/\text{ml}$) de sangre periférica proveniente de pacientes LLC-B se incubaron en presencia o ausencia de Flu ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) por 72 hs a 37°C . (A) Gráficos de tamaño (FSC) versus complejidad granular (SSC) para distinguir células viables de apoptóticas. (B) Las células se marcaron con anticuerpos anti-CD3 PE y anti-CD4 FITC o anti-CD8 FITC, determinándose la proporción de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ en la región correspondiente a las células viables. Se muestran resultados representativos de un total de 17 muestras analizadas.

Esta misma tendencia se observó en todas las muestras de pacientes LLC-B analizadas (Figura 14).

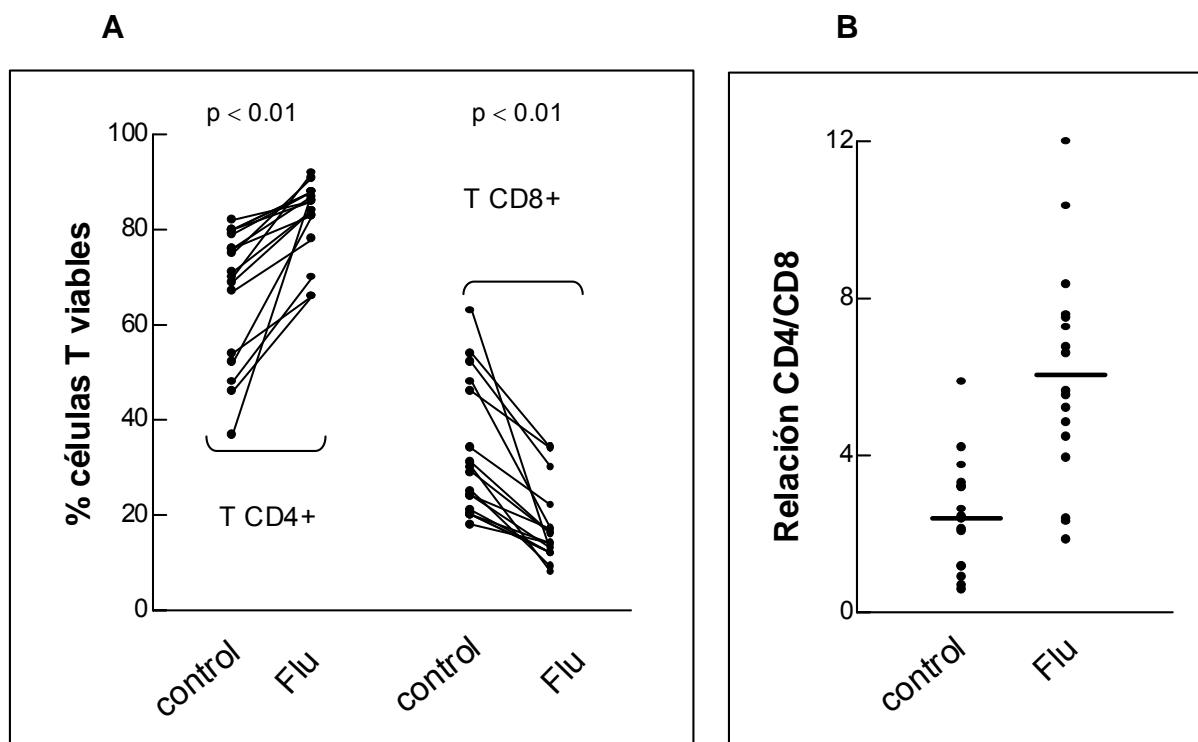


Figura 14: Susceptibilidad diferencial de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a Flu en 17 pacientes LLC-B.

(A) Porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ viables luego de 72 hs en ausencia (control) o en presencia de Flu (10 μg/ml). (B) Relación CD4:CD8 en los cultivos tratados con Flu (p<0.01). Cada punto representa una muestra individual. Las medias se indican con una línea.

En conclusión, los resultados indican que los linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica provenientes de dadores normales o pacientes LLC-B son más resistentes a la inducción de apoptosis *in vitro* por Flu que los linfocitos T CD8⁺.

2.c) Expresión de hENT1, dCK y cN-II en las supoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de dadores sanos:

La distinta susceptibilidad de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ a la apoptosis inducida por Flu puede atribuirse a diferencias en el transporte y/o metabolismo del análogo púrico. Tal como se mencionara en la Introducción, Flu ingresa a las células linfoides a través de transportadores nucleosídicos, en particular a través del transportador equilibrativo hENT1 por el cual tiene mayor afinidad (28,29). Una vez dentro de la célula, Flu es fosforilada por la dCK, la enzima inicial y el paso limitante en la serie de fosforilaciones necesarias para transformar a Flu en su forma F-ara-ATP activa (34). Por su parte, la nucleotidasa cN-II revierte la acción de la dCK catabolizando la defosforilación de la forma monofosfato, F-ara-A (35).

Para determinar si las diferencias en la susceptibilidad de las poblaciones de linfocitos T humanos a Flu podían deberse a diferencias en la expresión de alguna de las principales moléculas involucradas en su ingreso intracelular y metabolismo, se analizaron los niveles de expresión de ARNm de hENT1, dCK y cN-II en linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, utilizando la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. Ambas poblaciones linfocitarias se purificaron a partir de células mononucleares provenientes de dadores normales utilizando anticuerpos específicos y perlas magnéticas. Por esta metodología se obtiene una pureza de más del 98% de la población en estudio.

Como se observa en la Figura 15, los niveles de ARNm para el transportador hENT1 fueron levemente mayores en los linfocitos T CD4⁺ en comparación con los CD8⁺. Con respecto a la dCK, se encontró que los linfocitos T CD4⁺ expresan alrededor del 40% de los niveles expresados por los linfocitos T CD8⁺. Mientras que la expresión de la enzima cN-II en las células CD4⁺ es alrededor de un 70% de los niveles expresados por los linfocitos T CD8⁺. Esto da como resultado que la relación dCK/cN-II sea casi dos veces mayor en las células T CD8⁺ (cociente: 1,75) que en las células T CD4⁺

(cociente: 0,94). Teniendo en cuenta que la relación dCK/cN-II es el indicador más relevante del estado global de activación de Flu en las células (52), estos resultados sugieren que la mayor susceptibilidad de los linfocitos T CD8⁺ a Flu *in vitro* podría deberse a una acumulación aumentada del metabolito activo de Flu, F-ara-ATP, en comparación con los linfocitos T CD4⁺.

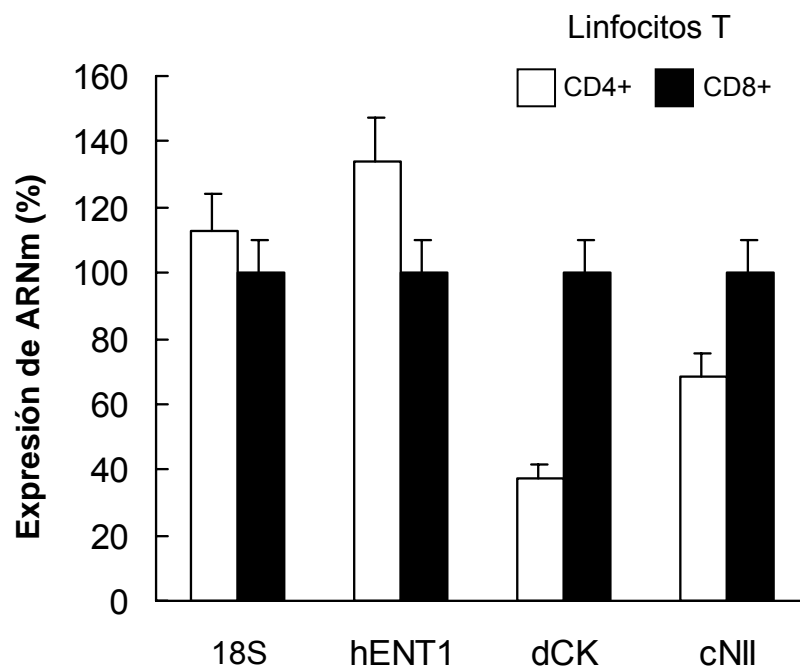


Figura 15: Expresión comparativa del transportador hENT1 y las enzimas dCK y cN-II en linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺.

Se purificaron linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ a partir de sangre periférica de donadores normales utilizando anticuerpos específicos y perlas magnéticas. Los niveles de ARNm de 18S, hENT1, dCK y cN-II se cuantificó por PCR cuantitativa en tiempo real según se detalla en Materiales y Métodos. Para cada factor se consideró la expresión de ARNm en la población T CD8⁺ como 100%.

Los resultados se expresan como la media \pm ES de ocho muestras analizadas.

3. Actividad pro-inflamatoria de Fludarabina en células monocíticas humanas

Como se señalara en la Introducción, Flu es una herramienta terapéutica muy eficiente para el tratamiento de leucemias y linfomas de bajo grado gracias a su actividad pro-apoptótica en células con baja tasa de replicación. Sin embargo, los prolongados tratamientos *in vivo* con Flu llevan aparejados efectos secundarios, como la inmunosupresión o la inducción de anemia hemolítica autoinmune, que limitan su aplicación. El consenso general es que estos efectos se deben a la acción citotóxica de Flu sobre poblaciones leucocitarias normales. De hecho, y tal como demostramos en el capítulo anterior Flu es pro-apoptótica para la mayoría de las células que participan en la respuesta inmune. Otra posibilidad, no explorada hasta el momento, es que Flu no sólo induzca la muerte celular sino también la activación y/o diferenciación leucocitaria, pudiendo de esta forma modificar la respuesta inmune. En este sentido, en células endoteliales humanas se ha demostrado que el cultivo *in vitro* con Flu incrementa la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase I y la capacidad de estas células de estimular a linfocitos T citotóxicos (158).

Sobre la base de estos antecedentes, el siguiente objetivo de este trabajo fue investigar si Flu podía inducir la activación celular y, de ser así, cuáles eran los mecanismos involucrados. Para llevar a cabo estos estudios elegimos como modelo a las células U937, una línea de estirpe monocitoide humana, que en trabajos anteriores demostró ser muy sensible a la actividad pro-apoptótica de Flu (159,160).

3.a) Flu induce la apoptosis de las células U937:

En primer lugar evaluamos la sensibilidad a la apoptosis inducida por Flu de las células U937 cultivadas en nuestro laboratorio. Este punto es de suma importancia ya que está ampliamente demostrado que las células de línea modifican muchos de sus parámetros fenotípicos y funcionales en los sucesivos pasajes durante su amplificación por cultivo *in vitro* (161,162). De hecho, nosotros ensayamos el efecto pro-apoptótico de Flu en células U937 provenientes de tres laboratorios de nuestro medio (Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Instituto de Biología y Medicina Experimental y nuestro banco de células en la Academia Nacional de Medicina) y encontramos diferencias marcadas en la sensibilidad a la droga. En los estudios subsiguientes utilizamos la línea más sensible y tomamos como criterio para el mantenimiento de las células congelarlas luego del primer pasaje y realizar los ensayos con células que no tuvieran más de 4 pasajes.

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos al evaluar por microscopía de fluorescencia, la sensibilidad de las células U937 a distintas concentraciones de Flu. Como puede observarse, estas células mostraron ser muy sensibles a la acción citotóxica de Flu, obteniéndose valores de apoptosis de alrededor del 30% a las 48 horas de cultivo con concentraciones de Flu significativamente menores (0,6 µg/ml) que las que se requieren para inducir apoptosis de células mononucleares humanas.

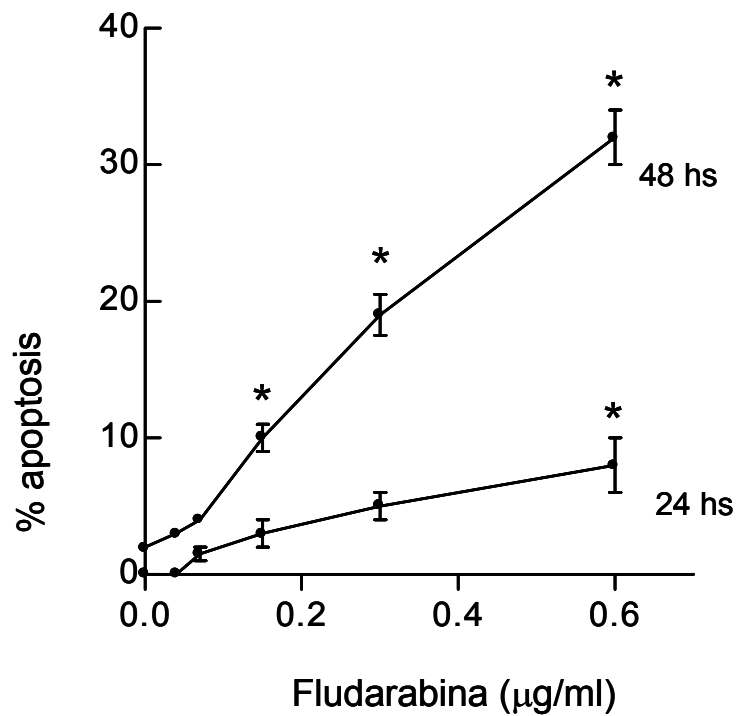


Figura 16: Inducción de apoptosis de células U937 por Flu.

Las células U937 (0.5×10^6 /ml) se incubaron durante 24 o 48 hs con distintas concentraciones de Flu. La apoptosis se determinó por microscopía de fluorescencia, según se describe en Materiales y Métodos, utilizando los colorantes naranja de acridina y bromuro de etidio. Los resultados se muestran como la media \pm ES de 4 experimentos independientes.

* $p < 0.01$ comparado con las células incubadas en ausencia de Flu.

En la Figura 17 se muestran micrografías representativas de células U937 viables y apoptóticas, tal cual se observan al microscopio de fluorescencia. En los cultivos controles, las células presentan una arquitectura nuclear intacta, con héterocromatina laxa, característica de células viables. En cambio, cuando las células son expuestas a Flu ($0,3 \mu\text{g/ml}$) durante 48 horas se observa la aparición de células apoptóticas, en las que el núcleo se ha fragmentado dando lugar a uno o más cuerpos apoptóticos, donde la cromatina se encuentra condensada. Un hecho a destacar es el aumento en el tamaño de las células viables en los cultivos tratados con Flu cuando se las compara con las células viables en los cultivos sin Flu.

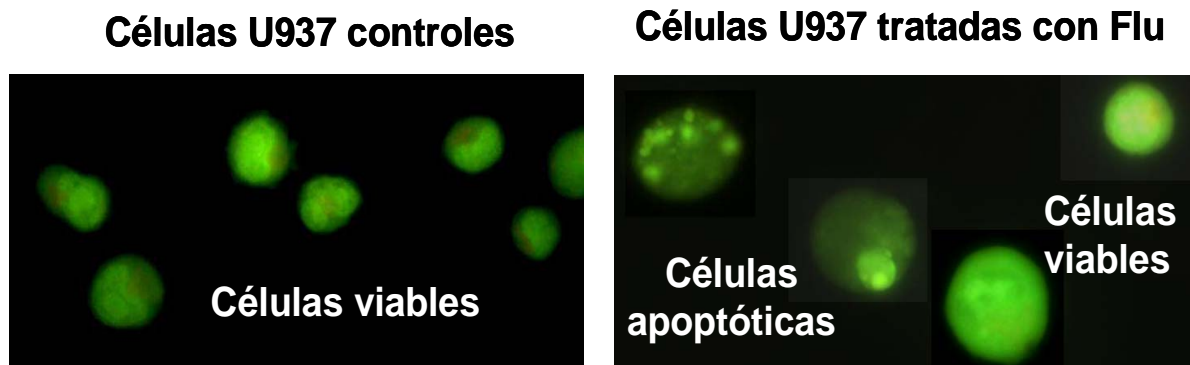


Figura 17: Cambios morfológicos asociados a la inducción de apoptosis de células U937 por Flu.

