

Tesis Doctoral

# Leucemia linfocítica crónica de células B: el papel de las señales del microambiente en la patogénesis de la enfermedad

Borge, Mercedes

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Borge, Mercedes. (2012). Leucemia linfocítica crónica de células B: el papel de las señales del microambiente en la patogénesis de la enfermedad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Borge, Mercedes. "Leucemia linfocítica crónica de células B: el papel de las señales del microambiente en la patogénesis de la enfermedad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Leucemia Linfocítica Crónica de células B: el papel  
de las señales del microambiente en la patogénesis  
de la enfermedad.**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área: Ciencias Biológicas*

**Tesista: Mercedes Borge**

**Director de tesis: Dra. Romina Gamberale**

**Consejero de Estudios: Dr. Omar Coso**

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunología Oncológica. Instituto de  
Medicina Experimental (IMEX) - CONICET. Academia Nacional de Medicina**

Buenos Aires, Julio 2012

## INDICE

---

AGRADECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN.....	11
1. La quimiocina CXCL12 y su principal receptor, el CXCR4. ....	12
a. CXCL12.....	12
b. CXCR4, el principal receptor para el CXCL12.....	13
c. Papel del CXCR4 en la fisiología de los linfocitos T .....	17
2. Leucemia linfocítica crónica de células B .....	19
a. Características fenotípicas de las células LLC.....	20
b. Clasificación de los pacientes con LLC.....	22
c. La importancia del microambiente en la patogénesis de la LLC .....	27
d. El papel del CXCL12 y los linfocitos T en la patogénesis y progresión de la LLC .....	29
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1. Reactivos generales y anticuerpos. ....	38
2. Obtención de células LLC y de dadores sanos.....	39
3. Ensayos de migración de los linfocitos T en respuestas al CXCL12.....	41
4. Internalización del CXCR4 en respuesta al CXCL12. ....	42
5. Polimerización de actina. ....	43
6. Experimentos de co-cultivos. ....	44
7. Ensayos de coestimulación de linfocitos T.....	44
8. Obtención de células de tipo nodriza ( <i>nurse like cells</i> , NLC).....	44
9. Citometría de flujo. ....	45
10. Microscopía confocal .....	49
11. Análisis estadísticos.....	49
RESULTADOS .....	50
RESULTADOS OBJETIVO N°1.....	52
1. Los linfocitos T de los pacientes LLC migran menos en respuesta al CXCL12 en comparación a los linfocitos T provenientes de dadores sanos. ....	52
2. Los linfocitos T de los pacientes LLC ZAP-70 <sup>-</sup> migran menos en respuesta al CXCL12 en comparación a los linfocitos T provenientes de los pacientes ZAP-70 <sup>+</sup> .....	60

3. La polimerización de los microfilamentos de actina en los linfocitos T y la endocitosis del CXCR4 luego del tratamiento con CXCL12 es similar en los pacientes ZAP-70 <sup>-</sup> y ZAP-70 <sup>+</sup> . 64	
4. La menor migración de los linfocitos T de los pacientes LLC ZAP-70 <sup>-</sup> no se asocia con una menor expresión de ZAP-70, CD3, CD45 o CD38 en esas células. ....	66
5. Las células leucémicas de los pacientes ZAP-70 <sup>-</sup> y no la de los pacientes ZAP-70 <sup>+</sup> reducen la migración de los linfocitos T autólogos en respuesta al CXCL12. ....	69
RESULTADOS OBJETIVO N°2.....	72
1. El CXCL12 aumenta la expresión de marcadores de activación sobre los linfocitos T de pacientes con LLC estimulados a través del TCR.....	72
2. El CXCL12 aumenta la expresión de IFN $\gamma$ en los linfocitos T de pacientes con LLC estimulados a través del TCR. ....	78
3. El CXCL12 aumenta el tamaño y la proliferación de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de pacientes con LLC estimulados a través del TCR. ....	79
4. Los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de pacientes LLC ZAP-70 <sup>+</sup> y ZAP-70 <sup>-</sup> activados en presencia de CXCL12 poseen similares niveles de coestimulación. ....	82
5. Los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados en presencia de CXCL12 inducen una mayor activación y proliferación de las células leucémicas. ....	84
RESULTADOS OBJETIVO N°3.....	87
1. Las células de tipo nodriza (NLC) diferenciadas <i>in vitro</i> contactan con los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> de pacientes con LLC e inducen la endocitosis del receptor para CXCL12.....	87
2. Las células de tipo nodriza (NLC) incrementan la activación de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> autólogos estimulados a través del TCR. ....	90
3. La coestimulación inducida por las NLC sobre la activación de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> es en parte mediada por el CXCR4. ....	92
DISCUSIÓN.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	107

## AGRADECIMIENTOS

---

Quería agradecer a las siguientes personas que me acompañaron y fueron una parte fundamental durante la realización de la tesis:

- A Romina Gamberale, mi directora y mentora. Gracias por acompañarme y guiarme con tanta dedicación. Durante todos estos años me has transmitido la pasión y el amor por nuestro trabajo, y todo lo que logré en este campo se lo debo a tu paciencia y apoyo. Gracias por empujarme y darme confianza en cada momento de duda. Disfruté y aprendí muchísimo todos estos años de trabajo!
- A Paula Nannini y Pablo Morande, mis compañeros de todos los días. Me alegra muchísimo haberlos conocido, sin su ayuda mi tesis no habría sido posible. Gracias por la ayuda laboral y personal que me dieron todos estos años!
- A Mirta Giordano, gracias por tu ayuda, por los consejos y por acompañarme durante toda la tesis.
- A Monica Vermeulen, gracias por la ayuda indispensable que me das todos los días en el laboratorio.
- A todos mis compañeros de Inmunoonco, todos y cada uno de ustedes me han ayudado muchísimo para que hoy yo pueda estar entregando este trabajo de tesis.
- **A mi familia, Edu y Facu, son el sostén y la alegría de mi vida.**

## ABREVIATURAS

---

**BCR:** *B-cell receptor*, receptor antigénico de linfocitos B

**BSA:** Seroalbúmina bovina

**CFSE:** Carboxyfluorescein succinimidyl ester

**CMT:** Células mononucleares totales

**DMSO:** Dimetilsulfoxido

**HEV:** Vénulas de endotelios altos

**HMS:** Hiper mutación somática

**Ig:** Inmunoglobulina

**IgVH:** Región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina

**LB:** Linfocitos B

**LLC:** Leucemia Linfocítica Crónica de células B

**LT:** Linfocitos T

**mAcs:** Anticuerpos monoclonales

**NLC:** *nurse like cells*, células tipo nodriza

**PBS:** Tampón fosfato salino

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**TCR:** *T-cell receptor*, receptor antigénico de linfocitos T

## RESUMEN

---

## RESUMEN

---

### **Leucemia Linfocítica Crónica de células B: el papel de las señales del microambiente en la patogénesis de la enfermedad.**

Las células leucémicas de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica de células B (LLC) proliferan en los órganos linfoides, donde la quimiocina CXCL12 proveniente de células estromales y de células de tipo nodriza (NLC), y moléculas como CD40L e IFN $\gamma$  producidas por linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, favorecen su expansión y sobrevida. Existen numerosos estudios donde se evalúa el efecto del CXCL12 sobre el clon leucémico, pero no había sido estudiado hasta el momento el impacto de dicha quimiocina en la fisiología de los linfocitos T de pacientes con LLC.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el CXCL12 induce la migración de linfocitos T de pacientes LLC, aunque en menor medida que la de linfocitos T de dadores sanos, hecho que se correlaciona con una menor polimerización de actina en respuesta al CXCL12. Además, observamos que los linfocitos T de pacientes de buen pronóstico migran menos en respuesta al CXCL12 en comparación a linfocitos T de pacientes de mal pronóstico debido a señales provenientes del clon leucémico. También demostramos que el CXCL12 actúa como un factor coestimulante de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC, incrementando su activación y proliferación, y que los linfocitos T activados en presencia de CXCL12 inducen una mayor proliferación del clon leucémico. Por último, demostramos que las NLC contactan con linfocitos T CD4<sup>+</sup> y aumentan su activación y proliferación, en parte, a través del receptor para CXCL12, el CXCR4.

Como conclusión, nuestros resultados demuestran que el CXCL12 tiene un rol dual sobre los linfocitos T de pacientes LLC, induciendo la migración y

también aumentando su activación y proliferación, favoreciendo en última instancia la expansión del clon leucémico. Considerando que la presencia de los linfocitos T en los órganos linfoides favorece que las células leucémicas sobrevivan y proliferen, la menor migración al CXCL12 de los linfocitos T de pacientes de buen pronóstico podría estar involucrada en el curso clínico indolente característico de esos pacientes.

Palabras claves: LEUCEMIA LINFOCITICA CRÓNICA DE CÉLULAS B; CXCL12; CXCR4; CÉLULAS DE TIPO NODRIZA; MICROAMBIENTE TUMORAL.

## **ABSTRACT**

---

## ABSTRACT

---

### **B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia: role of the microenvironment in the pathogenesis of the disease.**

Leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) proliferate in lymphoid organs in close contact with activated T cells and CXCL12's producer stromal and nurse like cells (NLC). CD4<sup>+</sup> T cells induce CLL cell proliferation and survival mainly through CD40L and IFN $\gamma$  production, and CXCL12 enhances CLL survival. While a number of reports have evaluated the impact of CXCL12 on the leukemic clone, there is no information about the role of this chemokine in T cell physiology.

Our results here show CXCL12 induces the migration of T cells from CLL patients, although in a lesser extent than T cells from healthy donors. The low migratory response of T cells from CLL patients was correlated with an actin polymerization defect in response to CXCL12. Moreover, we found that T cells from CLL patients with good prognosis have a lower migratory response to CXCL12 than T cells from CLL patient with worst prognosis, due to signals delivered by leukemic cells. We also found that CXCL12 costimulates the activation and proliferation of activated CD4<sup>+</sup> T cell from CLL patient, and that activated T cells in the presence of CXCL12 enhance the activation and proliferation of the leukemic clone. Finally we demonstrated that autologous NLC establish a close contact with CD4<sup>+</sup> T cells and increase their activation and proliferation partially through a CXCR4-dependent mechanism.