Las células U937 (0.5×10^6 /ml) se incubaron durante 48 hs con Flu $0,3 \mu\text{g/ml}$. La apoptosis de los cultivos celulares se determinó por microscopía de fluorescencia, según se describe en Materiales y Métodos, utilizando los colorantes naranja de acridina y bromuro de etidio. Se observan fotografías representativas (magnificación 400X).

Estos resultados fueron confirmados mediante la cuantificación del ADN hipodiploide utilizando citometría de flujo. En la Figura 18 se muestran histogramas representativos de células U937 tratadas con dos concentraciones de Flu durante 48 hs. Como puede verse, Flu incrementó en forma dosis-dependiente el porcentaje de células con contenido hipodiploide de ADN.

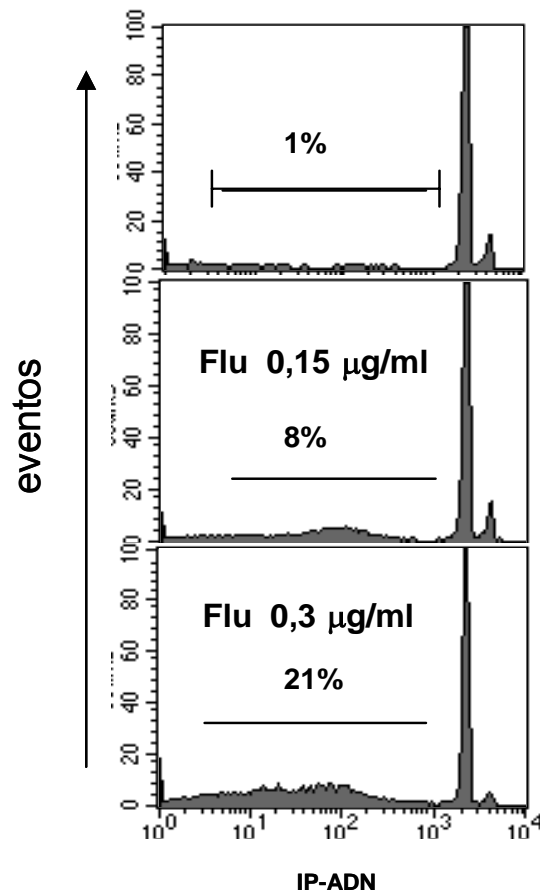


Figura 18: Evaluación de la apoptosis de U937 inducida por Flu mediante determinación del contenido de ADN hipodiploide y análisis por citometría de flujo.

Las células U937 ($0.5 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron con las concentraciones de Flu indicadas durante 48 hs. La apoptosis se determinó por cuantificación del contenido hipodiploide de ADN utilizando el colorante ioduro de propidio (IP) y análisis por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo ($n=5$).

3.b) Flu induce la activación/diferenciación de las células U937:

Como se mencionara anteriormente, las células U937 viables en los cultivos expuestos a Flu presentan al microscopio de fluorescencia, mayor tamaño que las células viables controles (Figura 17). Para poder cuantificar

estos hallazgos, se analizó el tamaño y la complejidad celular por citometría de flujo de las células U937 incubadas en presencia de distintas concentraciones de Flu. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 19.

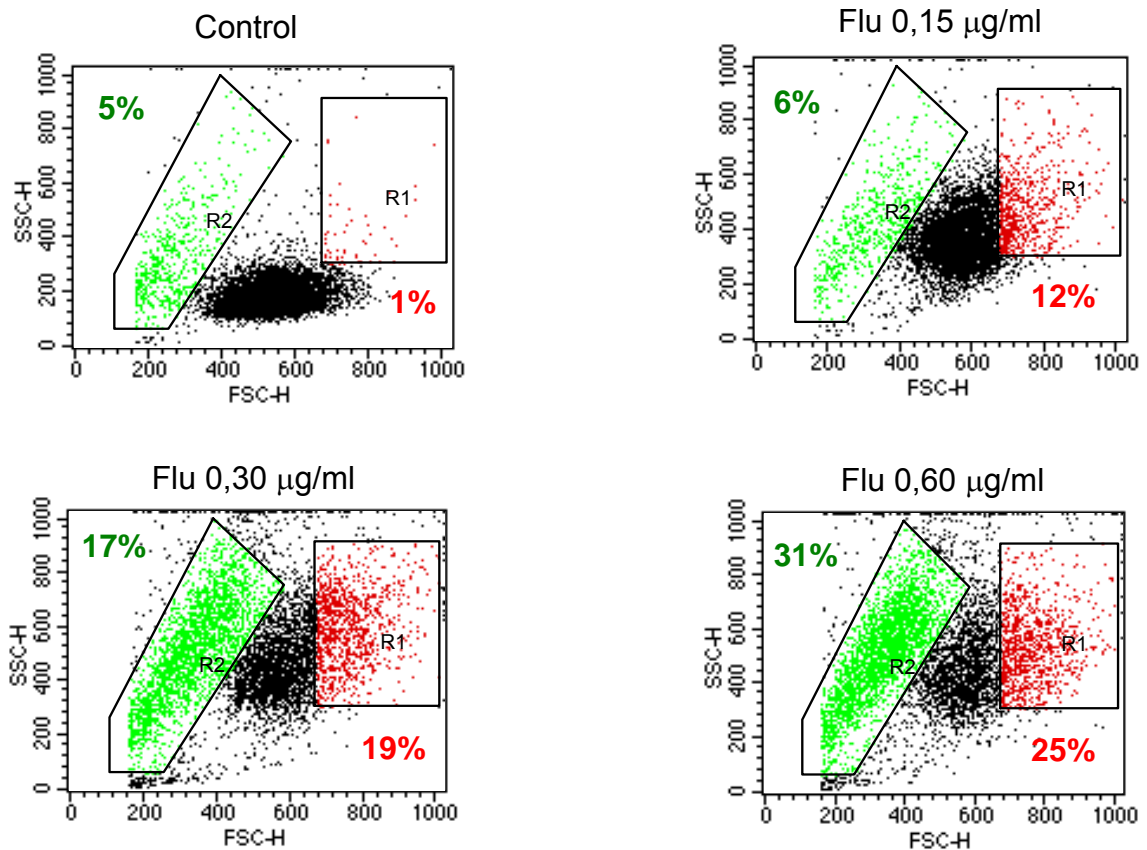


Figura 19: Aumento del tamaño y complejidad celular inducido por Flu en células U937.

Las células U937 (0.5×10^6 /ml) se incubaron en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de Flu durante 48 hs. Al cabo de la incubación se analizaron, por citometría de flujo, los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad granular (SSC). La región R1 (en rojo) corresponde a las células diferenciadas (mayor tamaño y complejidad) y la región R2 (en verde) corresponde a las células apoptóticas.

Se muestran los gráficos de dot plot de un experimento representativo de 4 realizados.

Para realizar el análisis comparativo se determinaron 2 regiones: R1 correspondiente a células grandes y de alta complejidad granular y R2 que corresponde a las células apoptóticas de menor tamaño y complejidad heterogénea. Como puede observarse, la proporción de células apoptóticas aumenta a medida que se incrementa la concentración de Flu en el cultivo. Paralelamente aumenta la proporción de células viables de gran tamaño y complejidad granular, proceso que sería compatible con la inducción de la diferenciación celular.

Para confirmar la capacidad de Flu de inducir la diferenciación de células de estirpe monocítica como las U937, se decidió a continuación evaluar el efecto del análogo sobre la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 (CD54) y la producción de la quemoquina de la familia CXC, IL-8. La elección de estos parámetros se realizó teniendo en cuenta que ambas moléculas juegan un papel central en la adhesión y migración de los leucocitos desde la sangre a los sitios inflamados y que sus niveles de expresión se incrementan rápidamente en respuesta a diferentes estímulos (163,164)

Los resultados de la Figura 20 muestran que la exposición de células U937 a concentraciones muy bajas de Flu por 48 hs aumenta significativamente la expresión de ICAM-1 .

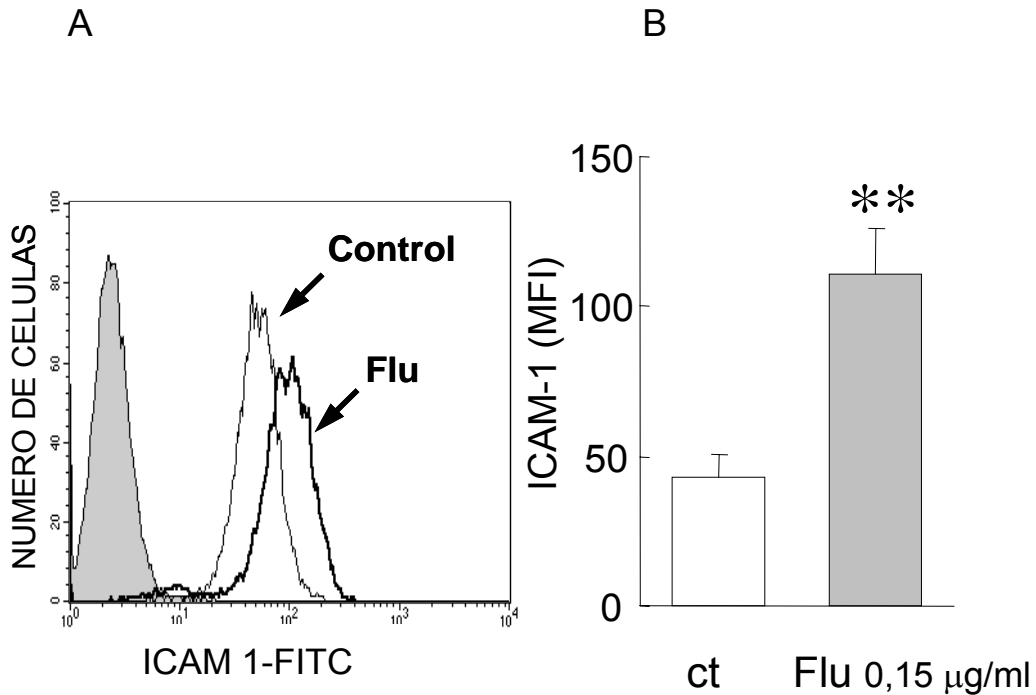


Figura 20: Flu incrementa la expresión de ICAM-1 en células U937.

Las células U937 (0.5×10^6 /ml) se incubaron con Flu ($0,15 \mu\text{g/ml}$) durante 48 hs. La expresión de ICAM-1 se evaluó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico marcado con FITC.

A) Se muestran los histogramas de fluorescencia correspondiente a la expresión de ICAM-1 en células U937 cultivadas en ausencia (Control) o presencia de Flu (Flu). El histograma en gris corresponde al control de isotipo de Ig. Resultados representativos de 5 experimentos independientes.

B) Se grafica la expresión de ICAM-1 como intensidades medias de fluorescencia (MFI) (media \pm ES, n=5).

**estadísticamente significativo ($p < 0,01$) comparado con células incubadas en ausencia de Flu.

Por otro lado, se evaluó, mediante la técnica de ELISA, la concentración de IL-8 secretada al sobrenadante al cultivar células U937 con distintas concentraciones de Flu. Como podemos observar en la Figura 21.A, Flu incrementó en forma dosis-dependiente la producción espontánea de IL-8 por parte de las células U937. Asimismo, se encontró que Flu también es capaz de aumentar la secreción de IL-8 inducida por un clásico estímulo pro-inflamatorio como la interleuquina 1 β (IL-1 β) (Figura 21.B).

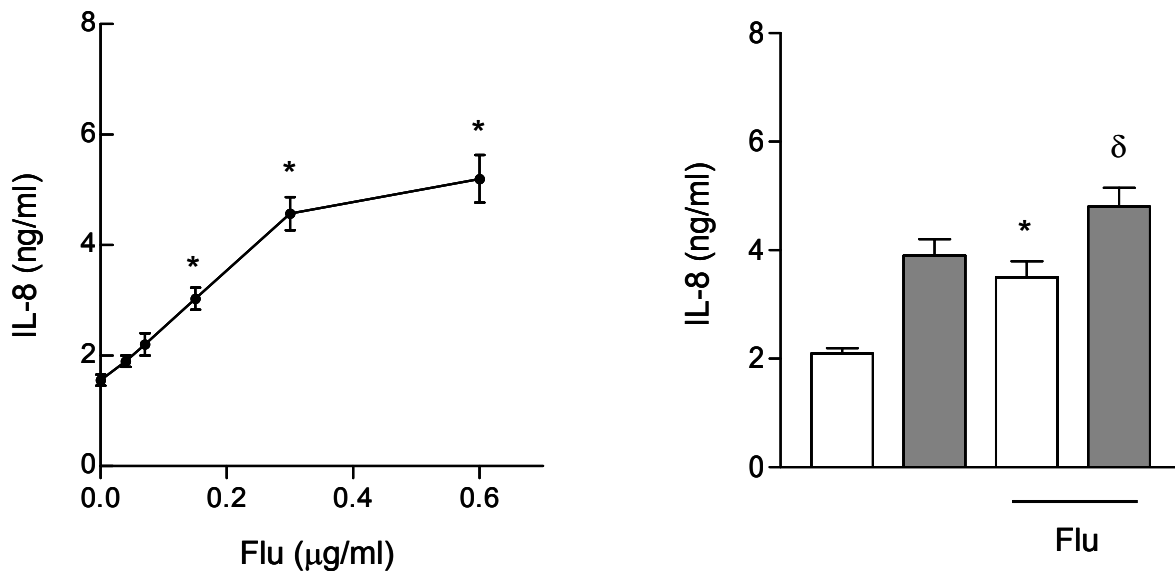


Figura 21: Flu incrementa la secreción de IL-8 en células U937.

(A) Las células U937 ($0.1 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron con distintas concentraciones de Flu durante 48 hs. Los niveles de IL-8 secretada al sobrenadante de cultivo se dosaron por ELISA.

(B) Las células U937 ($0.1 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron con IL-1 β (50 ng/ml) (barras grises) en presencia o no de Flu (0,15 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 hs. Los niveles de IL-8 secretada al sobrenadante de cultivo se dosaron por ELISA.

Los valores corresponden a la media \pm SEM (n=5).

* estadísticamente significativo ($p < 0,05$) comparado con células sin tratar con Flu. δ estadísticamente significativo ($p < 0,05$) comparado con células tratadas con Flu solamente.

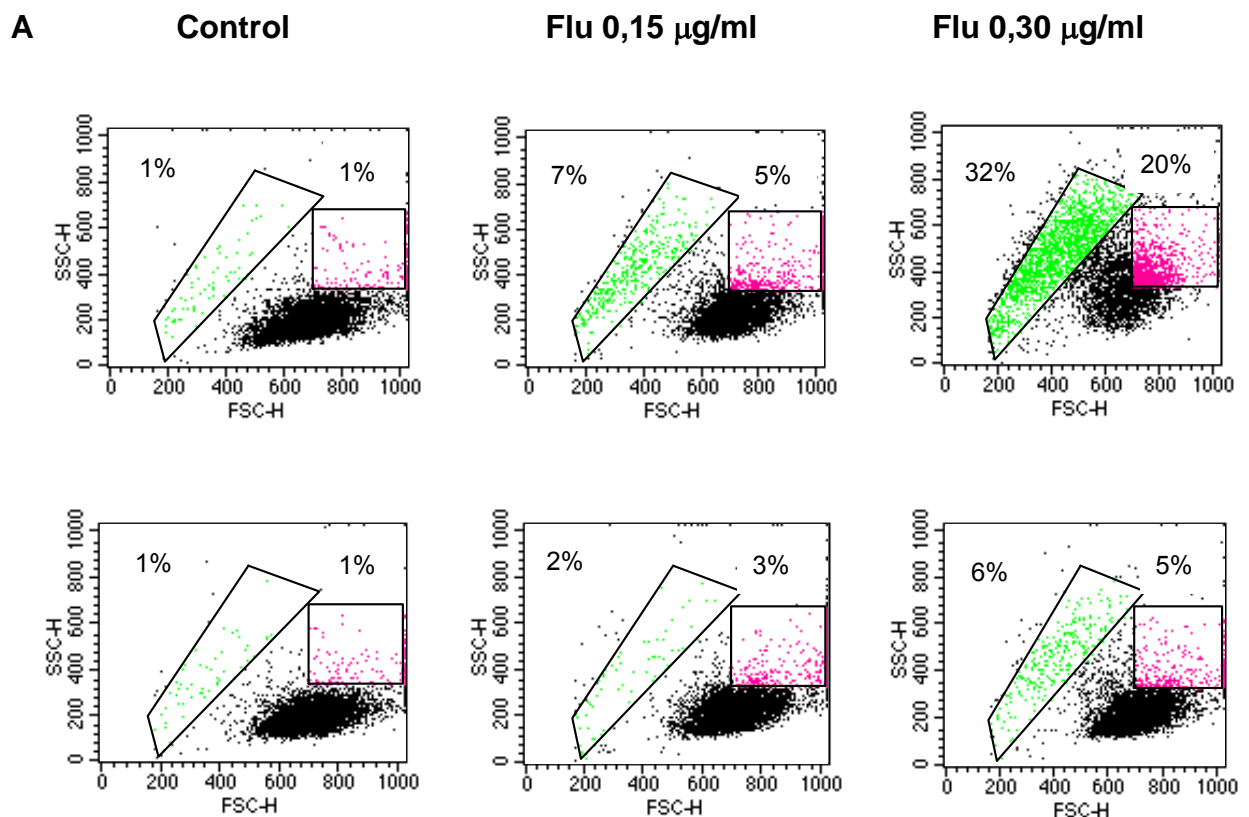
Considerados en conjunto, estos resultados indican que bajas concentraciones de Flu son capaces de inducir la activación/diferenciación de células U937.

3.c) Flu debe ingresar a las células U937 a través de transportadores equilibrativos para inducir apoptosis y diferenciación:

Como se mencionara en la Introducción, numerosas evidencias indican que Flu debe ingresar a la célula para ejercer su actividad citotóxica (28,29). En las células de estirpe hematopoyética, como son las U937, lo hace normalmente a través de transportadores equilibrativos (ENT) (29,30). No puede descartarse, sin embargo, que, por tratarse de un análogo de adenosina,

Flu interactúa con los receptores de adenosina de la membrana celular para inducir la activación /diferenciación en las células U937. Cabe señalar que, si bien los receptores para adenosina mayoritariamente están implicados en respuestas anti-inflamatorias (165,166), en algunos sistemas celulares como en mastocitos humanos (167) o en monocitos activados con IL-1 β , la adenosina aumenta la secreción de IL-8 actuando a través de su receptor A2. Por todo lo expuesto el siguiente objetivo fue investigar si el efecto diferenciador de Flu sobre las células U937 requería o no la incorporación del análogo al interior celular. Para ello se utilizó el inhibidor de los transportadores equilibrativos, nitrobenclitioinosina (NBTI) que, a concentraciones de 0,5-1 μ M inhibe exclusivamente el transporte de nucleósidos a través del transportador hENT1 (8,10).

Las células U937 se expusieron a Flu en presencia o ausencia de NBTI (1 μ M) durante 48 hs. Al cabo de la incubación se evaluó apoptosis, diferenciación celular por aumento de tamaño y complejidad granular y expresión de ICAM-1.



B

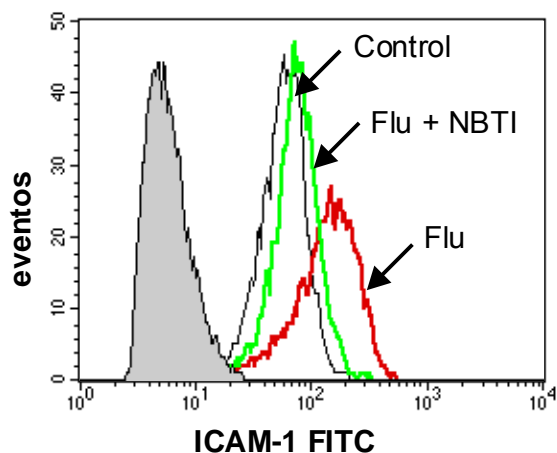


Figura 23: Efecto de la inhibición del transportador hENT1 sobre la apoptosis y diferenciación de células U937 inducida por Flu.

Las células U937 ($0.5 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron con Flu en presencia o ausencia de NBTI ($1 \mu\text{M}$) durante 48 hs. (A) Evaluación de la inducción de apoptosis y diferenciación celular por análisis de los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad granular (SSC). Los 3 gráficos del panel superior corresponden a las células cultivadas en ausencia de NBTI. Se indican los porcentajes de células apoptóticas (en verde) y de células diferenciadas (en violeta).

(B) Evaluación de la expresión de ICAM-1 por citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico marcado con FITC. Se muestran los histogramas de fluorescencia correspondientes a la expresión de ICAM-1 en células U937 cultivadas con Flu ($0,15 \mu\text{g}/\text{ml}$) (Flu), Flu + NBTI ($1 \mu\text{M}$) (Flu + NBTI) o medio (Control). El histograma en gris corresponde al control de isotipo de Ig. Resultados representativos de 3 experimentos independientes

Los resultados obtenidos (Figura 23) muestran que la inhibición de la actividad del transportador hENT1 por NBTI ($1 \mu\text{M}$) inhibe, no sólo la apoptosis inducida por Flu sino también la diferenciación de las células U937, indicando que se requiere la incorporación de Flu al interior celular para que ejerza sus efectos citotóxicos e inmunoregulatorios.

3.d) La vía de MAPK/ERK está involucrada en la activación/diferenciación de células U937 inducida por Flu:

Distintos estímulos pro-inflamatorios incrementan la expresión de ICAM-1 y la producción de IL-8 utilizando la cascada de señalización de las MAPK

(168,169). Como se señalara en la Introducción existen tres grupos principales de MAPKs: ERK, p38 y JNK. Con el objetivo de determinar si Flu induce la activación/diferenciación de las células U937 a través de alguna de estas vías, se utilizaron inhibidores específicos de cada una de ellas. Estos son: PD98059 (PD) para bloquear la activación de ERK, SB203580 (SB) para inhibir la activación de p38 y SP600125 (SP) que inhibe la activación de JNK. Las células U937 se preincubaron con cada uno de estos inhibidores y luego se agregó a los cultivos una concentración sub-apoptótica de Flu (0,15 $\mu\text{g/ml}$). La expresión de membrana de ICAM-1 y la secreción de IL-8 a los sobrenadantes de cultivo se evaluaron a las 48 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24.

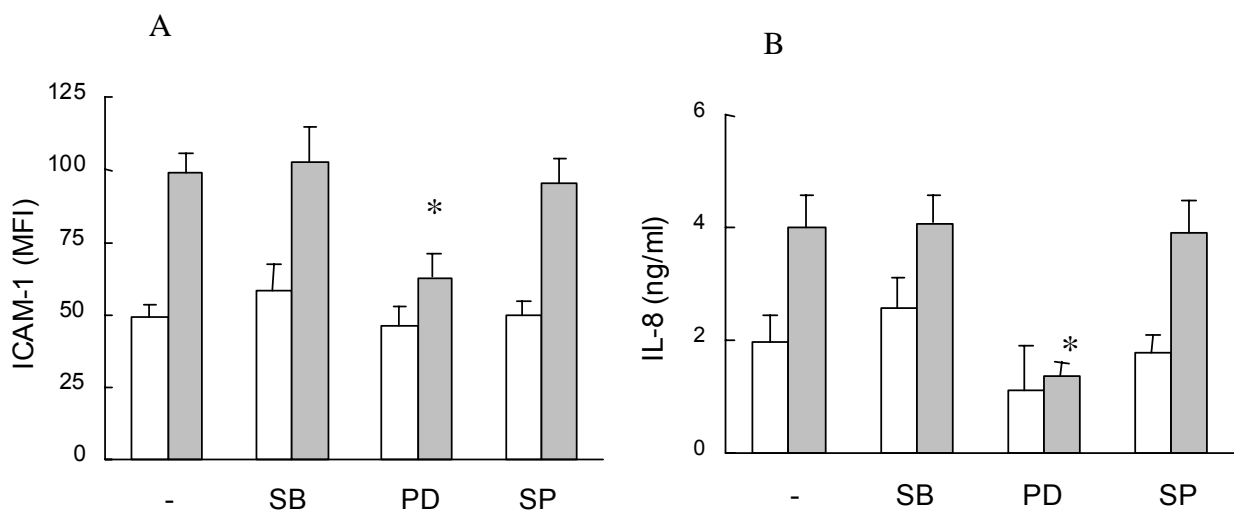


Figura 24: Efecto de la inhibición de las vías de MAPKs sobre la capacidad de Flu para aumentar la expresión de ICAM-1 y la secreción de IL-8 en células U937.

Las células U937 ($0.5 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron con SB ($5 \mu\text{M}$), PD ($5 \mu\text{M}$) o SP ($10 \mu\text{M}$) 20 min antes de agregar Flu ($0,15 \mu\text{g/ml}$) (barras grises) o PBS (barras blancas) como control. Al cabo de 48 hs se analizó (A) la expresión de membrana de ICAM-1 por citometría de flujo y (B) los niveles de IL-8 secretada al sobrenadante de cultivo por ELISA.

Los valores corresponden a la media \pm SEM (n=5).

* estadísticamente significativo ($p < 0,05$) comparado con células sin tratadas con Flu

Como se observa en la Figura 24.A, la presencia de PD en el cultivo inhibió significativamente el aumento en la expresión de ICAM-1 inducido por Flu, sin afectar los niveles basales de expresión. Ninguno de los otros dos inhibidores tuvo efecto sobre la expresión constitutiva o inducida de ICAM-1. En relación a la secreción de IL-8, puede observarse que la incubación con PD inhibió totalmente la secreción de IL-8 inducida por Flu (panel B) y disminuyó, aunque no significativamente, la producción espontánea. Por otra parte, se encontró que los inhibidores de las vías de p38 y JNK no tienen efecto sobre la inducción de IL-8, ya sea espontánea o inducida por Flu.

Los resultados obtenidos con los inhibidores indican que Flu actúa a través de la vía de MAPK/ERK para inducir la activación/diferenciación de las células U937, mientras que las vías de p38 y JNK no estarían involucradas en este proceso de diferenciación. Dado que estas dos últimas vías son las que comúnmente se activan en respuesta a estímulos pro-apoptóticos como Flu, se estudió a continuación el efecto de los inhibidores de las MAPKs en la inducción de apoptosis.

	% de apoptosis		
	control	Flu 0,15 (µg/ml)	Flu 0,30 (µg/ml)
Vehículo	2,0 ± 0,8	11,2 ± 3,2	21,4 ± 4,8
PD (5µM)	2,5 ± 0,6	13,1 ± 2,8	25,8 ± 5,0
SB (5µM)	1,5 ± 0,5	6,2 ± 1,8*	10,8 ± 3,6*
SP (10µM)	1,8 ± 1,6	10,0 ± 4,1	15,8 ± 4,2*

Tabla 1: Efecto de los inhibidores de MAPKs sobre la apoptosis espontánea e inducida por Flu en células U937.

Las células U937 (0.5×10^6 /ml) se incubaron con SB (5µM), PD (5 µM) o SP (10µM) 20 min antes del agregado de Flu 0,15 o 0,30 µg/ml o PBS como controles. Al cabo de 48 hs se analizaron los niveles de apoptosis por microscopía de fluorescencia.

Los valores corresponden a la media ± SEM (n=5).

* estadísticamente significativo ($p < 0.05$, n=5) comparado con células tratadas con Flu sin inhibidor.

Como se muestra en la Tabla 1, a las concentraciones utilizadas, ninguno de los inhibidores tuvo efectos tóxicos sobre las células U937 a las 48 hs de cultivo. Cuando las células fueron expuestas a bajas dosis de Flu (0,15 $\mu\text{g/ml}$), el inhibidor de p38, SB, disminuyó significativamente el porcentaje de células apoptóticas. A dosis más altas de Flu, no sólo SB sino también el inhibidor de JNK, SP, tuvo efectos anti-apoptóticos. Por el contrario, la inhibición de la vía MAPK/ERK con PD no modificó significativamente la apoptosis inducida por Flu.

Considerados en conjunto, estos resultados indican que las vías de señalización de MAPKs involucradas en la apoptosis y en la inducción de activación/diferenciación por Flu son distintas, al menos en células U937.

3.e) Flu induce la fosforilación de ERK en las células U937:

Los hallazgos obtenidos con el empleo de inhibidores para MAPKs (Figura 23) sugieren que la vía de MAPK/ERK juega un papel importante en la activación/diferenciación de las U937 por Flu. Para analizar directamente el efecto de Flu sobre la activación de ERK, evaluamos la fosforilación de ERK mediante la técnica de Western Blot en extractos de células U937 expuestas al análogo. Los resultados de la Figura 25 muestran que con sólo 2 minutos de exposición a 0,15 $\mu\text{g/ml}$ de Flu se induce una marcada fosforilación de ERK, que se mantiene, al menos, por 30 minutos.

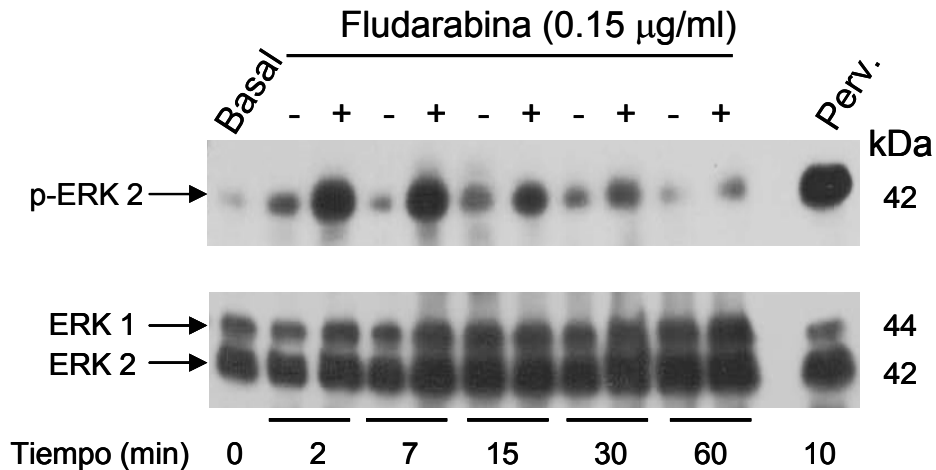


Figura 25: Activación de la vía de MAPK/ERK por Flu en células U937.

Las células U937 ($0,1 \times 10^6$) se incubaron a 37°C en presencia (+) o ausencia (-) de Flu ($0,15 \mu\text{g/ml}$). Las reacciones se detuvieron a los tiempos indicados en la Figura mediante el agregado de PBS frío. La expresión de ERK1/2 fosforilado se determinó por Western Blot tal como se describe en Materiales y Métodos. Las mismas membranas se revelaron con un anticuerpo anti-ERK1/2 total para comparar la cantidad de proteína sembrada por calle. Perv. Corresponde al control positivo de fosforilación con pervanadato.

Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

3.f) La activación/diferenciación de células U937 inducida por Flu es independiente de la vía de NF- κ B:

Numerosos estudios han demostrado que la máxima producción de IL-8 en células monocíticas involucra la activación del factor de transcripción NF- κ B (169-171). Asimismo, la inducción de ICAM-1 por distintos estímulos también parece depender de la activación de NF- κ B (168-172). Es por ello que decidimos investigar el papel del factor de transcripción NF- κ B en la activación/diferenciación celular inducida por Flu. NF- κ B constituye, en realidad, una familia de proteínas que, en la célula en reposo, se encuentran en el citoplasma asociadas a proteínas inhibitorias denominadas I- κ B (173,174).

En respuesta a un estímulo adecuado, se induce la proteólisis de I- κ B a través del conjunto enzimático denominado proteosoma, permitiéndose que los dímeros de NF- κ B se transloquen al núcleo y se unan a las regiones promotoras de diferentes genes. Este conjunto de eventos da como resultado la inducción de la transcripción de determinados genes. Para determinar si la activación de NF- κ B cumple un papel relevante en la activación/diferenciación de las células U937 por Flu, en primer lugar, se empleó el inhibidor sulfasalazina (SSZ) que actúa bloqueando la degradación de I- κ B e impidiendo, de esta manera, la translocación de NF- κ B al núcleo. Como se puede ver en la Figura 26, SSZ no modificó la expresión basal de ICAM-1 ni la inducida por Flu, lo que sugiere que la vía de activación de NF- κ B no está involucrada.

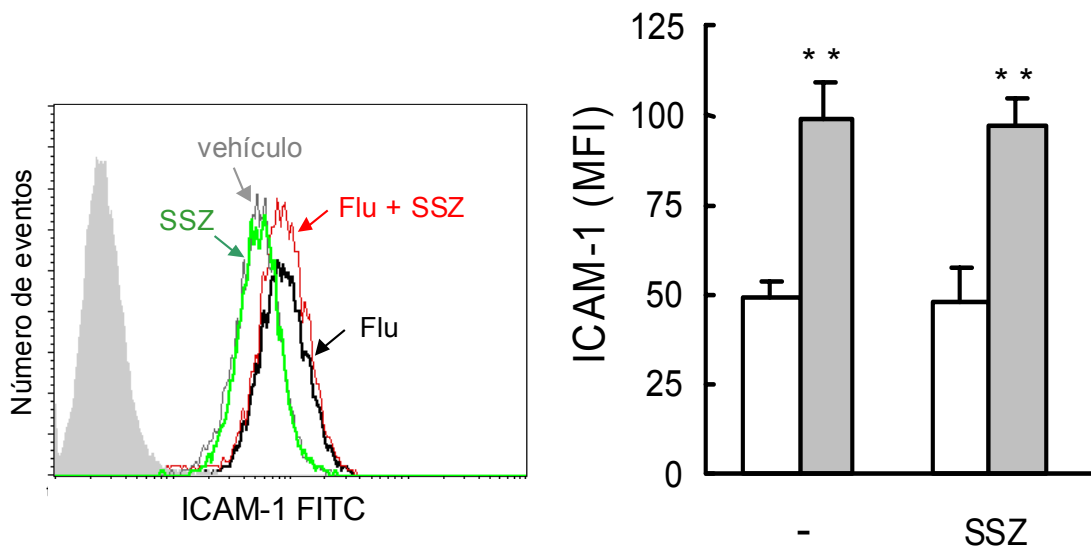


Figura 26: La inducción de la expresión de ICAM-1 por Flu no involucra la activación de NF- κ B.

Las células U937 (0.5×10^6 /ml) se incubaron con Flu ($0,15 \mu\text{g/ml}$) en presencia o ausencia de SSZ ($200 \mu\text{M}$) o vehículo. Al cabo de 48 hs se analizó la expresión de membrana de ICAM-1 por citometría de flujo. (A) Se muestran histogramas de fluorescencia de un experimento representativo. El histograma en gris corresponde al control de isotipo de Ig. (B) La expresión de ICAM-1 de las células cultivadas en ausencia (barras blancas) o presencia (barras grises) de Flu se muestra como intensidad media de fluorescencia (MFI). **estadísticamente significativo ($p < 0,01$) comparado con células incubadas en ausencia de Flu (media \pm ES, $n=5$).

Cuando se evaluó el efecto de SSZ sobre la secreción de IL-8 se encontró que el inhibidor no sólo no bloquea la secreción sino que aumenta significativamente tanto los niveles basales como los inducidos por Flu (Figura 27). Para descartar que se tratara de un efecto particular del SSZ que no tuviera relación con la vía de activación de NF- κ B se utilizó un segundo inhibidor, N-acetyl-leucinyl-leucinyl-norleucinal (ALLN), que también actúa interfiriendo con la proteólisis de I- κ B. Como se muestra en la Figura, la inhibición de NF- κ B por ALLN fue capaz de inducir efectos comparables a los de SSZ con respecto al incremento en la secreción de IL-8.

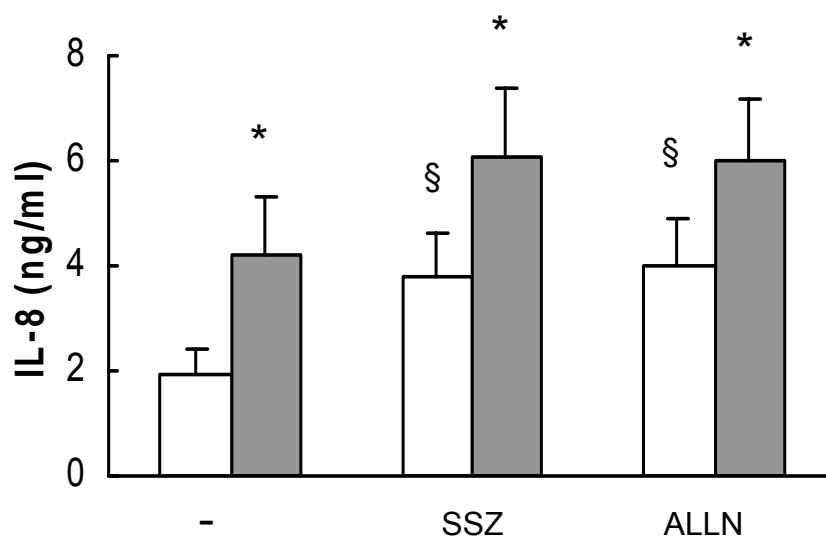


Figura 27: Modulación de la secreción de IL-8 por inhibidores de NF- κ B

Las células U937 (0.5×10^6 /ml) se incubaron con SSZ (200 μ M) o ALLN (5 μ M) 20 min antes del agregado de Flu 0,15 μ g/ml (barras grises) o PBS (barras blancas) como control. Al cabo de 48 hs se analizaron los niveles de IL-8 secretados al sobrenadante de cultivo por ELISA.

Los valores corresponden a la media \pm ES (n=5).

* estadísticamente significativo ($p < 0.05$) comparado con las células cultivadas en ausencia de Flu.

§ estadísticamente significativo ($p < 0.05$) comparado con las células cultivadas en ausencia de SSZ o ALLN.

En conjunto, los resultados obtenidos indican Flu induce la activación/maduración de las células U937 a través de vías de señalización que no involucran la activación de NF- κ B.

3.g) La activación/diferenciación de células U937 inducida por Flu depende, en parte, de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno:

El aumento en la secreción de IL-8 inducido por los inhibidores SSZ y ALLN resultó, en un primer momento, llamativo ya que numerosas evidencias indican que la síntesis de esta quemoquina depende de la activación de NF- κ B (169-172). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la supresión de la actividad de NF- κ B por inhibidores del proteasoma puede resultar en la transactivación de IL-8 a través de la inducción del factor de transcripción AP-1, vía intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) (173,174). Teniendo estos datos en cuenta, se evaluó el efecto del antioxidante N-acetilcisteína (NAC) sobre la capacidad que presenta Flu para inducir la activación/diferenciación de las células U937.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 28. Como puede observarse NAC inhibe significativamente la expresión de ICAM-1 (Fig 28.A) y la secreción de IL-8 (Fig 28.B) inducidos por Flu, sin afectar los niveles de ambas proteínas. Se obtuvieron resultados similares utilizando un segundo antioxidante: dimetilsulfóxido (2%) (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que los efectos inmunorregulatorios de Flu dependen, al menos en parte, de la generación de IROs.

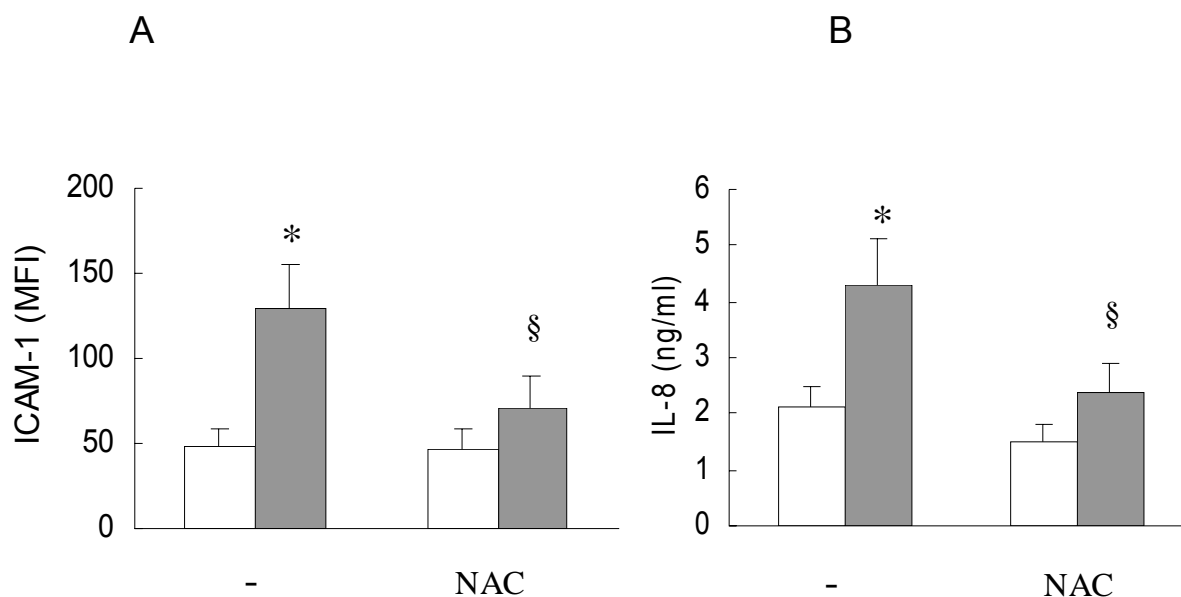


Figura 28: Efecto del antioxidante NAC sobre el aumento en la expresión de ICAM-1 y la secreción de IL-8 inducida por Flu.

Las células U937 ($0.5 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron con Flu ($0,15 \mu\text{g}/\text{m}$) (barras grises) o PBS (barras blancas) en presencia o ausencia de NAC (10 mM). Al cabo de 48 hs se analizó la expresión en membrana de ICAM-1 por citometría de flujo (A) y los niveles de IL-8 en el sobrenadante de cultivo por ELISA (B).

* estadísticamente significativo ($p < 0,05$) comparado con células incubadas en ausencia de Flu (media \pm ES, $n=3$).

§ estadísticamente significativo ($p < 0,05$) comparado con células incubadas con Flu (media \pm ES, $n=3$).

3.h) Flu induce la activación de AP-1 en células U937:

Los resultados obtenidos al analizar las posibles vías de señalización activadas por Flu en células U937 demostraron que las señales transducidas a través de MAPK/ERK están involucradas en la activación/diferenciación inducida por el análogo. Como se señalara en la Introducción, la activación de la vía MAPK/ERK conduce a la inducción del factor de transcripción AP-1 (175-177), siendo éste un factor de transcripción más relevantes implicados en la síntesis de IL-8 e ICAM-1(178,179). Con el objetivo de determinar si Flu es capaz de activar AP-1, se analizó la formación de complejos AP-1-ADN en extractos de células U937 expuestas a Flu mediante la técnica de EMSA.

Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Figura 29.

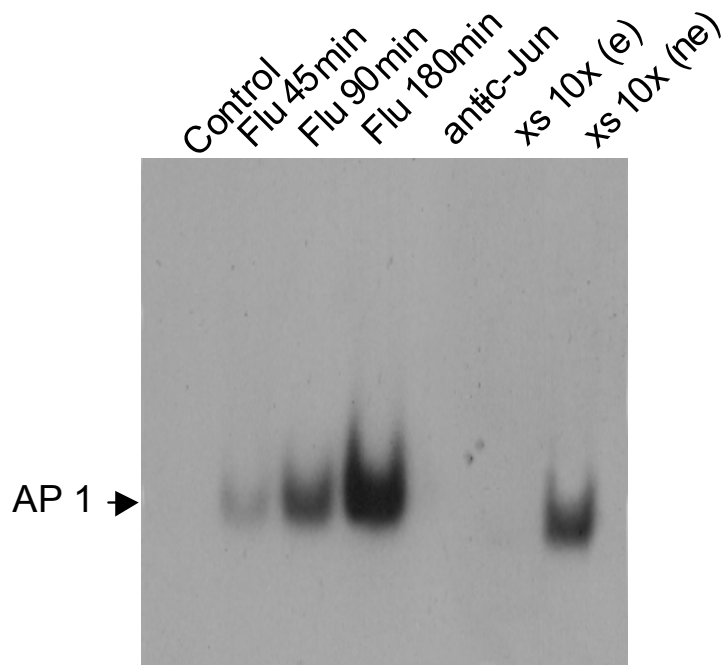


Figura 29: Flu induce la activación de AP-1 en células U937.

Las células U937 (1×10^6 /ml) se incubaron con Flu ($0,3 \mu\text{g/ml}$) durante los tiempos indicados en la Figura. Los extractos nucleares se prepararon inmediatamente y la actividad de AP-1 se midió por EMSA como fue descrito en Materiales y Métodos. La calle 1 (control) corresponde a células U937 incubadas por 180 min en ausencia de Flu. La calle 4 (supershift con anti-c-Jun) corresponde a células expuestas a Flu por 180 min cuyos extractos nucleares fueron incubados con un anticuerpo monoclonal anti-c-Jun ($1 \mu\text{g}$) durante 20 min del agregado del oligo radioactivo. La especificidad de la activación de AP-1 también fue corroborada preincubando extractos nucleares con un exceso (10X) de oligos sin marcar específicos (e) o no específicos (ne) para la unión a AP-1.

Se muestran resultados de un experimento representativo de 4 experimentos realizados.

Como puede observarse, las células U937 no muestran actividad constitutiva de AP-1. La exposición de las células a Flu ($0,3 \mu\text{g/ml}$) resulta en la aparición de complejos ADN-proteína que incrementan sus niveles durante las

primeras 3 horas de cultivo. La especificidad de los complejos activados fue confirmada por ensayos de competencia, en los cuales se incubó con exceso de oligonucleótidos fríos (sin marca radioactiva) que contenían las secuencias de unión a AP-1, oligo específico, o bien oligonucleótidos no relacionados o no específicos. También se confirmó la especificidad del complejo formado en ensayos de supershift utilizando anticuerpo anti-c-Jun que elimina completamente la unión del AP-1 activado al oligonucleótido radioactivo. Cabe destacar que, tanto los ensayos de competencia como los de supershift, se realizaron con extractos nucleares de células U937 expuestas a Flu durante 180 minutos, que es el tiempo donde se observa el mayor complejo AP-1-oligo radioactivo. Estos resultados demuestran que, dosis farmacológicas de Flu son capaces de activar AP-1 en células de estirpe monocítica.