In conclusion, our results suggest that CXCL12 production by lymphoid tissue microenvironment in CLL patients might play a key dual role on T cell physiology, functioning not only as a chemoattractant but also as a costimulatory factor for activated T cells, which finally improves CLL cell

proliferation. Since T cells in lymphoid organs may help CLL cells to survive and proliferate, the low migratory response to CXCL12 in T cells from CLL patients with good prognosis might favor the indolent clinical course of the disease in these patients.

Key words: B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA; CXCL12; CXCR4; NURSE LIKE CELLS; TUMOR MICROENVIRONMENT.

# INTRODUCCIÓN

---

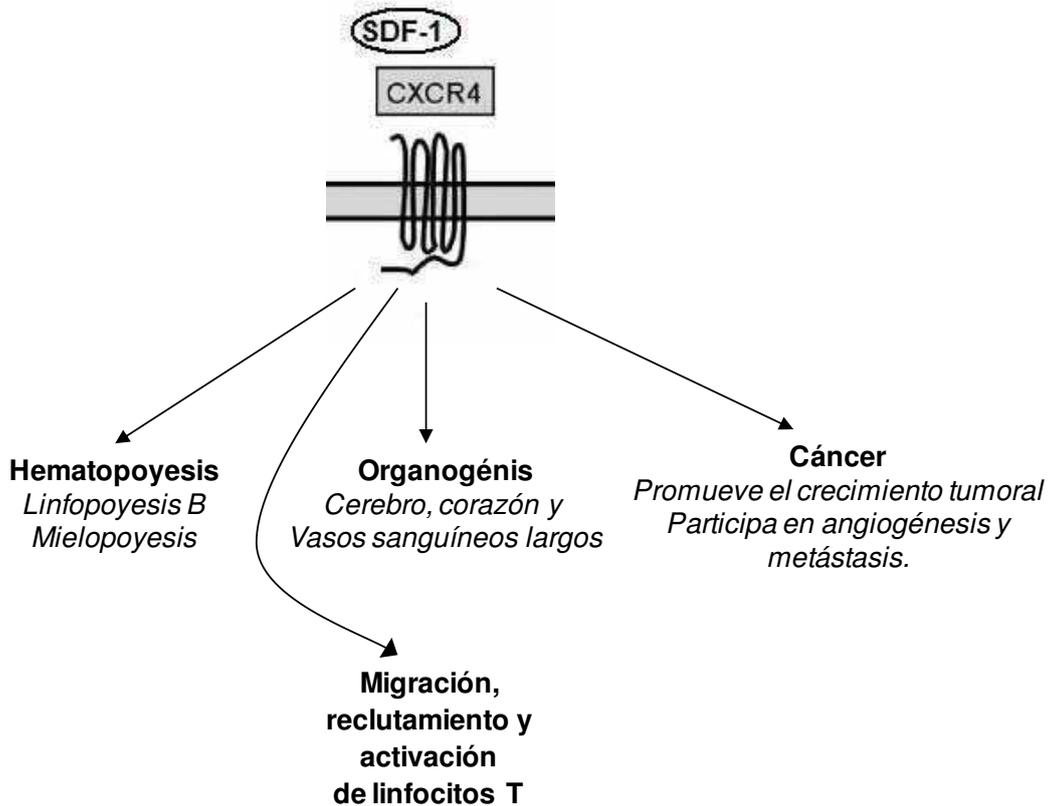
## INTRODUCCIÓN

### 1. La quimiocina CXCL12 y su principal receptor, el CXCR4.

#### a. CXCL12

La quimiocina CXCL12, también denominada *Stromal cell Derived Factor 1* (SDF-1), es una quimiocina perteneciente a la familia CXC constitutivamente producida por las células estromales de numerosos tejidos, entre los que se encuentran la médula ósea <sup>1,2</sup> y los nódulos linfáticos <sup>3</sup>. El gen de CXCL12, a diferencia de lo que ocurre para el resto de las quimiocinas de la familia CXC, se encuentra codificado en el cromosoma 10 y su *splicing* alternativo genera dos variantes, denominadas SDF-1 $\alpha$  y SDF-1 $\beta$ , idénticas entre sí, salvo por cuatro aminoácidos adicionales que posee el SDF-1 $\beta$  en su porción carboxiterminal. Ambas variantes de CXCL12 poseen similares funciones y patrones de expresión <sup>1</sup> y se asocian con su receptor, el CXCR4, con una afinidad comparable.

CXCL12 es la quimiocina que posee el mayor grado de homología entre seres humanos y ratones <sup>1,4</sup> y fue originalmente identificada como un factor de estimulación del crecimiento de células pre-B <sup>5</sup>. Hoy es sabido que CXCL12 es una quimiocina pleiotrópica involucrada en numerosos procesos, algunos de los cuales se encuentran enumerados en la **Figura 1**.



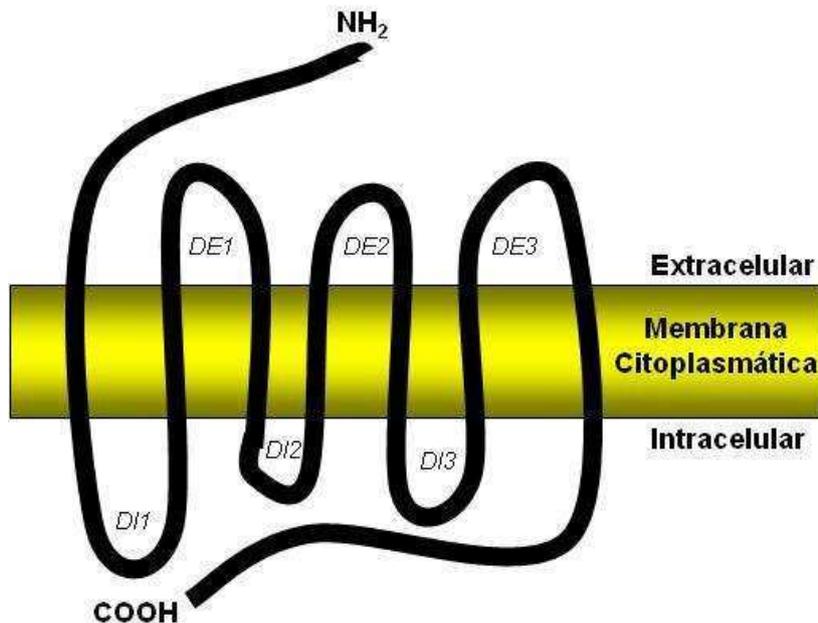
**Figura 1.** El CXCL12 es una quimiocina pleiotrópica. En la figura se enumeran algunos procesos en los que participa el CXCL12 y su receptor el CXCR4.

### **b. CXCR4, el principal receptor para el CXCL12**

El CXCR4 fue clonado a principio de los años '90 por tres grupos independientes como un posible receptor de quimiocinas al que no se le conocía su ligando <sup>6-8</sup>. Este receptor, al que originalmente denominaron *LESTR* o *fusin* se encontraba expresado en la mayoría de los leucocitos, incluyendo linfocitos T, B y monocitos y en muy bajos niveles en las células NK <sup>9</sup>. En el año 1996, el receptor *LESTR/fusin* fue identificado como el co-factor esencial para que ciertos tipos de virus de inmunodeficiencia humana logren ingresar a las células que expresan la molécula CD4 <sup>10,11</sup> y sólo cuando se reconoció a CXCL12 como el ligando natural de *LESTR/fusin*, la molécula fue re-clasificada como el receptor de quimiocinas CXCR4 <sup>12</sup>. Este receptor pertenece a la superfamilia de los receptores asociados a proteína G y, al igual que el resto de los receptores de quimiocinas, se

## INTRODUCCIÓN

encuentra constituido por un único polipéptido que atraviesa siete veces la membrana (**Figura 2**) acoplado a una proteína G inhibitoria (Gi). Tal como mencionamos anteriormente, su expresión es muy amplia y se lo puede encontrar en múltiples tejidos y tipos celulares incluyendo, diversos tipos de leucocitos, precursores hematopoyéticos, células epiteliales y endoteliales <sup>9</sup>.

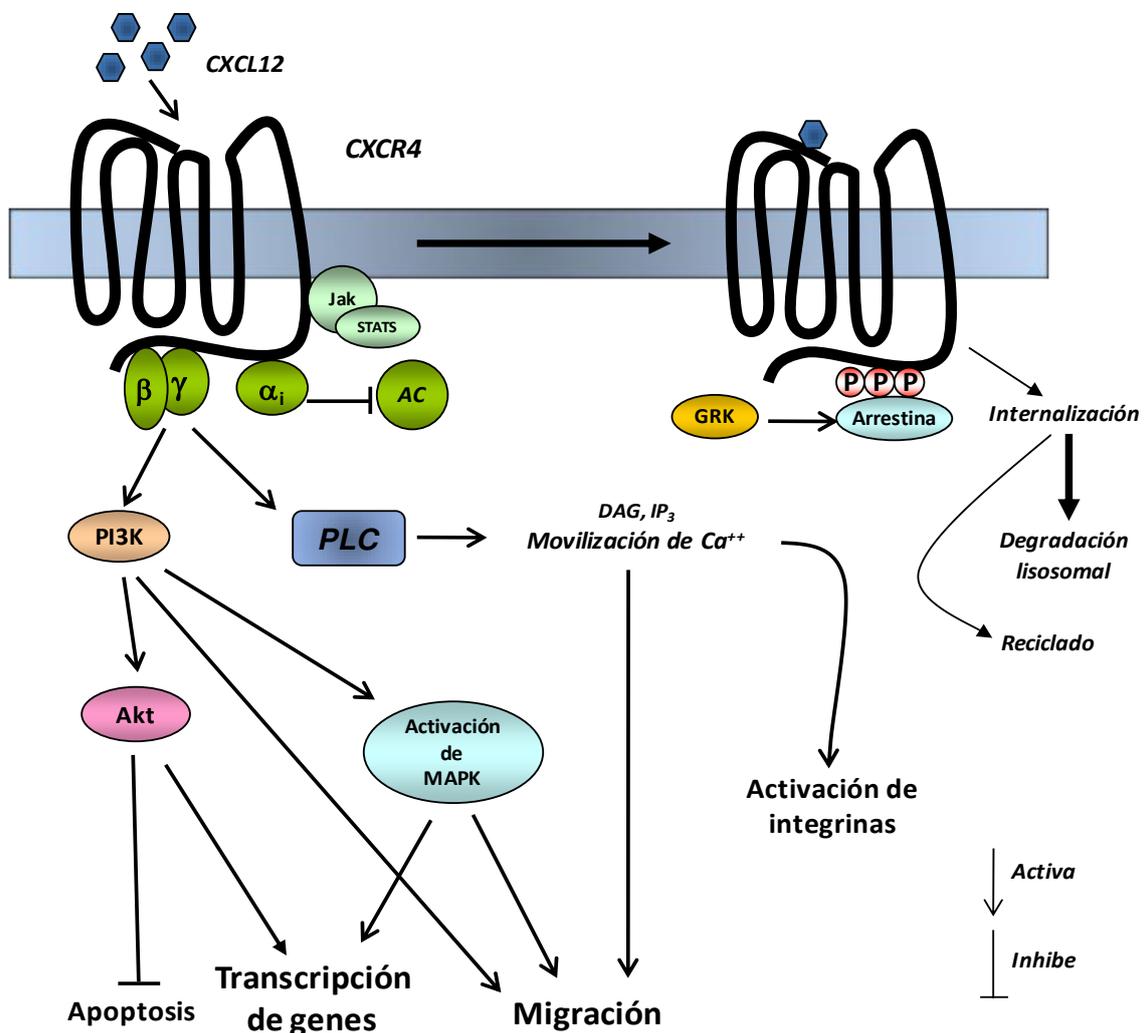


**Figura 2. Representación esquemática de CXCR4.** El receptor para CXCL12, el CXCR4, es una proteína de membrana de siete pasos transmembrana, con tres dominios (loops) intracelulares (DI1, 2 y 3), y tres dominios extracelulares (DE1, 2 y 3). El extremo carboxilo terminal de la proteína se encuentra hacia el lado citoplasmático y el extremo amino terminal hacia el lado extracelular.

La asociación entre CXCL12 y el CXCR4 ocurriría en dos etapas. La interacción inicial entre ambos permitiría un cambio conformacional en el receptor y favorecería la unión de la quimiocina a residuos claves presentes en el segundo y tercer dominio extracelular del CXCR4 <sup>13</sup>. *In vivo* el CXCL12 se encuentra mayoritariamente inmovilizado a la matriz extracelular y a la superficie celular generando gradientes de concentración sobre sustratos sólidos <sup>14</sup>. Esto produce un incremento en la concentración local de CXCL12 favoreciendo su oligomerización y en última instancia la oligomerización del

## INTRODUCCIÓN

CXCR4, hecho que incrementa su funcionalidad <sup>15</sup>. Una vez producida la asociación entre CXCL12 y CXCR4, el receptor es reclutado hacia unos dominios lipídicos particulares denominados “balsas lipídicas” (*lipid rafts*), donde se pone en marcha la transducción de la señal. La mayoría de las cascadas transduccionales que son inducidas luego de la interacción del CXCR4 con CXCL12 son dependientes de la activación de la proteína Gi (**Figura 3**), sin embargo han sido reportadas algunas vías transduccionales independientes de esta proteína <sup>13</sup>.



**Figura 3. Principales vías transduccionales activadas por el receptor CXCR4.** El receptor CXCR4, al igual que el resto de los receptores de quimiocinas, es una proteína de 7 pasos transmembrana acoplada a una proteína G inhibitoria (Gi). La unión del CXCL12 lleva a la activación de múltiples vías transduccionales, tanto Gi dependientes como Gi independientes. La proteína Gi inhibe a la adenilato ciclasa (AC), activa la vía de las MAPKs, induce la movilización de calcio a través de la activación de la fosfolipasa

## INTRODUCCIÓN

---

*C (PLC) y la activación de la vía PI3K/Akt. La vía PI3K/Akt regula la supervivencia y proliferación celular a través de la activación de factores de transcripción y la modulación directa de proteínas pro o anti apoptóticas. Tanto la PLC como la PI3K convergen en la activación de proteínas involucradas en la reorganización del citoesqueleto y la migración celular. La activación de la vía MAPKs regula la activación transcripcional así como también se demostró su participación en la migración. En relación a la activación de las vías independientes de la proteína Gi, ha sido reportado que el CXCR4 al unirse con su ligando, induce la activación de la proteína quinasa JAK3. La desensibilización y endocitosis del receptor luego de la interacción con su ligando estaría a cargo de las quinasas de proteínas G (GRK), las cuales fosforilan al receptor promoviendo la unión de otras proteínas, las Arrestinas, que llevan en última instancia a la endocitosis del receptor, degradación o reciclado a membrana. Para el CXCR4 se vio que la vía GRK/Arrestina además de inducir la endocitosis del receptor participa en la activación de las MAPKs.*

Los datos obtenidos con ratones genéticamente deficientes para CXCR4 (CXCR4<sup>-/-</sup>) demuestran que este receptor juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario. En este sentido, los ratones CXCR4<sup>-/-</sup> no son viables y mueren en el útero o al momento del nacimiento presentando numerosos defectos en la linfopoyesis, mielopoyesis y en el desarrollo cardíaco y del sistema nervioso central <sup>16,17</sup>. Llamativamente los ratones deficientes para CXCL12 (SDF-1<sup>-/-</sup>) poseen un fenotipo similar a los ratones CXCR4<sup>-/-</sup>, hecho que evidencia la relación específica y única existente entre ellos <sup>17</sup>. Obviamente no se conocen casos de deficiencia genética similar en seres humanos ya que no serían viables. Sin embargo, ha sido descrita una mutación heterocigota del CXCR4 en pacientes que padecen una inmunodeficiencia combinada denominada síndrome de WHIM que genera un receptor con la porción C-terminal truncada y una incrementada capacidad para transducir señales <sup>18</sup>. Este extraño síndrome se caracteriza por la presencia de verrugas (Wharts), Hipogamaglobulinemia, Infecciones recurrentes y Mielocatexis (un tipo de neutropenia congénita) y es, hasta el momento, la única patología inmunológica asociada a la mutación de un receptor de quimiocinas <sup>18</sup>.

Si bien no hay dudas acerca del papel fundamental que juega el CXCR4 en la transducción de señales en respuesta al CXCL12, recientemente se describió que el receptor huérfano RDC1 lograba unir con alta afinidad al CXCL12 y a otras quimiocinas, a partir de lo cual comenzó a llamárselo receptor de quimiocinas CXCR7<sup>19</sup>. El CXCR7 no es un clásico receptor de quimiocinas y hasta el presente existen controversias en relación a las consecuencias que acarrea para las células reconocer al CXCL12 a través del mismo. Mientras que algunos autores reportaron que el CXCR7 podría modular negativamente la migración inducida a través del CXCR4 secuestrando a su ligando<sup>20</sup>, otros proponen una función colaborativa entre el CXCR4 y el CXCR7<sup>21</sup>.

### c. Papel del CXCR4 en la fisiología de los linfocitos T

En el individuo adulto CXCL12 ha demostrado ser una quimiocina muy eficiente para inducir la migración de numerosos leucocitos, entre los que se encuentran los monocitos<sup>1</sup>, linfocitos B<sup>3,22</sup> y linfocitos T, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, vírgenes y de memoria<sup>1,22,23</sup>.

Como parte del normal tráfico leucocitario, los linfocitos T vírgenes regularmente abandonan el torrente sanguíneo e ingresan a los nódulos linfáticos (y a la mayoría del resto de los órganos linfáticos secundarios) atravesando vénulas de endotelios altos (HEV). El pasaje de los linfocitos T a través de las HEV ocurre en distintas etapas secuenciales bien caracterizadas y controladas tanto por la expresión de moléculas de adhesión y sus ligandos como por la presencia de quimiocinas y sus receptores<sup>24,25</sup>. En este sentido, las quimiocinas CXCL12, CCL19 y CCL21 presentes en la cara luminal de los HEV, participan en el proceso de transmigración de los linfocitos T vírgenes a través de los mismos. El receptor para las quimiocinas CCL19 y CCL21, el CCR7, se encuentra expresado tanto en linfocitos T vírgenes como de memoria<sup>25,26</sup> y los ratones genéticamente deficientes para el mismo<sup>27</sup> o deficientes en la producción de sus ligandos (ratones *plt*, por *paucity of lymph node T cells*)<sup>28</sup>

## INTRODUCCIÓN

---

presentan un menor número de linfocitos T vírgenes en los nódulos linfáticos en comparación a los ratones controles. Llamativamente, al realizar la transferencia adoptiva de linfocitos T CXCR4<sup>-/-</sup> en ratones *plt* se observa una ausencia total de células T en los ganglios<sup>29</sup>. Considerando que además ha sido formalmente probado que CXCL12 induce la transmigración de los linfocitos T a través de las HEV<sup>30</sup>, no hay duda de que el CXCL12 co-dirige junto con las quimiocinas CCL19 y CCL21 la migración de estas células hacia los nódulos linfáticos<sup>25,29</sup>.

Además de su efecto quimiotáctico sobre los linfocitos T, se ha demostrado que el CXCL12 actúa como un factor de supervivencia inhibiendo la apoptosis espontánea e inducida de los linfocitos T *in vitro*<sup>31</sup>. Asimismo se demostró que el CXCL12 funciona como un factor coestimulador en la activación T a través de su receptor antigénico (TCR/CD3). En este sentido el CXCL12 promueve un mayor aumento de los marcadores de activación CD69 y CD25, así como una mayor proliferación y producción de citoquinas por los linfocitos T normales al ser activados a través del TCR/CD3<sup>31,32</sup>. Estos fenómenos coestimuladores serían llevados a cabo gracias a que en los linfocitos T existiría una asociación física entre el CXCR4 y TCR/CD3 (una vez reconocido el CXCL12) que le permitiría al CXCR4 emplear parte de la maquinaria de transducción del TCR/CD3 y regular las señales gatilladas a través del mismo<sup>33</sup>.