DISCUSSION

El desarrollo de análogos de adenosina para ser empleados en el tratamiento de enfermedades linfoproliferativas tuvo como base de sustentación la demostración, realizada por Giblett en el año 1972, de que la deficiencia en la enzima adenosina deaminasa resulta en una inmunodeficiencia severa combinada, con una profunda depleción de las poblaciones linfocitarias (180). La adenosina deaminasa regula la concentración intracelular de deoxiadenosina, que al fosforilarse se convierte en un metabolito tóxico, el dATP. Si bien la adenosina deaminasa se encuentra ampliamente distribuida, su expresión es máxima en los tejidos linfoides, de allí la inmunodeficiencia a la que se asocia su falta de expresión. Fludarabina (Flu) es uno de los análogos de adenosina resistente a la acción de la adenosina deaminasa que se emplea con mayor frecuencia en el tratamiento oncohematológico. Su actividad citotóxica sobre células leucémicas, en particular linfocitos B de leucemia linfática crónica, ha sido objeto de numerosos estudios. Sin embargo, existe muy poca información acerca de la sensibilidad de las poblaciones leucocitarias normales a Flu, es por ello que éste fue el primer objetivo del presente trabajo de tesis.

El conjunto de resultados obtenidos demuestra que todas las poblaciones de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana son susceptibles a la acción pro-apoptótica de Flu, mientras que los polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos son resistentes. Es así que la incubación de leucocitos mononucleares con concentraciones de Flu de 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 48 horas provoca la muerte de alrededor del 50% de las células. En cuanto a si estas concentraciones de Flu son compatibles con las empleadas en los tratamientos de pacientes leucémicos, cabe recordar que Flu es el derivado 5'-monofosfato de F-ara-A (9- β -D-arabinosyl-2-fluoroadenina), el cual debe ser defosforilado para ingresar a la célula. Cuando se inocula *in vivo*, Flu es defosforilada de inmediato por 5'-nucleotidasas especialmente abundantes en la membrana de eritrocitos y células endoteliales. El proceso de

defosforilación *in vitro* es menos eficiente, por lo que se necesitan concentraciones en el rango de microgramos/ml para equiparar las concentraciones de Flu empleadas en el tratamiento de pacientes. Los estudios sobre el efecto de Flu en sistemas *in vitro* se han llevado a cabo, ya sea con el derivado 5'-monofosfato, utilizando, en la mayoría de los casos, un rango de dosis de entre 1 y 25 $\mu\text{g/ml}$ (28,30,159,181,182) o bien con F-ara-A (desfosforilada) en concentraciones comprendidas entre 0,1 y 3 $\mu\text{g/ml}$ (158,183).

La sensibilidad a Flu de las poblaciones de leucocitos mononucleares contrasta con la resistencia evidenciada por los granulocitos neutrófilos y eosinófilos, que no se ven afectados aún expuestos a dosis muy altas de Flu (200 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 horas. La susceptibilidad a Flu de los leucocitos polimorfonucleares en cultivo fue analizada previamente por Dogan y colaboradores quienes utilizaron una preparación enriquecida en neutrófilos de sangre humana periférica (184). En concordancia con nuestros resultados, los autores encuentran que la mayor parte de las células son resistentes a concentraciones tan altas como 1 mg/ml de Flu luego de 48 horas en cultivo. Llamativamente, la exposición a Flu exacerbó la capacidad de degranulación de mieloperoxidasa por parte de los leucocitos y los niveles de ácido hipocloroso producido, lo que sugiere que Flu es capaz de interactuar con los granulocitos. En este mismo sentido nosotros observamos que una proporción de los neutrófilos expuestos a concentraciones altas de Flu (50-100 $\mu\text{g/ml}$) presentaban, al microscopio de fluorescencia, mayor tamaño que las células controles, con citoplasma abundante y morfología de granulocito activado (resultados no mostrados). Es posible que a altas concentraciones Flu interactúe con los receptores para adenosina expresados en la membrana de los neutrófilos los que, como fue demostrado previamente, transducen señales anti-apoptóticas en este tipo celular (185) a diferencia de lo que ocurre en linfocitos (186).

Tal como mencionamos anteriormente, el conjunto de células mononucleares, constituido por linfocitos y monocitos, mostró una clara sensibilidad a los efectos pro-apoptóticos de Flu en contraposición a las células polimorfonucleares. El efecto *in vitro* de la droga sobre la viabilidad de monocitos y células dendríticas no había sido analizada hasta el momento. Los resultados presentados en esta tesis muestran una sensibilidad similar de ambas poblaciones al análogo, que es comparable a la del conjunto de células linfoides. Sin embargo, al evaluar comparativamente el efecto de Flu en la sobrevida de las distintas subpoblaciones linfocitarias hemos encontrado diferencias. Los linfocitos de sangre periférica abarcan tres grandes subpoblaciones: linfocitos B, linfocitos T (TCD4⁺ y TCD8⁺) y células NK. Los resultados presentados demuestran que los linfocitos B y las células NK de dadores normales son más sensibles a la actividad citotóxica de Flu en comparación al conjunto de linfocitos T. En el mismo sentido, Consoli y colaboradores investigaron la actividad *in vitro* de F-ara-A sobre la apoptosis de linfocitos T y B provenientes de sangre humana normal, encontrando resultados similares a los descritos en esta tesis (187).

¿Qué sucede con el efecto *in vivo* de Flu sobre las poblaciones leucocitarias de origen mieloide? En relación a los monocitos circulantes son muy pocos los trabajos que evalúan su recuperación post-Flu. Davis y col (188) mostraron que en pacientes con artritis reumatoidea severa el tratamiento con Flu en altas o bajas dosis induce una disminución menor en el conteo de monocitos (<20%) en comparación con el conteo de linfocitos (70%). Con respecto a los leucocitos neutrófilos, cabe señalar que las consecuencias del tratamiento con quimioterápicos es de suma importancia ya que esta población constituye la primera barrera de la respuesta inmune innata a numerosos patógenos. Desde el comienzo de su empleo en ensayos clínicos se observó que Flu inducía neutropenia en alrededor del 50% de los pacientes, lo que fue asociado con infecciones bacterianas, fúngicas y virales. Estos resultados parecerían estar en contradicción con la resistencia de los leucocitos polimorfonucleares a Flu *in vitro* presentados en esta tesis. Sin embargo, es

altamente probable que la neutropenia inducida por Flu sea consecuencia de la acción del análogo sobre los precursores mieloides en médula ósea y no a un efecto directo sobre neutrófilos y eosinófilos maduros. De hecho, el tratamiento prolongado con Flu provoca mielosupresión, la que, desde el primer ensayo clínico de fase I realizado en 1984, demostró ser más severa de lo que se preveía por los resultados obtenidos previamente en ratón (189). La mielosupresión por Flu provoca no sólo neutropenia sino también trombocitopenia y anemia, y en muchos casos es motivo de suspensión del tratamiento. En cualquier caso será necesario analizar la actividad citotóxica de Flu *in vitro* sobre los precursores hematopoyéticos para poder atribuir inequívocamente la neutropenia asociada al tratamiento a la mielosupresión.

Los escasos reportes sobre la actividad de Flu *in vitro* en poblaciones linfocitarias contrastan con la abundante literatura acerca de las consecuencias del tratamiento de pacientes con Flu en la reconstitución inmune. Boldt y colaboradores en el año 1984 fueron los primeros en describir los efectos sobre las poblaciones linfocitarias periféricas del tratamiento sostenido con Flu en pacientes con distintos tumores sólidos (190). Encontraron una rápida caída de los linfocitos T que disminuyen en un 90% con respecto a los valores iniciales a la semana de comenzado el tratamiento, mientras que los linfocitos B, por el contrario, decrecieron en un 50%. Sin embargo, trabajos posteriores que determinaron estos mismos parámetros en pacientes transplantados que recibieron Flu como parte del tratamiento condicionante previo al injerto (191), encontraron que los linfocitos B disminuyen más rápidamente que los T por efecto de Flu y se recuperan más tarde. La población de células NK (CD56⁺) fue analizada en alguno de estos reportes y se vió que su número absoluto se recupera más rápidamente que el de los linfocitos T (192).

Los resultados obtenidos sobre la sensibilidad de las poblaciones linfocitarias a Flu indicaron que los linfocitos B y las células NK son más sensibles

al análogo que los linfocitos T. Sin embargo, la población T no es homogénea sino que está constituida por dos grandes subpoblaciones: los T CD4⁺ y los T CD8⁺, ambas con características y funciones particulares. El tratamiento de pacientes con Flu induce una marcada linfopenia T CD4⁺ que resulta en la inversión de la relación CD4:CD8. Cuando evaluamos la susceptibilidad diferencial de las poblaciones T CD4⁺ y CD8⁺ a Flu *in vitro*, encontramos que, a diferencia de lo esperado, los linfocitos CD8⁺ presentan mayores niveles de apoptosis inducidos por Flu. Es importante señalar que encontramos el mismo patrón de respuesta en linfocitos T provenientes de dadores normales que en aquellos provenientes de pacientes con leucemia linfática crónica (LLC). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Consoli y col. (187) quienes no observaron diferencias en la susceptibilidad a Flu *in vitro* de las subpoblaciones T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes LLC, no habiendo evaluado la actividad de Flu en subpoblaciones T de dadores normales. Las diferencias entre nuestros resultados y los del trabajo anterior podrían deberse a la cohorte de pacientes evaluados en cada caso. Los pacientes analizados en nuestro estudio se encontraban todos en estadios tempranos de la enfermedad y sólo 2 de los 17 evaluados habían recibido quimioterapia. Por el contrario, un tercio de los pacientes incluidos en el trabajo de Consoli y col. se encontraban en estadios avanzados (RAI III y IV). De hecho, los resultados de susceptibilidad diferencial a Flu que se muestran en el reporte citado corresponden a un paciente (de los 5 estudiados) en estadio IV que presenta sólo un 1,7% de linfocitos CD3⁺.

Al analizar la expresión de las enzimas que participan en el metabolismo de la Flu (dCK y cN-II) se encontró que los linfocitos T CD8⁺ expresan niveles claramente mayores de dCK que los linfocitos T CD4⁺. Es posible que la relación dCK/cN-II aumentada en la población CD8⁺ resulte en mayor acumulación intracelular del metabolito activo de Flu y, por consiguiente, en niveles de apoptosis incrementados.

La mayor susceptibilidad *in vitro* de las células CD8⁺ a Flu contrasta con los resultados *in vivo* de pacientes LLC-B tratados con la droga, que presentan una profunda y sostenida linfopenia T a expensas fundamentalmente de la población CD4⁺ (135,191,193). Asumiendo que nuestras observaciones *in vitro* reflejan lo que estaría ocurriendo *in vivo* luego de la administración de Flu, la explicación más probable para la prolongada linfopenia CD4⁺ sería la tasa de recuperación más lenta de esta subpoblación en comparación con las T CD8⁺. En este sentido, otros autores han demostrado que, luego de quimioterapias intensivas para distintos tipos de tumores (cerebral, sarcomas o linfomas) se depletan significativamente todas las subpoblaciones de linfocitos, pero sólo los linfocitos T CD4⁺ permanecen en niveles muy bajos durante meses luego de completar la terapia y requieren más de 12 meses para regresar a valores normales. En cambio los linfocitos T CD8⁺ tienen un tiempo de duplicación más rápido que los CD4⁺, regresando a valores normales en sangre a los 3 meses de completado el tratamiento (157,194-196). Este comportamiento ocurre independientemente de la edad del paciente y del tamaño que alcanza el timo durante la reconstitución inmune. Se ha propuesto que los linfocitos T CD8⁺ pueden madurar en tejidos extratímicos mientras que los T CD4⁺ son más dependientes de la integridad del timo para completar su ontogenia (157). En este sentido se ha demostrado que los niños timectomizados en forma parcial o total durante los primeros meses de vida presentan un conteo de linfocitos T CD4⁺ significativamente inferior a la media normal, pero no ocurre lo mismo con los T CD8⁺ (197), lo que refuerza la idea de que la maduración extratímica es más eficiente en esta última subpoblación.

Como se acaba de discutir, el tratamiento de pacientes leucémicos con Flu afecta no sólo a las células malignas sino también a las poblaciones leucocitarias normales, ocasionando múltiples efectos secundarios, como la inmunosupresión que se correlaciona con la susceptibilidad a infecciones, y la inducción o agravamiento de la anemia hemolítica autoinmune. Estas alteraciones en la respuesta inmune se atribuyen exclusivamente a la acción citotóxica de Flu. Si bien es fácilmente comprensible que la dramática

disminución del número de linfocitos T y B provocada por Flu resulte en inmunosupresión, no existe una explicación sencilla para la inducción o exacerbación de los fenómenos autoinmunes. En la segunda parte de este trabajo de tesis se investigó la posibilidad de que Flu indujera no sólo apoptosis sino también activación leucocitaria pudiendo de esta forma modificar la respuesta inmune. Para ello se eligió como modelo un sistema *in vitro* altamente sensible a Flu, como son las células la línea humana monocítica U937 y se analizaron dos parámetros que se incrementan rápidamente en respuesta a numerosos estímulos: IL-8 e ICAM-1.

Los resultados obtenidos demuestran que la exposición de las células U937 a bajas concentraciones de Flu es capaz de inducir cambios morfológicos compatibles con diferenciación celular e incrementar tanto la secreción de IL-8 como la expresión de ICAM-1. La relación entre la inducción de diferenciación celular y apoptosis es un tema de enorme interés en oncohematología y, de hecho, la terapia con agentes inductores de diferenciación como el ácido retinoico ha significado un enorme avance en el tratamiento de ciertas leucemias. Los análogos de nucleósidos como ara-C, 6-tioguanina y la propia Flu también han sido analizados en cuanto a su capacidad para inducir diferenciación de células leucémicas. En este sentido, Vrana y col. (159) demostraron que los efectos antiproliferativos de Flu en células U937 involucran no sólo la inducción de apoptosis sino también la maduración celular, evidenciada por la adquisición de propiedades adherentes y el aumento en la expresión de CD11b. Cabe señalar, sin embargo, que el objetivo último de todos estos estudios es lograr la eliminación de los clones leucémicos mediante la inducción de diferenciación y apoptosis. Un solo trabajo, publicado durante la realización de esta tesis, sugiere que el tratamiento con Flu puede tener efectos proinflamatorios (158). En ese reporte, los autores observaron que la incubación de células endoteliales humanas con Flu incrementa la expresión de moléculas HLA de clase 1 y de ICAM-1. Teniendo en cuenta que Flu se utiliza en regímenes condicionantes previo al trasplante de médula ósea, los autores sugieren que, más allá de su acción inmunosupresora, Flu

podría generar complicaciones en los pacientes transplantados estimulando respuestas inmunes alogeneicas. Asimismo, nuestro grupo de trabajo ha reportado recientemente que Flu incrementa la secreción de interferón gama ($IFN\gamma$) por parte de linfocitos T activados provenientes de dadores normales o de pacientes con LLC-B (198). Este efecto estimulador es específico de Flu ya que otras drogas pro-apoptóticas para linfocitos como clorambucilo y dexametasona inhiben la producción de $IFN\gamma$ en lugar de exacerbarla. Dado que el $IFN\gamma$ es la principal citoquina secretada por los linfocitos T de pacientes con anemia hemolítica autoinmune en respuesta a antígenos eritrocitarios, nosotros proponemos que el aumento en la secreción de $IFN\gamma$ inducido por Flu puede estar implicado en el agravamiento de la anemia autoinmune que se observa en muchos pacientes LLC-B post-quimioterapia con Flu.