### **2. Leucemia linfocítica crónica de células B**

La leucemia linfocítica crónica de células B (LLC) es la leucemia de mayor frecuencia en el Hemisferio Occidental; comprende alrededor del 25% de las leucemias que se diagnostican. 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. Existen evidencias que indican una susceptibilidad genética a la enfermedad. De hecho, es una patología muy rara en países orientales y en los inmigrantes japoneses y chinos que se instalan en los Estados Unidos. Por otro lado, se han reportado familias en las cuales la LLC aparece en sucesivas generaciones, cada vez a edades más tempranas.

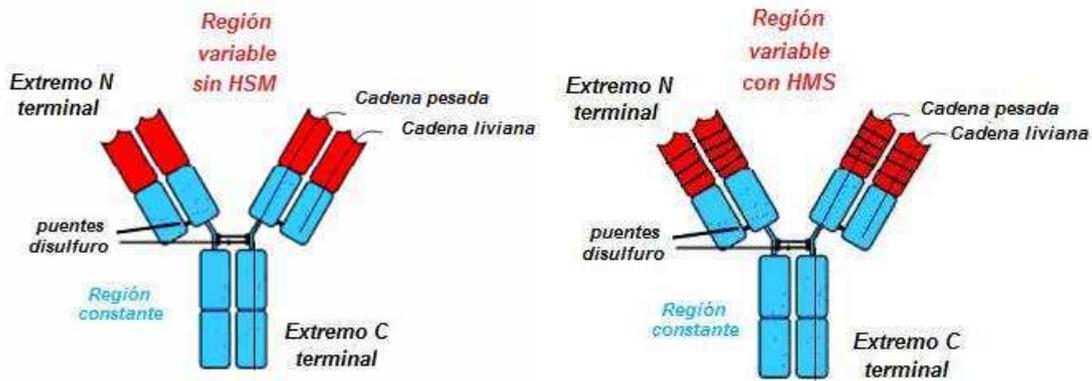
Una de las características más peculiares de la LLC es su asociación con fenómenos de naturaleza autoinmune, en particular, con la producción de autoanticuerpos dirigida contra antígenos de células hematopoyéticas<sup>34-36</sup>. La producción de autoanticuerpos es la responsable de la inducción de anemia hemolítica autoinmune en un porcentaje importante de los pacientes, y en menor medida, púrpura trombocitopénica y neutropenia<sup>36,37</sup>. Por otra parte, y en cierta forma paradójicamente a la producción de autoanticuerpos, los pacientes con LLC presentan hipogamaglobulinemia a medida que progresa la enfermedad, lo que provoca infecciones bacterianas recurrentes<sup>38-40</sup>. En este sentido, una de las mayores complicaciones que padecen los pacientes con LLC son las infecciones, las cuales constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de los pacientes. La literatura indica que alrededor del ochenta por ciento de los pacientes sufrirán infecciones durante algún momento de su enfermedad y más del cincuenta por ciento de los pacientes morirá a causa de las mismas<sup>40</sup>. La patogénesis de las infecciones de estos pacientes es compleja y multifactorial, habiendo una susceptibilidad aumentada debido a que la enfermedad en sí genera un cuadro de inmunosupresión en el paciente,

el cual se incrementa luego del tratamiento anti-neoplásico. No hay dudas acerca de los múltiples defectos del sistema inmune de los pacientes. A pesar de que durante mucho tiempo se pensó que los defectos de la respuesta inmune humoral eran la principal causa de la inmunosupresión, hoy es sabido que los defectos de la respuesta inmune celular T, así como las disfunciones de los neutrófilos y del sistema de complemento, contribuyen significativamente a incrementar la susceptibilidad de los pacientes de contraer todo tipo de infecciones<sup>40</sup>.

### a. Características fenotípicas de las células LLC

Las células LLC se caracterizan por la expresión de antígenos pan-B como CD19, CD20 y CD40, junto con otros antígenos que no se encuentran en la mayoría de los linfocitos B circulantes como CD5 y CD23<sup>41-43</sup>. Como todo linfocito B maduro, las células LLC expresan inmunoglobulinas (Igs) en la membrana, las cuales forman parte del receptor para el antígeno (BCR). Tal como puede observarse en la **Figura 4**, la Ig está constituida por dos cadenas pesadas (H) idénticas entre sí, asociadas por puentes disulfuro y dos cadenas livianas (L) idénticas entre sí, asociadas a las cadenas H por puentes disulfuro. La porción amino terminal (N terminal) de ambas cadenas conforma la región variable de la Ig (VH) responsable del reconocimiento antigénico, mientras que la porción carboxi terminal (C terminal) conforma la región constante de la Ig (CH). Las distintas zonas constantes de la cadena H dan lugar a los diferentes tipos o clases de anticuerpos conocidos (IgM, IgG, IgA, IgE e IgD) y juegan un papel fundamental en las funciones efectoras de los anticuerpos. Las células LLC expresan niveles muy bajos de Ig en la superficie que, generalmente, es de tipo M, habiendo en algunos casos co-expresión de IgM/IgD<sup>41,43,44</sup>.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 4. Estructura de las inmunoglobulinas.** Cada molécula de Ig está compuesta por dos cadenas pesadas idénticas (PM: 50 kDa) y dos cadenas livianas idénticas (PM: 25 kDa) unidas por puentes disulfuro. Cada cadena liviana está compuesta por dos dominios tipo inmunoglobulina mientras que cada cadena pesada contiene entre 4 y 5 dominios de Ig dependiendo del isotipo. Los dominios N terminales de las cadenas pesadas y livianas constituyen la región variable de la Ig (rojo), mientras que el resto de los dominios de las cadenas pesadas y livianas constituyen la región constante de la Ig. A la izquierda se muestra una Ig sin hipermutación somática (HMS), y a la derecha se muestra una Ig cuyos genes sufrieron HMS.

La secuencia de aminoácidos de las porciones variables de las cadenas H y L es característica de cada linfocito B maduro, existiendo millones de moléculas distintas de Igs en un mismo individuo. Esta enorme diversidad de Igs se genera a través de dos procesos moleculares diferentes que tienen lugar en distintas etapas de la vida del linfocito B. El primer proceso denominado recombinación génica ocurre en la médula ósea durante la maduración de los linfocitos B a partir de precursores linfopoyéticos y es previo al contacto con el antígeno. El segundo proceso responsable de aumentar la diversidad de Igs se conoce como hipermutación somática y tiene lugar en los tejidos linfáticos secundarios (nódulos linfáticos, bazo, placas de Peyer) durante la formación del centro germinal como respuesta al contacto con el antígeno. La hipermutación somática consiste en la acumulación de cambios puntuales de bases (mutaciones) en los genes que codifican para las regiones variables de las cadenas L y H. Tal como veremos más adelante, alrededor del 50% de los

pacientes con LLC poseen mutaciones a consecuencia del proceso de hipermutación somática en la Ig del clon leucémico <sup>45</sup>.

### **b. Clasificación de los pacientes con LLC**

La LLC es una entidad clínica que presenta una notable heterogeneidad. La expectativa de vida de los pacientes con LLC 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 <sup>41,43,44,46-49</sup>. Existen, sin embargo, ciertas características comunes que pueden ser utilizadas para separar a los pacientes con LLC en estadios clínicos determinados. Los dos sistemas de clasificación más difundidos a nivel internacional son los descritos por Rai <sup>50</sup> y Binet <sup>51</sup> (**Tabla 1**). En el primero, los pacientes se segregan en tres grupos de riesgo: bajo (estadio 0), intermedio (estadios I y II) y alto (estadios III y IV). De manera análoga, la clasificación Binet agrupa a los enfermos en estadios A, B y C, con aumento progresivo en la gravedad de la patología. Ambos sistemas toman en cuenta las siguientes características clínicas: presencia de linfocitos en sangre y médula ósea, linfadenopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia y/o trombocitopenia. Aún cuando estos sistemas son relevantes desde el punto de vista clínico, existen ciertos subgrupos de pacientes que difícilmente puedan ser encuadrados dentro de un estadio particular. De allí la importancia que tiene la identificación de marcadores biológicos e inmunológicos con valor predictivo que posibiliten un mejor tratamiento terapéutico.

Ha sido claramente demostrado que la heterogeneidad de la LLC a nivel clínico se correlaciona con heterogeneidad a nivel de la célula leucémica. En el año 1994, el Dr. Guillermo Dighiero del Instituto Pasteur en París publicó un trabajo en el cual demostraba que en LLC los genes que codifican para la porción IgVH presentan mutaciones en alrededor del 50% de los pacientes <sup>45</sup>. Sobre la base de estas observaciones, confirmadas posteriormente por otros

## INTRODUCCIÓN

autores, se puede clasificar a los pacientes con LLC en dos grupos de acuerdo al estatus mutacional de la Ig: aquellos que poseen IgVH no mutadas y aquellos que poseen IgVH mutadas.

Clasificación	Características	Sobrevida
<b>Rai</b>		
<i>Estadío 0</i>	Linfocitosis en sangre y MO únicamente	12 años
<i>Estadío I</i>	Linfocitosis y linfadenopatía	
<i>Estadío II</i>	Linfocitosis y esplenomegalia o hepatomegalia	7 años
<i>Estadío III</i>	Linfocitosis y anemia (Hb <110 g/L)	
<i>Estadío IV</i>	Linfocitosis y trombocitopenia (plaquetas <100.10 <sup>9</sup> /L)	<1 año
<b>Binet</b>		
<i>Estadío A</i>	Menos de 3 sitios infiltrados <sup>1</sup> , Hb >100 g/L, plaquetas >100.10 <sup>9</sup> /L	9 años
<i>Estadío B</i>	3 o más sitios infiltrados, Hb >100 g/L, plaquetas >100.10 <sup>9</sup> /L	5 años
<i>Estadío V</i>	Hb <100 g/L o plaquetas <100.10 <sup>9</sup> /L	2 años

**Tabla 1. Sistemas Rai y Binet de clasificación para los estadios de Leucemia Linfocítica Crónica (LLC).** Rai y Binet son los sistemas de clasificación basados en síntomas clínicos más difundidos. Hb: Hemoglobina, MO: médula ósea. <sup>1</sup>sitios infiltrados pueden ser: hígado, bazo y ganglios linfáticos inguinales, axilares y cervicales.

Tal como mencionamos anteriormente, durante la hipermutación somática y como consecuencia del reconocimiento del antígeno específico, los linfocitos B aumentan la afinidad de su receptor antigénico gracias a mutaciones puntuales que se producen en los genes que codifican para las porciones variables (VH y VL) de las inmunoglobulinas. Es por esto que la caracterización del estatus mutacional de la Ig de superficie de las células LLC permitió hipotetizar acerca del momento dentro del desarrollo ontogénico en el cual se produjo la malignización de la célula. Un análisis simplificado de la situación sugeriría que en el grupo de los pacientes con IgVH no mutados, la malignización de la célula leucémica se produjo previo al contacto con el antígeno, mientras que en el grupo de pacientes con IgVH mutados, la malignización fue posterior al contacto antigénico. Sin embargo la realidad de la célula leucémica es mucho más compleja. Al analizar con mayor detenimiento las características de las células LLC se observa que todas ellas, independientemente de la presencia o no de mutaciones en las regiones IgVH, presentan un fenotipo de linfocito B que ha sido activado por el antígeno <sup>52</sup>.

## INTRODUCCIÓN

---

Esto sugiere que, una vez producido el encuentro con el antígeno, dependiendo de las características de esa activación antigénica, en algunos casos se favorece el proceso de hipermutación somática, mientras que en otros no. No está claro aún, cuál o cuáles son los antígenos involucrados en el proceso de malignización del clon leucémico. Sin embargo, hallazgos publicados en el 2004, demuestran que la porción de las cadenas de la Ig clonal que interaccionan con el determinante antigénico es sorprendentemente similar entre distintos pacientes LLC (alrededor del 20% de los pacientes con IgVH no mutado), lo que sugiere que estas células han sido seleccionadas por un mismo antígeno o por un conjunto limitado de determinantes antigénicos, antes o durante el proceso de malignización <sup>53-56</sup>.

Resultados publicados en 1999 demostraron que el estatus mutacional de los pacientes con LLC posee un importante valor predictivo ya que los pacientes pertenecientes al grupo mutado o no mutado tienen una expectativa de vida significativamente diferente <sup>57</sup>. Así, la falta de mutaciones en los genes VH de la Ig del clon leucémico se asocia con una enfermedad más agresiva que conduce a la muerte del 50% de los pacientes 6 a 8 años después del diagnóstico, aún bajo tratamiento quimioterápico; mientras que los enfermos con IgVH mutadas presentan una enfermedad estable con una media de sobrevida superior a los 20 años.

Por análisis de genes mediante la técnica de *microarray*, se encontró que las células leucémicas con IgVH mutados o no mutados difieren también en la expresión de la proteína quinasa ZAP-70 (*ξ-associated protein*), estando ésta presente en el grupo no mutado <sup>58,59</sup>. ZAP-70 es una proteína quinasa normalmente presente en linfocitos T y células NK, que participa en la transducción de señales a través de receptores de activación, como el receptor antigénico de linfocitos T (TCR). En pocos meses se desarrolló una técnica para evaluar la expresión de ZAP-70 por citometría de flujo, lo que ha significado un

## INTRODUCCIÓN

---

avance considerable para la identificación de pacientes con mayor o menor riesgo, ya que se trata de una metodología mucho más sencilla que la secuenciación de la IgVH para determinar mutaciones<sup>60,61</sup> y es capaz de predecir el estatus mutacional de los pacientes en un 93% de los casos<sup>58</sup>. En nuestro laboratorio se ha puesto a punto esta técnica durante 2004, siendo el primer laboratorio en el país en ofrecerla como servicio al conjunto de los médicos hematólogos que tratan pacientes LLC. Dos estudios retrospectivos publicados durante 2004 han demostrado que ZAP-70 tiene un valor pronóstico igual o mayor aún que el estatus mutacional de la IgVH<sup>60,62</sup>.

Por otro lado, numerosos trabajos han demostrado que la expresión de CD38 en las células LLC es un factor pronóstico independiente de las mutaciones cuya presencia correlaciona con una enfermedad agresiva<sup>63-69</sup>. La molécula CD38 es una ectoenzima que sintetiza componentes claves para la regulación de los niveles intracitoplasmáticos de calcio<sup>70</sup> y su entrecruzamiento luego de interactuar con su ligando natural, el CD31,<sup>71</sup> o con anticuerpos específicos induce la transducción de señales y la activación celular en linfocitos T<sup>72</sup>, células NK<sup>73</sup>, linfocitos B normales<sup>74</sup> y las propias células LLC<sup>75</sup>.

Si bien continúa discutiéndose cuál de los dos marcadores es el que mejor predice la progresión de la enfermedad, estudios recientes demuestran que la determinación simultánea de ZAP-70 y CD38 posee mayor valor pronóstico que la determinación de una sola de estas moléculas. En este sentido, los pacientes que expresan alguno de los dos marcadores en sus células leucémicas (ZAP70<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> o ZAP70<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>), y más aún aquellos que son positivos para ambos (ZAP-70<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) poseen mayor linfocitosis en sangre periférica e infiltración medular y requieren tratamiento quimioterápico mucho antes que los pacientes dobles negativos (ZAP-70<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>)<sup>76-79</sup>. Es por ello que actualmente se recomienda determinar la presencia de ambos marcadores para poder predecir en forma más acertada el pronóstico de la enfermedad<sup>76-79</sup>. Cabe

mencionar, sin embargo, que ciertos pacientes que presentan anomalías genómicas como deleciones cromosómicas en la región 11q22-23 o mutaciones en p53, desarrollan una enfermedad agresiva aún cuando presenten mutaciones en la IgVH o sean ZAP-70 y CD38 negativos<sup>80,81</sup>.

¿ZAP-70 y CD38 son solamente marcadores de mal pronóstico? La respuesta a este interrogante es un rotundo no. Por lo anteriormente expuesto, no cabe duda sobre la importancia de estos marcadores para predecir el curso que tomará la enfermedad en cada paciente LLC, pero debemos mencionar que tanto ZAP-70 como CD38, son mucho más que simples marcadores de progresión y juegan un papel muy importante en la fisiopatología de la célula leucémica. En el año 2002 el grupo del Dr. Thomas Kipps reportó que las células LLC ZAP-70<sup>+</sup> presentan una mayor capacidad para transducir señales de activación a través del BCR cuando se las compara con las células leucémicas negativas para dicho marcador<sup>82</sup>. En los linfocitos B normales y en aquellos pacientes LLC ZAP-70<sup>-</sup> la tirosina quinasa Syk es uno de los primeros eslabones de la cascada transduccional a través del receptor antigénico. Por su parte, en los pacientes LLC positivos para ZAP-70, esta tirosina quinasa participa activamente junto con Syk, en la señalización a través del BCR<sup>83</sup> incrementando la transducción de la señal. Del mismo modo, otros autores han reportado que las células LLC positivas para CD38 poseen una incrementada capacidad de transducir señales a través del BCR<sup>84</sup>. Para las células leucémicas, poseer una mayor o menor capacidad para transducir señales a través del receptor antigénico no es punto trivial ya que se ha propuesto que el BCR jugaría un papel central en la patogénesis de la LLC y que una mayor transducción de señales a través del mismo contribuiría al desarrollo de una enfermedad más agresiva<sup>85,86</sup>. Tal como será comentado más adelante, las diferencias entre las células leucémicas de los pacientes positivos o negativos para ZAP-70 y CD38 no se encuentra solamente a nivel de la transducción de señales a través del

receptor antigénico, sino que también existirían diferencias en la capacidad de respuesta del clon leucémico a quimiocinas como el CXCL12, CCL19 y CCL21 <sup>87,88</sup>.

### c. La importancia del microambiente en la patogénesis de la LLC

El hecho de que más del 99% de los linfocitos B presentes en sangre periférica se encuentran en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular ha llevado a pensar que la acumulación del clon leucémico en la periferia se produce por defectos en el proceso apoptótico más que por una desregulación de la proliferación celular <sup>89,90</sup>. Asimismo, dado que las células LLC presentan una sobre-expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 <sup>91</sup> y tradicionalmente se las ha considerado como malas respondedoras a la estimulación con mitógenos *in vitro* <sup>92</sup>, se las ha caratulado como linfocitos inertes que poseen una mínima o nula capacidad proliferativa y fallas intrínsecas en el proceso de muerte celular programada.

Sin embargo, numerosas evidencias sugieren que el panorama es mucho más complejo. Las células leucémicas, independientemente del estatus mutacional de su inmunoglobulina, poseen marcadores de activación similares a los que presentan los linfocitos B activados por el antígeno, lo que sugiere que son células que ya han sido activadas a través del receptor antigénico <sup>52,93</sup>. Asimismo, la longitud de los telómeros es menor en las células leucémicas en comparación a los linfocitos B normales, indicando que el clon leucémico ha transitado por varios ciclos de proliferación <sup>94</sup>. Inclusive, las células leucémicas con IgVH no mutadas poseen telómeros mucho más cortos que las mutadas, lo que implica una mayor historia replicativa <sup>94</sup>.

Por otro lado, está ampliamente documentado que las células leucémicas mueren por apoptosis con relativa facilidad al ser cultivadas *in vitro*, lo que implica que no poseen fallas intrínsecas del programa apoptótico y sugiere la existencia de factores del microambiente *in vivo* capaces de incrementar la supervivencia y acumulación del clon leucémico <sup>43,95,96</sup>. Desde hace

años la identificación de éstos factores es un tema central de estudio y el listado de posibles candidatos involucrados crece continuamente.