Una vez demostrado que el cultivo con concentraciones sub-apoptóticas de Flu induce el aumento en la expresión de ICAM-1 y en la secreción de IL-8, se investigó cuáles eran los mecanismos implicados en estos efectos. En primer lugar nos preguntamos si era necesario que Flu ingresara a la célula para inducir la diferenciación. En las células de estirpe hematopoyética como las U937, Flu debe ser incorporada a través de transportadores equilibrativos para ejercer sus efectos apoptóticos (29,30). Sin embargo, dado que las células U937 expresan receptores de adenosina y que la adenosina y algunos de sus análogos pueden transducir señales de activación al interactuar con los receptores de membrana, fue necesario investigar si el efecto diferenciador de Flu requería o no la incorporación del análogo a la célula. Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó el inhibidor NBTI $1\mu M$ que a esta concentración inhibe exclusivamente el transporte de nucleósidos a través del transportador hENT1 (5-10). Los resultados obtenidos indican que Flu debe ingresar a las células a través de este transportador tanto para inducir la diferenciación celular como para provocar la apoptosis.

Como se mencionara en la Introducción, son numerosos los trabajos que analizan los mecanismos mediante los cuales Flu ejerce su actividad citotóxica.

Tanto en células en división como en reposo, el metabolito activo de Flu, F-ara-ATP, inhibe la síntesis o la reparación del ADN compitiendo con la dATP o interfiriendo con enzimas como la ADN polimerasa y la ADN primasa, entre otras. Por el contrario no se habían estudiado hasta el momento los mecanismos involucrados en la activación/diferenciación inducida por Flu. Los resultados presentados en este trabajo de tesis demuestran que, tanto el incremento de IL-8 como el de ICAM-1 inducidos por Flu requieren la activación de la vía MAPK/ERK. En la mayoría de los sistemas celulares, la activación de ERK se asocia con proliferación y supervivencia celular, mientras que la activación de las MAPK p38 y JNK, se asocia a la apoptosis (176,199,200). Se ha demostrado, por ejemplo, que varias drogas quimioterápicas activan p38 y JNK, pero no ERK (201,202). En lo que respecta a Flu, hay pocos reportes en los que se evalúe el papel de las MAPKs en relación con sus efectos proapoptóticos. El primer trabajo publicado en este sentido fue el realizado por Sampath y Plunkett quienes demostraron en células leucémicas mieloides que la incorporación de Flu al ADN resulta en la activación de JNK (203). Los autores comprueban que la fosforilación de JNK por Flu es un evento que precede a la activación de la vía de las caspasas y a la fragmentación del ADN, y concluyen que la señalización a través de la vía de MAPK/JNK sería la encargada de convertir el estímulo de estrés iniciado con la incorporación de Flu al ADN en la señal de muerte celular.

Por otro lado, Maggio y col han demostrado, en concordancia con nuestros hallazgos, que las células leucémicas de una línea de estirpe linfocitoide T expuestas a Flu durante 3 horas manifestaban un claro aumento en la activación de ERK sin que se modificaran p38 ni JNK (204). Por último, cabe señalar que en células de tumor de ovario, Flu no es capaz de inducir la activación de ERK (205). En conjunto, estas evidencias demuestran que Flu afecta diferencialmente las vías de las MAPKs dependiendo del tipo celular.

Con respecto a los resultados presentados aquí, nosotros demostramos que los inhibidores de JNK o p38 no modifican el efecto exacerbador de Flu sobre la producción de IL-8 e ICAM-1 en células U937, pero, sin embargo, disminuyen significativamente la apoptosis inducida por Flu. Estos datos sugieren que, al menos en células monocíticas, p38 y JNK estarían ambas involucradas en la inducción de apoptosis por Flu, y ERK en la inducción de la activación y diferenciación. Como se señalara en la Introducción, la activación de las MAPK por diversos estímulos conduce a la inducción del factor de transcripción AP-1, siendo éste uno de los factores de transcripción más relevantes implicados en la síntesis de IL-8 e ICAM-1 (178,179). Por tal motivo evaluamos la formación de complejos AP-1-ADN en extractos de células U937 expuestas a Flu mediante la técnica de EMSA, encontrando que Flu efectivamente induce la activación de AP-1 en estas células.

Entre los múltiples factores que determinan la sobrevida o la apoptosis celular, los intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) juegan un papel central. Se ha demostrado que los IROs están involucrados en la activación de numerosas cascadas de señalización, y sus efectos finales dependen del nivel de producción y del tiempo de exposición de la célula a los mismos. Es así que bajos niveles de IROs son capaces de estimular la progresión del ciclo celular mientras que concentraciones más altas inhiben la proliferación y favorecen la diferenciación celular. Finalmente, la exposición a altos niveles de IROs por tiempos prolongados conduce a la apoptosis e incluso a la necrosis celular (206-208). Los resultados presentados en esta tesis demuestran que el agente antioxidante NAC inhibe parcialmente el aumento en la producción de IL-8 y la expresión de ICAM-1 inducidos por Flu, sugiriendo que la generación de IROs participa de los efectos activadores del análogo. Cabe señalar, sin embargo, que no fue posible detectar la producción de IROS en forma directa utilizando la técnica de oxidación del colorante dihidroetidina (DHE) y análisis por citometría de flujo (datos no mostrados). Es probable que estos resultados negativos se deban a que técnica no sea suficientemente sensible para

detectar la producción de IROs inducidos por Flu. De hecho, las dos publicaciones que evalúan el papel de los IROs en la actividad pro-apoptótica de Flu encuentran que NAC disminuye claramente los niveles de apoptosis pero no logran detectar una producción significativa de IROs con la metodología mencionada (204-209).

Numerosas evidencias sugieren que los IROs pueden afectar en forma directa o indirecta la actividad de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, principales responsables de la síntesis de IL-8 e ICAM-1 (169,171,178,179). Para el caso de NF- κ B se ha demostrado, en varios sistemas celulares, que su activación depende de la generación de IROs que actuarían como segundos mensajeros para la producción de IL-8 (169,204,210). Con respecto a los resultados presentados en esta tesis, se encontró que los inhibidores de la activación de NF- κ B, SSZ y ALLN, no sólo no inhiben sino que aumentan la producción de IL-8 tanto espontánea como inducida por Flu. Estas observaciones están en concordancia con trabajos que indican que la supresión de la actividad de NF- κ B por inhibidores del proteasoma puede resultar en la transactivación de IL-8 a través de la inducción de AP-1 (173, 174). Por otra parte, se ha visto que los IROs regulan en forma indirecta la activación de AP-1 a través de la fosforilación de ERK, p38 o JNK (211). Escapa a los objetivos de esta tesis un estudio molecular más exhaustivo que será imprescindible para desentrañar los caminos intracelulares responsables de la activación/diferenciación de células monocíticas por Flu.

Tal como se señalara anteriormente, las líneas celulares resultan una herramienta muy útil para analizar los efectos inducidos por agentes quimioterápicos y por ese motivo elegimos a las células monocíticas U937 para llevar a cabo esta parte del trabajo de tesis. Sin embargo, las líneas provienen de células transformadas y poseen muchas características genotípicas y fenotípicas particulares, que se van modificando, de manera inevitable, por el propio sistema de perpetuación. Fue por ello que intentamos determinar si los efectos activadores de Flu ocurren también en monocitos de sangre periférica,

encontrando que, efectivamente, los monocitos tratados expresan mayores niveles de ICAM-1 (501 ± 34 vs 770 ± 17 , MIF control vs Flu $5 \mu\text{g/ml}$, $n=5$, $p < 0,05$) y CD11b (3854 ± 220 vs 4990 ± 525 , MIF control vs Flu $5 \mu\text{g/ml}$, $n=5$, $p < 0,05$) que los controles. Estos datos nos alientan a investigar qué sucede *in vivo* con los pacientes tratados con Flu. En un estudio preliminar, se analizaron células mononucleares periféricas provenientes de una paciente con leucemia linfática crónica antes y después de que ingiriera una dosis diaria durante 3 días consecutivos de Fludara[®] oral (Flu, 40 mg/m^2) tratamiento con el que se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas promedio de alrededor de $1,5\text{-}2 \mu\text{M}$ (212). La paciente recibió junto con la primera toma de Flu, una dosis de 200 mg/m^2 del agente alquilante ciclofosfamida. En las dos muestras de sangre obtenidas evaluamos la expresión de ICAM-1 y CD11b en los monocitos y la producción de IL-8 espontánea e inducida por LPS de las células mononucleares, sin encontrar diferencias significativas. Estos resultados negativos podrían deberse, entre otras causas, a que los leucocitos de esta paciente fueran resistentes a Flu o a que la ciclofosfamida hubiera interferido con la actividad inmunorregulatoria de Flu. Cabe señalar que la Flu no se aplica hoy en día como monodroga en oncohematología, al menos en nuestro medio, lo que constituye un inconveniente práctico para realizar estos estudios. Es por ello que estamos considerando, como una alternativa para el estudio de los efectos *in vivo* de la Flu, la posibilidad de utilizar un modelo murino. De este modo podríamos evaluar comparativamente el estado de activación/diferenciación de los monocitos provenientes de ratones controles y tratados con la droga.

REFERENCIAS

1. Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. 2001. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. **Leukemia** **6:875-90**
2. Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. 2002. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. **Lancet Oncol.** **3:415-24**
3. Larrayoz IM, Casado FJ, Pastor-Anglada M, Lostao MP. 2004. Electrophysiological characterization of the human Na⁺/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. **J. Biol. Chem.** **279:8999-07**
4. Zhang M, Smith A, Gorski W. 2004. Carbon nanotube-chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes. **Anal Chem.** **76:5045-50**
5. Baldwin, S.A., Mackey, J.R., Cass, C.E., Young, J.D., 1999. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. **Mol. Med. Today** **5:216-24**
6. Gray, J.H., Owen, R.P., Giacomini, K.M. 2004. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. **Pflugers Arch** **447:728-34**
7. Pastor-Anglada, M., Casado, F.J. 1998. Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. **Trends Pharmacol. Sci** **19:424-30**
8. Pastor-Anglada, Cano-Soldadoa, Molina-Arcasa, Lostaob, Larrayozb, Martinez-Picadoc, Casado. 2005. Cell entry and export of nucleoside analogues. **Virus Research** **107:151-64**
9. Cass CE, Young JD, Baldwin SA, Cabrita MA, Graham KA, Griffiths M, Jennings LL, Mackey JR, Ng AM, Ritzel MW, et al. 1999. Nucleoside transporters of mammalian cells. **Pharm. Biotechnol.** **12:313-52**
10. Pastor-Anglada, M., Molina-Arcas, M., Casado, F.J., Bellosillo, B., Colomer, D., Gil, J. 2004. Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. **Leukemia** **18:385-93**
11. Hyde RJ, Cass CE, Young JD, Baldwin SA. 2001. The ENT family of eukaryote nucleoside and nucleobase transporters: recent advances in the investigation of structure/function relationships and the identification of novel isoforms. **Mo.I Membr. Biol.****18:53-63**
12. Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. 2004. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. **Pflugers Arch.** **447:735-43**
13. Acimovic, Y and Coe, IR. 2002. Molecular evolution of the equilibrative nucleoside transporter family: identification of novel family members in prokaryotes and eukaryotes. **Mol. Biol. Evol.** **19:2199-210**

14. Kufe DW, Weichselbaum R, Egan EM, Dahlberg W, Fram RJ. 1984. Lethal effects of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine incorporation into deoxyribonucleic acid during ultraviolet repair. **Mol. Pharmacol.** **25:322-26**
15. Sandoval A, Consoli U, Plunkett W. 1996. Fludarabine-mediated inhibition of nucleotide excision repair induces apoptosis in quiescent human lymphocytes **Clin. Cancer Res.** **2:1731-41**
16. Reichard P. 1988. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis **Annu. Rev. Biochem.** **5:349-74**
17. Fernandez-Calotti P, Jordheim LP, Giordano M, Dumontet C, Galmarini CM. 2005. Substrate cycles and drug resistance to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (araC). **Leuk. Lymphoma** **46:335-46**
18. Bianchi V, Spsychala J. 2003. Mammalian 5'-nucleotidases **J. Biol. Chem.** **278:46195-98**
19. Brockman RW, Schabel FM Jr, Montgomery JA. 1997. Biologic activity of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine, a metabolically stable analog of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine. **Biochem. Pharmacol.** **26:2193-96**
20. Chelson BD. 1992. New antimetabolites in the treatment of human malignancies. **Semin. Oncol.** **19:695-06**
21. Sorensen JM, Vena DA, Fallavollita A et al. 1997. Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: five year follow-up report. **J. Clin. Oncol.** **15:458-65**
22. Foran JM, Oscier D, Orchard J et al. 1999. Pharmacokinetic study of single doses of oral fludarabine phosphate in patients with "low-grade" non-Hodgkin's lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. **J. Clin. Oncol.** **17:1574-79**
23. Weiss L, Abdul-Hai A, Or R, Amir G, Polliack A. 2003. Fludarabine in combination with cyclophosphamide decreases incidence of GVHD and maintains effective graft-versus-leukemia effect after allogeneic stem cell transplantation in murine lymphocytic leukemia. **Bone Marrow Transplant.** **31:11-15**
24. Basara N, Roemer E, Kraut L, Guenzelmann S, Schmetzer B, Kiehl MG, Fauser AA. 2002. Reduced intensity preparative regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center experience. **Bone Marrow Transplant.** **30:651-59**
25. Aksoy S, Abali H, Kilickap S, Dincer M, Erman M. 2005. Fludarabine phosphate may be useful in the treatment of graft-versus-host disease. **Med. Hypotheses** **64:1150-52**
26. Gati WP, Paterson ARP, Belch AR. 1998. Es nucleoside transporter content of acute leukemia cells: role in cell sensitivity to cytarabine. **Leuk. Lymphoma** **32:45-54**