Nuestro grupo reportó que la presencia de los leucocitos que acompañan a las células leucémicas en circulación es capaz de prolongar la sobrevivencia de las células LLC en cultivo <sup>97</sup>. En este sentido, en algunos pacientes, por ejemplo, se encontró que tan sólo un 3-5% de células no-leucémicas en el cultivo logró que las células LLC duplicaran o triplicaran su sobrevivencia. Asimismo, observamos que la activación de monocitos y células NK por entrecruzamiento de sus receptores para el fragmento Fc de la IgG inhibe no sólo la apoptosis espontánea de las células LLC, sino también la inducida por agentes quimioterápicos como la fludarabina, el clorambucilo y la dexametasona <sup>98</sup>.

Por otro lado, numerosas citoquinas han sido propuestas como factores capaces de favorecer la supervivencia de las células LLC *in vivo*. En este sentido, está ampliamente demostrado que el agregado de IL-4 a cultivos de LLC inhibe la apoptosis de las células leucémicas, tanto espontánea como inducida por distintos agentes <sup>99-101</sup> y algunos autores postulan que este efecto sería mediado a través de un incremento en los niveles de Bcl-2 <sup>101</sup>. Por otra parte, el IFN $\gamma$  también ha mostrado un claro efecto anti-apoptótico al ser agregado a cultivos de LLC <sup>99,102</sup> y este efecto parecería ser relevante *in vivo*, ya que se han encontrado mayores niveles de dicha citoquina en el suero de pacientes LLC en comparación con dadores normales <sup>99,102</sup>.

Las señales de sobrevivencia que reciben las células LLC *in vivo*, no serían solamente de naturaleza soluble. Por ejemplo, se ha reportado que la interacción de la molécula CD40 presente en la membrana de las células LLC con su ligando específico, el CD40L (CD154), favorece 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 <sup>100</sup>. Por otro lado la interacción de CD40 de las células LLC con el CD40L expresado en células

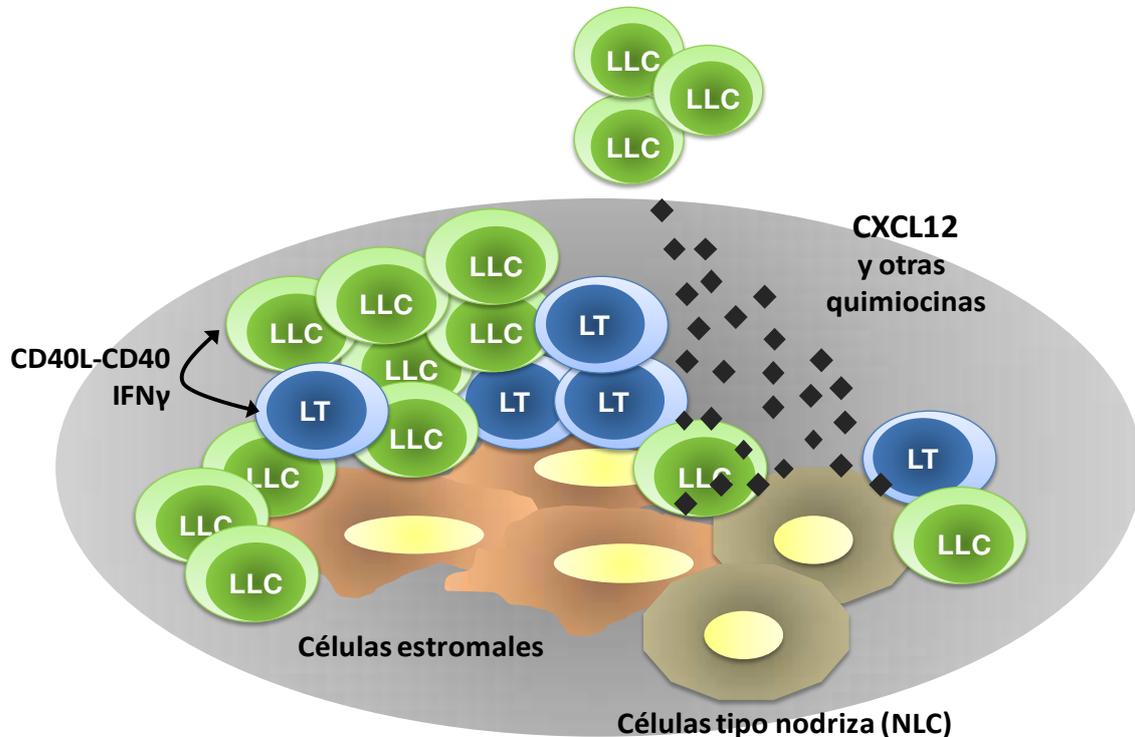
transfectadas inhibe la apoptosis de las células leucémicas incrementando la expresión de proteínas anti-apoptóticas<sup>103,104</sup>.

### **d. El papel del CXCL12 y los linfocitos T en la patogénesis y progresión de la LLC**

Tal como fue presentado en la sección anterior, la visión tradicional de la enfermedad posicionaba a la célula leucémica como un linfocito inerte, que rara vez se dividía y paulatinamente se acumulaba en la periferia debido a una muerte celular programada defectuosa. Este concepto ha sido dejado de lado no sólo por las evidencias que presentamos anteriormente, sino porque hoy en día está formalmente probado que las células leucémicas son capaces de proliferar *in vivo*. Utilizando un método de marcación no radioactivo, empleando agua pesada, fue posible determinar que entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{12}$  de células leucémicas nacen por día en cada paciente LLC estudiado, mientras que los valores de muerte se encuentra entre 0 y  $1 \times 10^{12}$  células leucémicas por día<sup>105</sup>. Esto pone en evidencia la existencia de un dinámico balance entre la proliferación y la muerte de las células del clon leucémico en cada paciente LLC; una delicada armonía que encuentra el equilibrio en aquellos pacientes que padecen una enfermedad estable. Por el contrario, en los pacientes progresores que incrementan rápidamente su linfocitosis, este balance perdería el equilibrio debido a una mayor tasa de proliferación y/o una menor tasa de muerte de las células LLC.

Pero, **¿dónde proliferan las células leucémicas?** Las células LLC circulantes, que como mencionamos anteriormente se encuentran en el estadio  $G_0$  del ciclo celular, se mantienen e incrementan gracias al aporte de nuevos linfocitos del clon leucémico que proliferan principalmente en los nódulos linfáticos, pero también en médula ósea y bazo dentro de estructuras histológicas que reciben el nombre de centros proliferantes o *pseudofolículos*<sup>96</sup>. Estos centros proliferantes no son otra cosa que acúmulos de células leucémicas

proliferantes en íntimo contacto con linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados (CD40L<sup>+</sup>), células estromales y un tipo de célula de estirpe mieloide tipo nodriza (*Nurse-like cells*, NLC) productoras principalmente de CXCL12 (Figura 5)<sup>96</sup>.



**Figura 5. Centros proliferantes en ganglios linfoides y médula ósea de pacientes con LLC.**

¿Quién dirige el tráfico de las células LLC hacia estos sitios? La migración de todo linfocito desde la sangre hacia otros órganos se produce en pasos secuenciales que requieren de la interacción de moléculas de adhesión con sus ligandos y de quimiocinas con sus respectivos receptores. Las quimiocinas CXCL12, CCL19 y CCL21 serían las responsables de la migración de las células LLC hacia los nódulos linfáticos<sup>87,106,107</sup> estando sus receptores, el CXCR4 y el CCR7 respectivamente, expresados en mayores niveles en las células leucémicas en comparación a los linfocitos B normales<sup>87,108</sup>.

Llamativamente, las células del clon leucémico participan activamente en la generación y manutención de los centros proliferantes ya que, una vez allí,

tienen la capacidad de atraer a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD40L<sup>+</sup> <sup>109</sup>. Asimismo, la interacción CD40-CD40L no sólo favorece la sobrevida de la célula LLC sino que incrementa la producción de las quimiocinas que atraen a más linfocitos TCD4<sup>+</sup> activados <sup>87,109</sup>. De esta manera, las propias células LLC favorecen la generación de un microambiente anti-apoptótico y activador que se retroalimenta continuamente permitiendo la progresión de la enfermedad.

Por otro lado existen trabajos que correlacionan una mayor respuesta a las quimiocinas CXCL12, CCL19 y CCL21 de células leucémicas provenientes de pacientes LLC positivos para marcadores de mal pronóstico, como ZAP-70 y CD38, en comparación con pacientes negativos para estos marcadores. En un trabajo publicado en la revista Blood, demuestran que la migración de las células LLC de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> en respuesta a las quimiocinas CCL19 y CCL21 es mayor en comparación a las células LLC de pacientes ZAP-70<sup>-</sup> debido a una incrementada expresión de su receptor, el CCR7, en el primer grupo de pacientes. También observan una mayor transducción de señales en respuesta al CXCL12 de las células leucémicas de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> en comparación con los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> <sup>87</sup>. En otro trabajo de la misma revista se observó que la migración en respuesta al CXCL12 es significativamente mayor por parte de las células LLC de pacientes ZAP-70<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> en comparación con aquellos negativos para alguno de los marcadores <sup>88</sup>. En conclusión, las células leucémicas de los pacientes positivos para alguno de los marcadores de mal pronóstico ZAP-70 y CD38 podrían acceder más fácilmente a los centros proliferantes, donde recibirían las señales de sobrevida por parte de los linfocitos T, NLC y células estromales, hecho que estaría involucrado en la progresión de la enfermedad característica de este grupo de pacientes.

**¿Cuáles son las señales de sobrevida y proliferación que reciben las células LLC en los centros proliferantes?** Por un lado, se produce el entrecruzamiento de la molécula CD40 sobre la célula leucémica a consecuencia

## INTRODUCCIÓN

---

de su interacción con la molécula CD40L expresada por los linfocitos T activados. Tal como mencionamos anteriormente la interacción CD40-CD40L induce la proliferación del clon leucémico<sup>100</sup> e incrementa su sobrevida aumentando la expresión de proteínas anti-apoptóticas<sup>103,104</sup>. Por otro lado, las células LLC, que expresan altos niveles de CXCR4<sup>108</sup>, interactúan con el CXCL12 producido por las células estromales y NLC. Esta quimiocina es no solamente responsable de favorecer la migración de las células LLC hacia esos sitios sino que también incrementa la sobrevida del clon leucémico. En este sentido se ha descrito una subpoblación de leucocitos CD14<sup>+</sup> provenientes de células mononucleares de sangre periférica de pacientes LLC que se diferencia *in vitro* a NLC capaces de proteger a las células LLC de la apoptosis a través de la producción de CXCL12<sup>2,110</sup>. El CXCL12 posee entonces un rol dual sobre las células leucémicas de los pacientes LLC favoreciendo su reclutamiento a los órganos linfoides e incrementando su sobrevida.