27. Ritzel MW, Ng AM, Yao SY, et al. 2001. Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). **J. Biol. Chem.** **276:2914-27**
28. Molina-Arcas M, Bellosillo B, Casado FJ, et al. 2003. Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood** **101:2328-34**
29. Plunkett W, Gandhi V, Huang P, Robertson LE, Yang LY, Gregoire V, Estey E, Keating MJ. 1993. Fludarabine: pharmacokinetics, mechanisms of action, and rationales for combination therapies. **Semin. Oncol.** **20:2-12**
30. Molina-Arcas M, Marce S, Villamor N, Huber-Ruano I, Casado FJ, Bellosillo B, Montserrat E, Gil J, Colomer D and Pastor-Anglada M. 2005. Equilibrative nucleoside transporter-2 (hENT2) protein expression correlates with ex vivo sensitivity to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. **Leukemia** **19:64-68**
31. Mackey J R, Galmarini C M, Graham K A, Joy A, Delmer A, Dabbagh L, Glubrecht D, Jewell LD, Lai R, Lang T, Hanson J, Young J, Merle-Beral H, Binet J, Cass CE, and Dumontet C. 2005. Quantitative analysis of nucleoside transporter and metabolism gene expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL): identification of fludarabine-sensitive and -insensitive populations. **Blood** **15:2 767-74**
32. Huang P, Plunkett W. 1991. Action of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine on RNA metabolism. **Mol. Pharmacol.** **39:449-55**
33. Kawasaki H, Carrera C, Piro L, Saven A, Kipps T and Carson D. 1993. Relationship of dck and 5'NT to the chemotherapeutic efficacy of 2-Cda. **Blood** **81: 597-01**
34. Huang P, Chubb S, Plunkett W. 1990. Termination of DNA synthesis by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. A mechanism for cytotoxicity. **J. Biol. Chem.** **25; 265:6617-25**
35. Gandhi V, Plunkett W. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. 2002. **Clin. Pharmacokinet.** **41:93-03**
36. Pettitt AR. 2003. Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. **Br. J. Haematol.** **121:692-02**
37. Genini D, Budihardjo I, Plunkett W, Wang X, Carrera CJ. 2000. Nucleotide requirements for the in vitro activation of the apoptosis protein-activating factor-1-mediated caspase pathway. **J. Biol. Chem.** **275: 29-34**
38. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR. 2000. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. **N. Engl. J. Med.** **343: 1750-57**
39. Robak T. 2005. Therapy of chronic lymphocytic leukaemia with purine

nucleoside analogues: facts and controversies. **Drugs Aging** 22:983-12

40. Lotfi K, Juliusson G, Albertioni F. 2003. Pharmacological basis for cladribine resistance. **Leuk. Lymphoma** 44: 705-12
41. Mansson E, Flordal E, Liliemark J, Spasokoukotskaja T, Elford H, Lagercrantz S, Eriksson S, Albertioni F. 2003. Downregulation of deoxycytidine kinase in human leukemic cell lines resistant to cladribine and clofarabine and increased ribonucleotide reductase activity contributes to fludarabine resistance. **Biochem. Pharmacol.** 65:237-47
42. Dumontet C, Fabianowska-Majewska K, Mantincic D, Callet Bauchu E, Tigaud I, Gandhi V, Lepoivre M, Peters GJ, Rolland MO, Wyczechowska D, Fang X, Gazzo S, Voorn DA, Vanier-Viornerly A, MacKey J. 1999. Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. **Br. J. Haematol.** 106:78-85
43. Veuger MJ, Honders MW, Landegent JE, Willemze R, Barge RM. 2000. High incidence of alternatively spliced forms of deoxycytidine kinase in patients with resistant acute myeloid leukemia. **Blood** 96:1517-24
44. Owens JK, Shewach DS, Ullman B, Mitchell BS. 1992. Resistance to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in human T-lymphoblasts mediated by mutations within the deoxycytidine kinase gene. **Cancer Res.** 52: 2389-93
45. Kong XB, Tong WP, Chou TC. 1991. Induction of deoxycytidine kinase by 5-azacytidine in an HL-60 cell line resistant to arabinosylcytosine. **Mol. Pharmacol.** 39:250-57
46. Hunsucker SA, Spychala J, Mitchell BS. 2001. Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance. **J. Biol. Chem.** 276:10498-04
47. Pieters R, Huismans DR, Loonen AH, Peters GJ, Hahlen K, van der Does-van den Berg A, van Wering ER, Veerman AJ. 1992. Relation of 5'-nucleotidase and phosphatase activities with immunophenotype, drug resistance and clinical prognosis in childhood leukemia. **Leuk. Res.** 16:873-80
48. Schirmer, M., Stegmann, A. P., Geisen, F, Konwalinka, G. 1998. Lack of crossresistance with gemcitabine and cytarabine in cladribine-resistant HL60 cells with elevated 5-nucleotidase activity. **Exp. Hematol.** 26:1223-28
49. Galmarini, C. M., Thomas, X., Graham, K., Jafaari, A. E., Cros, E., Jordheim, L., Mackey, J. R., Dumontet, C. 2003. Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine **Br. J. Haematol.** 122:53-60
50. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer** 26: 239-43
51. Edinger AL, Thompson CB. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Curr. Opin. Cell Biol.** 16:663-69

52. Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M, Diederich M. 2003 . An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. **Ann. NY Acad. Sci.** **1010:1-8**
53. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer** **73:3108-13**
54. Roos A, Xu W, Castellano G, Nauta AJ, Garred P, Daha MR, van Kooten C. 2004. Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. **Eur. J. Immunol.** **34:921-29**
55. Kim R. 2005. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. **Cancer** **103:1551-60**
56. Shi Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Mol. Cell** **9:459-65**
57. Wang X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes Dev.** **15:2922-29**
58. Blagosklonny MV. 2000. Cell death beyond apoptosis. **Leukemia** **14:1502-07**
59. Konopleva M, Shao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF, Estrov Z, Kornblau SM, Andreef M. 1999. Apoptosis. Molecules and mechanisms. **Adv.Exp.Med.Biol.** **457:217-21**
60. Kroemer G. 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nature Medicine** **3:614-19**
61. Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science** **281:1322-28**
62. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. 2001. Regulation and function of p53 tumor suppressor protein. **Current Opin. Cell Biol.** **13:332-37**
63. Blagosklonny MV. 2001. Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation. **Leukemia** **15:869-75**
64. Reed JC. 1996. Balancing cell life and death: bax, apoptosis, and breast cancer. **J. Clin. Invest.** **1:2403-04**
65. Reed JC. 1998. Bcl-2 family proteins. **Oncogene** **24:3225-36**
66. Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, White E. 2003. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. **Genes Dev.** **1:2922-32**
67. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. 2003. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. **Nature** **11:671-76**

68. Craig RW. 2002. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. **Leukemia** **16:444-54**
69. Derenne S, Monia B, Dean NM, Taylor JK, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R, Amiot M. 2002. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. **Blood** **1:194-99**
70. Jorg Michels, Peter W. M. Johnson, Graham Packham. 2005. Mcl-1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** **3:267-71**
71. Zhou P, Levy NB, Xie H, Qian L, Lee CY, Gascoyne RD, Craig RW. 2001. MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. **Blood** **15:3902-09**
72. Luttrell DK, Luttrell LM. 2003. Signaling in time and space: G protein-coupled receptors and mitogen-activated protein kinases. **Assay Drug Dev. Technol.** **1:327-38**
73. Uhlik MT, Abell AN, Cuevas BD, Nakamura K, Johnson GL. 2004. Wiring diagrams of MAPK regulation by MEKK1, 2, and 3. **Biochem. Cell Biol.** **82:658-63**
74. Johnson GL, Dohlman HG, Graves LM. 2005. MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression. **Curr. Opin. Chem. Biol.** **9:325-31**
75. Davis R. 1999. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. **Biochem. Soc. Symp.** **64:1-12**
76. Torii S, Nakayama K, Yamamoto T, Nishida E. 2004. Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. **J. Biochem.** **136:557-61**
77. Torres M, Forman HJ. 2003. Redox signaling and the MAP kinase pathways. **Biofactors** **17:287-96**
78. Roux PP, Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** **68:320-44**
79. Smith, A., Ramos-Morales, F., Ashworth, A. & Collins, M. 1997. A role for JNK/SAPK in proliferation, but not apoptosis, of IL-3- dependent cells. **Curr. Biol.** **7:893-6**
80. Schaeffer, H. J. & Weber, M. J. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Mol. Cell. Biol.** **19:2435-44**
81. Himes SR, Sester DP, Ravasi T, Cronau SL, Sasmono T, Hume DA. 2006. The JNK Are Important for Development and Survival of Macrophages. **J. Immunol.** **15:2219-28**
82. Chang, L. & Karin, M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature** **410:37-40**

83. Xia, Y., Makris, C., Su, B., Li, E., Yang, J., Nemerow, G. R. & Karin, M. 2000. MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. **Proc Natl Acad Sci U S A** **97:5243-47**
84. Yujiri, T., Sather, S., Fanger, G. R. & Johnson, G. L. 1998. Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. **Science** **282, 1911-4**
85. Dumaz N, Marais R. 2005. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft fur Biochemie und Molekularbiologie. **FEBS J.** **272:3491-04**
86. Nishina, H., Fischer, K. D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E. A., Bernstein, A., Mak, T. W., Woodgett, J. R. & Penninger, J. M. 1997. Stress-signalling kinase Sek1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. **Nature** **385:350-53**
87. Almeida, E. A., Ilic, D., Han, Q., Hauck, C. R., Jin, F., Kawakatsu, H., Schlaepfer, D. D. & Damsky, C. H. 2000. Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH (2)-terminal kinase. **J. Cell Biol.** **149:741-54**
88. Ip, Y. T. & Davis, R. J. 1998. Signal transduction by the c-jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. **Current Op. Cell Biol.** **10:205-19**
89. Chen, Y. R. & Tan, T. H. 2000. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling. **Int. J. Oncol.** **16:651-62**
90. Han, J., Lee, J. D., Tobias, P. S. & Ulevitch, R. J. 1993. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. **J. Biol. Chem.** **268:25009-14**
91. Lu, H. T., Yang, D. D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R. J. & Flavell, R. A. 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. **Embo J.** **18:1845-57**
92. Perregaux, D. G., Dean, D., Cronan, M., Connelly, P. & Gabel, C. A. 1995. Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence. **Mol. Pharmacol.** **48:433-42**
93. Ono, K. & Han, J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. **Cell Signal** **12:1-13**
94. Sugden, P. H. & Clerk, A. 1997. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. **Cell Signal** **9:337-51**
95. Kolch, W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem J.** **351:289-05**
96. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. 2005. Chronic lymphocytic leukemia. **N. Engl. J. Med.** **352:804-15**
97. Montserrat E, Bosch F, Rozman C. 1997. B-cell chronic lymphocytic leukemia:

recent progress in biology, diagnosis, and therapy. **Ann Oncol 8:93-01**

98. Houlston RS, Sellick G, Yuille M, Matutes E, Catovsky D. . 2003. Causation of chronic lymphocytic leukemia--insights from familial disease. **Leuk. Res. 27:871-76**

99. Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL, 1991. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. **Blood 78:1901-11**

100. Dono M, Cerruti G, Zupo S.2004. The CD5+ B-cell. **Int. J. Biochem. Cell Biol. 36:2105-11**

101. Kipps, T. 1998. Signal transduction pathways and mechanisms of apoptosis in CLL B-lymphocytes: their role in CLL pathogenesis. **Hematol. Cell Ther. 39:17-21**

102. Raghoebier S, van Krieken JH, Kluin-Nelemans JC, Gillis A, van Ommen GJ, Ginsberg AM, Raffeld M, Kluin PM. 1991. Oncogene rearrangements in chronic B-cell leukemia.. **Blood 77:1560-64**

103. Dyer, MJS, Zani, VJ, Lu, WZ . 1994. BCL2 translocations in leukemias of mature B cells. **Blood 83:3682-88**

104. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata . 1998. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: Correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. **Blood 91:3379-89**

105. Hamblin T.J., Oscier D.J. y Young B.J. 1986. Autoimmunity in chronic lymphocytic leukemia. **J. of Clin. Pathol. 39:713-19**

106. Robertson, L.E. and Plunkett, W. 1993. Apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia. **Leuk. Lymphoma 11:71**

107. Munk Pedersen I, Reed J. 2004. Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells.**Leuk. Lymphoma 45:2365-72**

108. Ghia P, Caligaris-Cappio F. 2000The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. **Adv. Cancer Res. 79:57**

109. Gamberale R, Geffner J, Arrosagaray G, Scolnik M, Salamone G, Trevani A, Vermeulen M, Giordano M. 2001. Non-malignant leukocytes delay spontaneous B-CLL cell apoptosis. **Leukemia 15:1860-67**

110. Kern C, Cornuel JF, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, Defrance T, Aichenbaum-Cymbalista F, Simonin PY, Feldblum S, Kolb JP. 2004. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. **Blood 103:679-88**

111. Jewell AP. 1996. Interferon-alpha, Bcl-2 expression and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leuk. Lymphoma 21:43-47**

112. Chaouchi N, Wallon C, Taieb J, Auffredou MT, Tertian G, Lemoine FM,

Delfraissy JF, Vazquez A. 1994. Interferon-alpha-mediated prevention of in vitro apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B cells: role of bcl-2 and c-myc. **Clin. Immunol. Immunopathol.** **73:197-04**

113. Buschle M, Campana D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV, Brenner MK. 1993. Interferon γ inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. **J Exp. Med.** **177:213-17**

114. Steinke JW, Borish L. 2001. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. **Respir. Res.** **2:66-70**

115. Oskar S. Frankfurt, John J. Byrnest, Luis Villa. 1997. Protection From apoptotic cell death by Interleukin-4 is increased in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients. **Leukemia Research** **21:9-16**

116. Lemaire C, Andr au K, Fraisse CS, Adam A, Souvannavong V. 1999. IL-4 inhibits apoptosis and prevents mitochondrial damage without inducing the switch to necrosis observed with caspase inhibitors. **Cell Death Differ.** **6:813-20**

117. Mentz F, Mossalayi MD, Ouaz F, Baudet S, Issaly F, Ktorza S, Semichon M, Binet JL, Merle-Beral H. 1996. Theophylline synergizes with chlorambucil in inducing apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood** **15:2172-82**

118. Francia di Celle P, Mariani S, Riera L, Stacchini A, Reato G, Foa R. 1996. Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. **Blood** **87:4382-89**

119. Molica S, Vitelli G, Levato D, Levato L, Dattilo A, Gandolfo GM. 1999. Clinico-biological implications of increased serum levels of interleukin-8 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica** **84:208-11**

120. Lagneaux, L, Delforge, A, Bron, D, De Bruyn, C, Stryckmans, P. 1999. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. **Leuk. Lymphoma** **35:445-49**

121. Plate JM, Long BW, Kelkar SB. 2000. Role of $\beta 2$ integrins in the prevention of apoptosis induction in CLL-B cells. **Leukemia** **14:34-39**

122. Schattner EJ. 2000. CD40 ligand in CLL pathogenesis and therapy. **Leuk. Lymphoma** **37:461-72**

123. Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. 1988. Abnormal blood monocytes in chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Res.** **48:4812-18**

124. Bartik MM, Welker D, Kay NE. 1998. Impairments in immune cell function in B cell chronic lymphocytic leukemia. **Semin. Oncol.** **25:27-33**

125. Catovsky, D, Murphy, RLW. 1995. Key issues in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia (CLL). **Eur. J. Cancer** **31:2146-64**

126. Busmanis I, Hussein S, Feleppa F, Rockman S, Begley CG. 1993 B cell chronic lymphocytic leukemia with florid reactive CD4+ T cell lymphocytosis in

lymph nodes. **Leuk. Lymphoma 9:153-59**

127. Rezvany MR, Jeddi-Tehrani M, Osterborg A, Kimby E, Wigzell H, Mellstedt H. 1999. Oligoclonal TCRBV gene usage in B-cell chronic lymphocytic leukemia: major perturbations are preferentially seen within the CD4 T-cell subset. **Blood 94:1063-1070**

128. Gorgun G, Holderried TA, Zahrieh D, Neuberg D, Gribben JG. 2005. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. **J. Clin. Invest. 115:1797-05**

129. Motta M, Rassenti L, Shelvin BJ, Lerner S, Kipps TJ, Keating MJ, Wierda WG. 2005. Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia 19:1788-93**

130. Cazin B, Maloum K, Divine M. 2001. Oral fludarabine and cyclophosphamide in previously untreated CLL: Preliminary data on 59 patients. **Blood 98:722a (abstr 3214)**

131. Robak T. 2004. Monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphoid leukemias. **Leuk. Lymphoma 45:205-19**

132. Hansen, M.M., Andersen, E., Christensen, B.E., Christiansen, I., Geisler, C., Kristensen, D. 1998. CHOP versus prednisolone + Chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia (CLL): preliminary results of a randomized multicenter study. **Nouvelle Revue Francaise D Hematologie 30:433-36**

133. Keating, M.J., Kantarjian, H., Talpaz, M., Redman, J., Koller, C., Barlogie, B. 1989. Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. **Blood 74:19-25**

134. Keating, M.J., O'Brien, S., Lerner, S., Koller, C., Beran, M., Robertson, L.E. 1998. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving Fludarabine regimens as initial therapy'. **Blood 92:1165-71**

135. Flinn IW, Byrd JC, Morrison C. 2000. Fludarabine and cyclophosphamide with filgrastim support in patients with previously untreated indolent lymphoid malignancies. **Blood 96:71-75**

136. O'Brien SM, Kantarjian HM, Cortes J. 2001. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. **J. Clin. Oncol. 19:1414-20**

137. Flinn IW, Jemai Y, Bennett JM. 1997. Fludarabine and cyclophosphamide achieves high complete response rate in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: ECOG. **Blood 98:633-39**

138. Byrd JC, Rai K, Peterson BL. 2005. The addition of rituximab to fludarabine significantly improves progression free survival and overall survival in untreated chronic lymphocytic leukemia patients. **Blood 105:49- 53**

139. Byrd JC, Peterson BL, Morrison VA. 2003. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in

symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: Results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). **Blood 101:6-14**

140. Schulz H, Klein SK, Rehwald U. 2002. Phase 2 study of a combined immunochemotherapy using rituximab and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia. **Blood 100:3115-20**

141. Zhu Q, Tan DCL, Samuel M, Chan ESY, Linn YC. 2004. Fludarabine in Comparison to Alkylator-based Regimen as Induction Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis, **Leuk. Lymphoma 45:2239-45**

142. Johnson S, Smith AG, Loffler H. 1996. Multicentre prospective randomized trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia: **The French Cooperative Group on CLL. Lancet 347:1432-38**

143. Marotta G, Bigazzi C, Lenoci M, Tozzi M, Bocchia M, Lauria F. 2000. Low-dose Fludarabine and cyclophosphamide in elderly patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia refractory to conventional therapy. **Haematologica 85:1268-70**

144. Myint, H. y col. Br. 1995. Fludarabine-related autoimmune haemolytic anaemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia. **J. Haematol. 91:341-346**

145. Di Raimondo. 1993. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia patients treated with fludarabine. **Leuk. Lymphoma 11:63-66**

146. Pritsch, O., Maloum, K. y Dighiero, G. 1998. Basic biology of autoimmune phenomena in chronic lymphocytic leukemia. **Semin. Oncol. 25:34-39**

147. Diehl, L.F. y Ketchum, L.H 1998. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. **Semin. Oncol. 25:80-84**

148. Dighiero, G. 1998. An attempt to explain disordered immunity and hypogammaglobulinemia in CLL. **Nouv Rev. Fr. Hematol. 30:283-286**

149. Morrison, V.A. 1998. The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. **Semin. Oncol. 25:98105-09**

150. Chenson BD, Bennet JM, Rai KR, Grever MR, Kay NE, Schiffer CA, Oken MM, Keating MJ, Bold DH, Kemping SJ, Foon KA. 1998. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: Recommendation of the National Cancer Institute-sponsored working group. **Am.J.Hematol. 29:152-158**

151. Nicoletti I, Migliorati MC, Pagliacci C, Grignani F, Ricciardi C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J. Immunol. Methods 139: 271-79**

152. Mackall CL. 2000. T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review. **Stem Cells 18:10-18**

153. Gergely P. 1999. Drug-induced lymphopenia: focus on CD4+ and CD8+ cells. **Drug Saf. 21:91-00**
154. Tsimberidou AM, Younes A, Romaguera J, Hagemester FB, Rodriguez MA, Feng L, Ayala A, Smith TL, Cabanillas F, McLaughlin P. 2005. Immunosuppression and infectious complications in patients with stage IV indolent lymphoma treated with a fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone regimen. **Cancer 104:345-53**
155. Dighiero G. 1996. Adverse and beneficial immunological effects of purine nucleoside analogues. **Hematol Cell Ther. 38:75-81**
156. Mackall, C.L., Fleisher, T.A., Brown, M.R., Andrich, M.P., Chen, C.C., Feuerstein, I.M., Magrath, I.T., Wexler, L.H., Dimitrov, D.S. & Gress, R.E. 1997. Distinctions between CD8⁺ and CD4⁺ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. **Blood 89:3700-07**
157. Eissner G, Multhoff G, Gerbitz A, Kirchner S, Bauer S, et al. 2002. Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. **Blood 100:334-40**
158. Vrana JA, Wang Z, Rao AS, Tang L, Chen JH, et al. 1999. Induction of apoptosis and differentiation by fludarabine in human leukemia cells (U937): interactions with the macrocyclic lactone bryostatins 1. **Leukemia 13:1046-55**
159. Harvey S, Decker R, Dai Y, Schaefer G, Tang L, et al. 2001. Interactions between 2-fluoroadenine 9-beta-D-arabinofuranoside and the kinase inhibitor UCN-01 in human leukemia and lymphoma cells. **Clin. Cancer Res. 7:320-30**
160. Diaconu CC, Bleotu C, Chivu M, Alexiu I, Petrusca D, Anton G, Achim R, Ruta SM, Cernescu C. 2004. The development of larger cells that spontaneously escape senescence--a step during the immortalization of a human cancer cell line. **J. Cell Mol. Med. 8:93-01**
161. Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG. 2004. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. **Biosci. Re. 24:631-39**
162. Mukaida N, Harada A, Matsushima K. 1998. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. **Cytokine Growth Factor Rev 9:9-23**
163. Pease JE, Sabroe I. 2002. The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. **Am. J. Respir. Med. 1:19-25**
164. Hasko, G., Szabo, C., Nemeth, Z.H., Kvetan, V., Pastores, S.M., and Vizi, E.S. 1996. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-, and nitric oxide production in RAW 2647 macrophages and in endotoxemic mice. **J. Immunol. 157:4634-40**
165. Baharav E, Bar-Yehuda S, Madi L, Silberman D, Rath-Wolfson L, Halpren M, Ochaion A, Weinberger A, Fishman P. 2005. Antiinflammatory effect of A3

adenosine receptor agonists in murine autoimmune arthritis models. **J. Rheumatol.** **32:469-76**

166. Meade CJ, Worrall L, Hayes D, Protin U. 2002. Induction of interleukin 8 release from the HMC-1 mast cell line: synergy between stem cell factor and activators of the adenosine A (2b) receptor. **Biochem. Pharmacol.** **15:317-25**

167. Tamanini A, Rolfini R, Nicolis E, Melotti P, Cabrini G. 2003. MAP kinases and NF-kappaB collaborate to induce ICAM-1 gene expression in the early phase of adenovirus infection. **Virology** **30:228-42**

168. Vlahopoulos S, Boldogh I, Casola A, Brasier AR. 1999. Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. **Blood** **94:1878-89**

169. Srinivasan S, Bolick DT, Hatley ME, Natarajan R, Reilly KB, et al. 2004. Glucose regulates interleukin-8 production in aortic endothelial cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in diabetes. **J. Biol. Chem.** **279:31930-36**

170. Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. **J. Leukoc. Biol.** **56:554-58**

171. Hang CH, Shi JX, Li JS, Li WQ, Yin HX. 2005. Up-regulation of intestinal nuclear factor kappa B and intercellular adhesion molecule-1 following traumatic brain injury in rats. **World J. Gastroenterol.** **28:1149-54**

172. Wu HM, Chi KH, Lin WW. 2002. Proteasome inhibitors stimulate activator protein-1 pathway via reactive oxygen species production. **FEBS Lett.** **526:101-05**

173. Hipp MS, Urbich C, Mayer P, Wischhusen J, Weller M, et al. 2002. Proteasome inhibition leads to NF-kappaB-independent IL-8 transactivation in human endothelial cells through induction of AP-1. **Eur. J. Immunol.** **32:2208-17**

174. Mitsuno Y, Yoshida H, Maeda S, Ogura K, Hirata Y, et al. 2001. Helicobacter pylori induced transactivation of SRE and AP-1 through the ERK signalling pathway in gastric cancer cells. **Gut** **49:18-22**

175. Herr I, Debatin KM. 2001. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. **Blood** **98: 2603-14**

176. Eriksson M, Arminen L, Karjalainen-Lindsberg ML, Leppa S. 2005. AP-1 regulates alpha2beta1 integrin expression by ERK-dependent signals during megakaryocytic differentiation of K562 cells. **Exp. Cell Res.** **304:175-86**

177. Vitiello M, D'Isanto M, Galdiero M, Raieta K, Tortora A. 2004. Interleukin-8 production by THP-1 cells stimulated by Salmonella enterica serovar Typhimurium porins is mediated by AP-1, NF-kappaB and MAPK pathways. **Cytokine** **27:15-24**

178. Chen CC, Chow MP, Huang WC, Lin YC, Chang YJ. 2004. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and

nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. **Mol. Pharmacol.** **66:683-93**

179. Giblett ER, Anderson JE, Cohen F, Pollara B, Meuwissen HJ. 1972. Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. **Lancet.** **18:1067-69**

180. Dogan AL, Dogan A, Canpinar H, Duzguncinar O, Demirpence E. 2004. Effect of fludarabine on leukocyte functions. **Chemotherapy** **50:283-88**

181. Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Pons G, Montserrat E, and Gilj J. 1999. In Vitro Evaluation of Fludarabine in Combination with Cyclophosphamide and/or Mitoxantrone in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. **Blood** **94:2836-43**

182. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Suzuki K, Ichikawa A, Furukawa Y, Bai L, Kon K. 2000. In vitro cytotoxic effects of fludarabine (2-F-ara-A) in combination with commonly used antileukemic agents by isobologram analysis. **Leukemia** **14:379-88**

183. Dogan AL, Dogan A, Canpinar H, Duzguncinar O, Demirpence E. 2004. Effect of fludarabine on leukocyte functions. **Chemotherapy** **50:283-88**

184. Ottonello L, Cutolo M, Frumento G, Arduino N, Bertolotto M, Mancini M, Sottofattori E, Dallegri F. 2002. Synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis inhibits neutrophil apoptosis: role of adenosine and proinflammatory cytokines. **Rheumatology (Oxford)** **41:1249-60**

185. Balakrishnan K, Wierda WG, Keating MJ, Gandhi V. 2005. Mechanisms of cell death of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by RNA-directed agent, 8-NH₂-adenosine. **Clin. Cancer Res.** **11:6745-52**

186. Consoli U, El-Tounsi I, Sandoval A, Snell V, Kleine HD, Brown W, Robinson JR, DiRaimondo F, Plunkett W, Andreeff M. 1998. Differential induction of apoptosis by fludarabine monophosphate in leukemic B and normal T cells in chronic lymphocytic leukemia. **Blood** **91:1742-48**

187. Davis JC Jr, Fessler BJ, Tassioulas IO, McInnes IB, Yarboro CH, Pillemer S, Wilder R, Fleisher TA, Klippel JH, Boumpas DT. 1998. High dose versus low dose fludarabine in the treatment of patients with severe refractory rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.** **25:1694-04**

188. Hutton JJ, Von Hoff DD, Kuhn J, Phillips J, Hersh M, Clark G. 1984. Phase I clinical investigation of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-monophosphate (NSC 312887), a new purine antimetabolite. **Cancer Res.** **44:4183-86**

189. Boldt DH, Von Hoff DD, Kuhn JG, Hersh M. 1984. Effects on human peripheral lymphocytes of in vivo administration of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine-5'-monophosphate (NSC 312887), a new purine antimetabolite. **Cancer Res.** **44:4661-66**

190. Meloni G, Proia A, Mauro FR, Amaranto A, Capria S, Cimino G, Cordone I, De Fabritiis P, Rapanotti C, Reato G, Vignetti M, Foa R, Mandelli F. 2000. Unmanipulated peripheral blood stem cell autograft in chronic lymphocytic leukemia:

clinical findings and biological monitoring. **Haematologica** 85:952-60

191. Petersen SL, Ryder LP, Bjork P, Madsen HO, Heilmann C, Jacobsen N, Sengelov H, Vindelov LL. 2003. A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors. **Bone Marrow Transplant.** 32:65-72

192. Sanders C, Perez EA, Lawrence HJ. 1992. Opportunistic infections in patients with chronic lymphocytic leukemia following treatment with fludarabine. **Am. J. Hematol.** 39:314-15

193. Mackall CL, Gress RE. 1997. Thymic aging and T-cell regeneration. **Immunol. Rev.** 160:91-02

194. Honda K, Takada H, Nagatoshi Y, Akazawa K, Ohga S, Ishii E, Okamura J, Hara T. 2000. Thymus-independent expansion of T lymphocytes in children after allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.** 25:647-52

195. Nociari MM, Telford W, Russo C. 1999. Post-thymic development of CD28-CD8+ T cell subset: age-associated expansion and shift from memory to naive phenotype. **J. Immunol.** 162:3327-35

196. Eysteinsdottir JH, Freysdottir J, Haraldsson A, Stefansdottir J, Skaftadottir I, Helgason H, Ogmundsdottir HM. 2004. The influence of partial or total thymectomy during open heart surgery in infants on the immune function later in life. **Clin. Exp. Immunol.** 136:349-55

197. Gamberale R, Fernandez-Calotti P, Sanchez-Avalos J, Alberto MF, Geffner J, Giordano M. 2006. The effect of fludarabine on interferon-gamma production by lymphoid cells from healthy donors and patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica** 91:574-76

198. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science** 270:1326-31

199. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. **FEBS Lett.** 487:318-22

200. Stone AA, Chambers TC. 2000. Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. **Exp. Cell Res.** 254:110-19

201. Brantley-Finley C, Lyle CS, Du L, Goodwin ME, Hall T. 2003. JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. **Biochem. Pharmacol.** 66: 459-69

202. Sampath D, Plunkett W. 2000. The role of c-Jun kinase in the apoptotic response to nucleoside analogue-induced DNA damage. **Cancer Res.** 60: 6408-15

203. Maggio SC, Rosato RR, Kramer LB, Dai Y, Rahmani M. 2004. The histone deacetylase inhibitor MS-275 interacts synergistically with fludarabine to induce apoptosis in human leukemia cells. **Cancer Res.** 64: 2590-00

204. Fang J, Cao Z, Chen YC, Reed E, Jiang BH. 2004. 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine inhibits expression of vascular endothelial growth factor through hypoxia-inducible factor-1 in human ovarian cancer cells. **Mol. Pharmacol.** **66**: 178-86
205. Ruiz-Ramos R, Cebrian ME, Garrido E. 2005. Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells. **Toxicology** **209**:279-87
206. Locher R, Brandes RP, Vetter W, Barton M. 2002. Native LDL induces proliferation of human vascular smooth muscle cells via redox-mediated activation of ERK 1/2 mitogen-activated protein kinases. **Hypertension** **39**:645-50
207. Rutault K, Alderman C, Chain BM, Katz DR. 1999. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. **Free Radic. Biol. Med.** **26**:232-38
208. Biswal S, Datta K, Acquah-Mensah G, Kehrer J. 2000. Changes in ceramide and sphingomyelin following fludarabine treatment of human chronic B-cell leukemia cells. **Toxicology** **154**:45-53
209. Li Q, Engelhardt JF. 2006. Interleukin-1beta induction of NFkappaB is partially regulated by H2O2-mediated activation of NFkappaB-inducing kinase. **J. Biol. Chem.** **281**:1495-05
210. Ryan KA, Smith MF Jr, Sanders MK, Ernst PB. 2004. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. **Infect. Immun.** **72**:2123-30
211. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. **J. Leu. Biol.** **72**:847-55
212. Foran JM, Oscier D, Orchard J, Johnson SA, Tighe M, Cullen MH, de Takats PG, Kraus C, Klein M, Lister TA. 1999. Pharmacokinetic study of single doses of oral fludarabine phosphate in patients with "low-grade" non-Hodgkin's lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. **J. Clin. Oncol.** **17**:1574-79

Publicaciones que comprenden resultados presentados en esta Tesis:

1. Gamberale R, Galmarini CM, Fernández-Calotti P, Jordheim L, Sanchez Avalos J, Dumontet C, Geffner J, Giordano M. 2003. In vitro susceptibility of CD4+ and CD8+ T cell subsets to fludarabine. **Biochem. Pharmacol. 66:2185-91**
2. Fernández-Calotti P, Gamberale R, Costas M, Sánchez Ávalos J, Geffner J, Giordano M. 2006. Fludarabine induces pro-inflammatory activation of human monocytic cells through a MAPK/ERK pathway. **International Immunopharmacology 6:715-23**
3. Fernandez-Calotti P, Jordheim LP, Giordano M, Dumontet C, Galmarini CM. 2005. Substrate cycles and drug resistance to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (araC). **Leuk. Lymphoma 46:335-46**