En relación a los linfocitos T, numerosos estudios han demostrado diversas anomalías, tanto en la distribución como en el fenotipo y funcionalidad de los linfocitos T que acompañan a las células leucémicas en los pacientes LLC. Si bien el porcentaje de linfocitos T está disminuido como consecuencia de la expansión del clon leucémico, en muchos pacientes se observa un aumento en su número absoluto. Cabe destacar, asimismo, que en una gran proporción de los enfermos, existe una expansión oligoclonal tanto en las poblaciones T CD4<sup>+</sup> como en las CD8<sup>+</sup><sup>111,112</sup>. Se ha encontrado una alteración en la relación de las subpoblaciones T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en la sangre periférica de los pacientes, por un aumento de las células CD8<sup>+</sup> circulantes debido a una prevalencia de las CD4<sup>+</sup> en la médula ósea y en los ganglios comprometidos. Justamente en esos sitios, los linfocitos T de los pacientes LLC estarían participando en la formación de los centros proliferantes donde, tal como fue mencionado anteriormente, al interactuar con las células leucémicas favorecen la progresión de la enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

---

Por otro lado, se ha reportado que los mitógenos convencionales como PHA (*phytohaemagglutinin*) o PWM (*pokeweed mitogen*) inducen una menor activación y proliferación en los linfocitos T de pacientes LLC en comparación a los dadores normales. Asimismo, se ha reportado que los linfocitos T de pacientes con LLC tienden a producir un perfil de citoquinas TH2, con predominio de la citoquina anti-apoptótica IL-4<sup>113</sup>, otra evidencia que resalta el papel central que juegan los linfocitos T en los procesos que llevan a la acumulación del clon leucémico *in vivo*. Sorprendentemente, serían las propias células LLC las que modifican las características funcionales de los linfocitos T que las acompañan. En este sentido, se ha reportado que factores producidos por las células LLC inducen una diferente producción de citoquinas y fallas en la capacidad proliferativa y en la funcionalidad de los linfocitos T<sup>114,115</sup>. Por otro lado, Roth y colaboradores han reportado recientemente que los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup> difieren en el largo de sus telómeros<sup>116</sup>, los cuales se van reduciendo en la medida que las células proliferan. En este trabajo, los autores demuestran que la historia replicativa de las células T de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> es significativamente mayor a las de los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> debido a que el largo de los telómeros es menor en las células T del primer grupo de pacientes. Esto demuestra una mayor expansión de las células T en los pacientes de mal pronóstico y sugiere un posible rol de las mismas en la progresión de la enfermedad que caracteriza a esos pacientes. En este sentido, recientemente se ha comprobado el papel central que posee *in vivo* la activación y proliferación de los linfocitos T para la enfermedad en un elegante modelo de ratones donde se realiza una transferencia adoptiva de células mononucleares de pacientes LLC. En estos ratones, la proliferación y sobrevivencia del clon leucémico se observa si y solo si los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes (que acompañan al clon leucémico en las muestras de células mononucleares que se inoculan a los ratones) se activan por reconocer aloantígenos<sup>117</sup>. En su conjunto, los resultados presentados en ese trabajo

## *INTRODUCCIÓN*

---

demuestran el papel central que juegan los linfocitos T en la patogénesis y progresión de la LLC.

## OBJETIVOS

---

### OBJETIVOS DEL TRABAJO

Por lo expuesto anteriormente queda claro el papel central que poseen los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y la quimiocina CXCL12 en la LLC. A pesar de que los linfocitos T y el CXCL12 conviven en los centros proliferantes de los pacientes LLC, no habían sido estudiadas hasta el presente las consecuencias que trae a los linfocitos T contactar con dicha quimiocina. Por eso, el **objetivo general** de este proyecto fue estudiar el papel que poseen las señales del microambiente en la patogénesis de la LLC, centrándonos en el impacto de la quimiocina CXCL12 sobre los linfocitos T que acompaña al clon leucémico.

Como **objetivos particulares** nos propusimos:

- 1. Evaluar la capacidad migratoria de los linfocitos T de los pacientes con LLC en respuesta al CXCL12.*
- 2. Estudiar la capacidad del CXCL12 de aumentar la activación y proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LLC y su consecuencia sobre la activación y proliferación del clon leucémico.*
- 3. Determinar el efecto del co-cultivo con células mieloides del tipo nodriza (nurse like cells; NLC) sobre la activación y proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC autólogos.*

Nuestra hipótesis de trabajo supone que el CXCL12 producido por las NLC y/o células estromales dentro de los órganos linfáticos de los pacientes con LLC favorece el reclutamiento de linfocitos T y que, una vez allí, el CXCL12 actúa como un factor coestimulante para los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, aumentando su activación y proliferación y la consecuente expansión del clon leucémico y progresión de la enfermedad. Creemos que el estudio de factores y mecanismos que favorecen la proliferación del clon leucémico, contribuirá en un futuro al desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas que logren curar la LLC o al menos controlar el avance de la enfermedad.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reactivos generales y anticuerpos.

#### a. Tampón fosfato salino (PBS)

Solución preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,078M y KHPO<sub>4</sub> 0,015M; pH=7,4. Las marcaciones de células con anticuerpos para evaluación por citometría de flujo se realizaron con PBS con 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA) de Weiner Laboratorios (Santa Fé, Argentina)

#### b. Solución de Turk para el recuento de células.

La solución se preparó con violeta de genciana (100mg), ácido acético glacial (31,25ml) y agua destilada (c.s.p. 500ml). Para el recuento de células se realizaron diluciones de esta solución y se contó en cámara de Neubauer.

#### c. Medio de cultivo

Se utilizó medio RPMI 1640 de Life Technologies (Grand Island, NY, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% para el medio completo o 1% para las activaciones, y con 100 U/ml penicilina o 100 µg/ml estreptomicina, todos de GIBCO Laboratories (Grand Island, USA).

#### d. Solución de Ficoll-Triyosom

Para la purificación de células mononucleares de sangre periférica se utilizó una solución isotónica de Ficoll 400 de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA) y Triyosom 50 (aminotriazoato sódico 50%) de Justesa Imagen Argentina S.A (Bs.As. Argentina), densidad 1,077 g/l.

#### e. Anticuerpos, perlas magnéticas y quimiocinas

La quimiocina CXCL12/SDF-1 de PeproTech (DF, Mexico). Los siguientes anticuerpos fueron obtenidos de BD Bioscience, Pharmigen (CA, USA): anticuerpos monoclonales (mAbs) conjugados a Isotiocianato de Fluoreseina (FITC)-, Ficoeritrina (PE)- o Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP-

Cy<sup>™</sup>5.5)-específicos para CD3 (clon SK7), CD4 (clon RPA-T4 and clone SK3), CD8 (clon HIT8a), CD19 (clon SJ25C1), CXCR4 (clon 12G5), CXCR7 (8F11-M16), CCR7 (clon 4B12), CD38 (clon HB7), IFN $\gamma$  (clon 4S.B3), CD40L (clon TRAP1), ZAP-70 (clon 1E7.2), cadena liviana *kappa* de Ig (clon G20-193), cadena liviana *lambda* de Ig (clon JDC-12) y anticuerpos con especificidad irrelevante (controles de isotipo). mAc para CD56 (clon N901) conjugado a PE se obtuvo de Immunotech (Marseille, Francia) y el mAb específico para CD19 conjugado a FITC (clon HIB19) de BioLegend (San Diego, CA, USA). El Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) se obtuvo de Invitrogen Argentina Ltd (Bs. As. Argentina).

Para la purificación de linfocitos T se usaron mAc específicos para CD19 (clon HIB19), CD14 (clon M5E2) y CD56 (clon B159) de Immunotech y perlas magnéticas de Pierce (Rockford, IL, USA). El anticuerpo bloqueante para CXCR4 (clon 12G5) fue gentilmente donado por la Dr. Ana Ceballos del Centro Nacional de Referencia para SIDA, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (Argentina). Para la activación de linfocitos T y para la purificación de linfocitos B se usaron mAc específicos para CD3 humano (clon UCHT1) donado por la Dra. Claire Hivroz del Institut Curie (Paris, Francia). Para las marcaciones nucleares se usaron los colorantes TO-PRO<sup>®</sup>-3 de Invitrogen (Bs. As. Argentina) y Ioduro de propidio de Sigma Aldrich (Bs. As. Argentina). La Brefeldina A (BD GolgiPlug<sup>™</sup>) y la monensina (BD GolgiStop<sup>™</sup>) se compraron a BD Biosciences. El Dimetilsulfoxido (DMSO) se obtuvo de Sigma Aldrich. Para las marcación intracitoplasmática de ZAP-70, CXCR7 e IFN $\gamma$  se utilizó el Kit Fix&Perm de Caltag Laboratories (Burlingame, USA). Para la marcación de f-actina se utilizó Phalloidina FITC y 1- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine (LPC) ambos de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

### **2. Obtención de células LLC y de dadores sanos**

El estudio se llevó a cabo con muestras de sangre periférica de pacientes LLC evaluados al diagnóstico y durante el curso de la enfermedad que son atendidos

en la Sección de Clínica Médica del Instituto de Investigaciones Hematológicas (Academia Nacional de Medicina), Hospital Bancario, Hospital Álvarez. Las muestras de dadores sanos pertenecen a pacientes que se atienden en la Sección de Clínica Médica del Instituto de Investigaciones Hematológicas y corresponden a dadores de edad similar a la de los pacientes con LLC. En todos los casos tanto los pacientes como los dadores sanos fueron informados acerca de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento por escrito. El presente proyecto se encuentra avalado por el comité de Ética de nuestra Institución.

### **a. Obtención de células mononucleares y criopreservación de las muestras.**

Las células mononucleares totales (CMT) fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica recogidas sobre heparina. La sangre entera se diluyó a la mitad en solución fisiológica y fue sembrada sobre una solución de Ficoll-Triyosom, este sistema bifásico fue centrifugado a 1500 rpm durante 30 minutos a 5°C. Luego se recogió la interfase conteniendo a las CMT y se las lavó dos veces con solución fisiológica centrifugando por 10 minutos, una vez a 1500 rpm y otra a 800 rpm. Las CMT fueron finalmente re-suspendidas en medio RPMI 10/ SFB.

Las muestras de CMT fueron utilizadas en el mismo día o re-suspendidas en SFB 20/ DMSO y criopreservadas en tanque de nitrógeno líquido. La viabilidad de las muestras utilizadas luego de la criopreservación se evaluó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el colorante ioduro de propidio-naranja de acridina, las muestras con porcentajes de necrosis y apoptosis mayores a 10 fueron descartadas.

### **b. Purificación de linfocitos T y B.**

Los linfocitos T de pacientes con LLC se purificaron a partir de CMT por selección negativa utilizando anticuerpos específicos para CD19, CD14 y CD56 y perlas

magnéticas cómo se describió anteriormente <sup>97</sup>. Brevemente las CMT se incubaron con los anticuerpos específicos para CD14, CD56 y CD19 por 30 minutos a 4°C, luego se lavaron las células dos veces con medio RPMI 1/ SFB y se incubaron con las perlas magnéticas recubiertas con IgG anti-ratón según las instrucciones del fabricante. La pureza de las células se determinó por citometría de flujo, marcando a las células purificadas con anticuerpos específicos para CD3 y analizando el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>. Se trabajó con una pureza superior al 90/ .

La purificación de linfocitos B de pacientes con LLC (LLCp) también se obtuvo por selección negativa utilizando anticuerpos específicos para CD14, CD56, CD3 y CD2 y perlas magnéticas. La pureza de las células B se verificó por citometría de flujo utilizando anticuerpos anti CD19 PerCP. La pureza obtenida fue siempre mayor o igual al 99/ .

En todos los casos una vez obtenidas las CMT, o los linfocitos purificados y antes de realizar los ensayos funcionales, las células se cultivaron (1 x 10<sup>6</sup> células/ml) por 2 horas en medio completo en estufa gaseada a 37°C para recuperar la expresión de CXCR4 <sup>32,118</sup>.

### **3. Ensayos de migración de los linfocitos T en respuestas al CXCL12.**

Para los ensayos de quimiotaxis se utilizaron Transwells de Corning Incorporated (NY, USA) de 24 pocillos, con membranas de policarbonato de 6,5 mm de diámetro y poros de 5 µm. En el compartimiento inferior se colocó 600 µl de medio RPMI 1640 (1/ SFB, 100 µg/ml estreptomicina) conteniendo a la quimiocina correspondiente CXCL12 y en el compartimiento superior se colocaron 1x10<sup>6</sup> de CMT en 100 µl del mismo medio. Como control se colocó en otro pocillo 600 µl de medio solo (sin quimiocina) en el compartimiento inferior y la misma cantidad de células en el compartimiento superior. Cada experimento se realizó por duplicado.

La placa se dejó en estufa bajo una atmósfera constituida por 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire húmedo a 37°C durante 2 horas. Pasado el tiempo se recolectaron las células que migraron hacia el compartimiento inferior y se marcaron con anticuerpos específicos para CD3 PerCP, CD56 PE y CD4 FITC. El recuento de estas células se realizó por citometría de flujo, determinando el número de células que son adquiridas en un minuto<sup>119</sup>. El índice de migración se calculó como el porcentaje de células que migraron al pocillo con quimiocina con respecto al número de células que migraron espontáneamente (control sin quimiocina)<sup>120</sup>. Analizando los marcadores CD3, CD56 y CD4 por citometría de flujo, en cada caso se determinó el porcentaje de migración de la población T total (CD3<sup>+</sup>56<sup>-</sup>).

Con el fin de determinar la concentración óptima de las quimiocinas a utilizar en los ensayos de migración de linfocitos T, se realizaron ensayos de migración con CMT de pacientes con LLC y de dadores normales con distintas concentraciones de CXCL12 (10, 100, 1000 y 3000 ng/ml). Se eligió como concentración de quimiocina óptima aquella con la cual se obtuvo mayor migración de linfocitos T (1000 ng/ml).

#### **4. Internalización del CXCR4 en respuesta al CXCL12.**

Se analizó la disminución en la expresión del CXCR4 sobre los linfocitos T en respuesta al contacto con su ligando, en función del tiempo de exposición y de la concentración de CXCL12.

Para evaluar la disminución en la expresión del CXCR4 luego del contacto con el CXCL12 (1000 ng/ml) en función del tiempo, se trabajó con CMT de pacientes LLC y de dadores normales. Las CMT (1x10<sup>6</sup> células) fueron cultivadas en 300 µl de medio RPMI (1% SFB) a 37°C, en bloque térmico, en ausencia (control) o presencia de CXCL12 (1000 ng/ml). La incubación fue detenida con PBS frío a los 0, 2, 5, 15, 30 y 60 minutos, se incubó con

anticuerpos anti CXCR4 PE, CD56 FITC y CD3 PerCP por 30 minutos a 4°C, se lavó dos veces con PBS frío y se adquirió en el citómetro de flujo. La disminución en la expresión del CXCR4 por el tratamiento con el CXCL12 se estimó para cada tiempo como porcentaje de expresión con respecto al control sin CXCL12.

Por otro lado se evaluó la disminución en la expresión del CXCR4 luego del contacto con su ligando en función a la concentración del mismo. Para esto  $1 \times 10^6$  CMT de pacientes con LLC fueron cultivadas en 300  $\mu$ l de medio RPMI (1/SFB) a 37°C, en bloque térmico, en presencia de CXCL12 (0, 10, 100 y 1000 ng/ml) por 60 minutos. Luego la incubación fue detenida con PBS frío, se incubó con anticuerpos anti CXCR4 PE, CD56 FITC y CD3 PerCP por 30 minutos a 4°C, se lavó dos veces con PBS frío y se adquirió en el citómetro de flujo. La disminución en la expresión del CXCR4 por el tratamiento con el CXCL12 se estimó como porcentaje de expresión (MIF) para cada concentración con respecto a la expresión del control sin CXCL12.

### **5. Polimerización de actina.**

Para determinar el aumento de F-actina en los linfocitos T luego del tratamiento con CXCL12 se trabajó con linfocitos T purificados (LTp) a partir de CMT de pacientes con LLC y de dadores normales tal como se describió en el punto 2b de Materiales y Métodos. Luego de la incubación a 37°C para la recuperación de la expresión del CXCR4,  $0,5 \times 10^6$  de LTp fueron incubados en 100  $\mu$ l de medio RPMI 1/ a 37°C en bloque térmico en ausencia (control) o presencia de CXCL12 (1000 ng/ml) por diferentes tiempos (15, 30 y 300 segundos), la incubación se detuvo agregando 25  $\mu$ l de una solución de Paraformaldehído 18/ , LPC 0,5 mg/ml y Phalloidina FITC  $4 \times 10^{-7}$  M. Las células se incubaron en oscuridad a 37°C por 10 minutos, luego se lavaron dos veces con solución fisiológica y se adquirieron en el citómetro de flujo. La polimerización de actina se calculó como la MIF de Phalloindina FITC en las células tratadas con CXCL12 por distintos tiempo con respecto al control (sin CXCL12).

### **6. Experimentos de co-cultivos.**

Para los experimentos de co-cultivos, LTp de pacientes con LLC se cultivaron en medio solo o con LLCp en una relación 1:4 (cultivos LTp+LLCp). Luego se realizaron ensayos de quimiotaxis al CXCL12 (1000 ng/ml) cómo se describió anteriormente con los cultivos frescos o con los cultivos luego de 48hs de incubación en estufa a 37°C. La migración de las células CD3<sup>+</sup> se determinó como el / migración (punto 3 de Materiales y Métodos) de los linfocitos T en los cultivos de LTp con respecto a la migración de los cultivos LTp+LLC.

Luego de las 48 horas de cultivo también se determinó la expresión del CXCR4 cómo se describe en punto 9 de Materiales y Métodos. La viabilidad se determinó usando microscopía de fluorescencia y tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio cómo se describió anteriormente <sup>121</sup>, la viabilidad de los cultivos incluidos en este experimento fue siempre superior al 75/ .

### **7. Ensayos de coestimulación de linfocitos T**

Seguidamente las células se trataron o no con la concentración óptima de CXCL12 (1µg/ml), la cual había sido previamente determinada mediante ensayos de quimiotaxis con linfocitos T <sup>118</sup>. Luego de dos horas de cultivo, las células se transfirieron a una placa de 48 pocillos con anti-CD3 (o el correspondiente control de isotipo) inmovilizado en el fondo del pocillo (500 ng/pocillo). Para los experimentos donde se bloqueó el receptor para CXCL12, el CXCR4, las CMT se pre incubaron con 50 µg/ml del anticuerpo anti-CXCR4 (12G5) a 37°C por 1 hora antes del tratamiento con CXCL12.

### **8. Obtención de células de tipo nodriza (*nurse like cells*, NLC)**

La diferenciación de células tipo nodriza (NLC) se realizó tal como está descrito en la literatura <sup>110</sup>. Brevemente, se cultivaron 2 x 10<sup>6</sup> de CMT de sangre periférica de pacientes con LLC en 1 ml de medio completo en una placa de 24

pocillos. Luego de 14 días de cultivo en estufa gaseada a 37°C se retiraron suavemente las células no adherentes y las NLC (células grandes, redondeadas y adherentes) se usaron para los experimentos de coestimulación. Para estos experimentos se descongelaron CMT de pacientes con LLC criopreservadas como se detalla más arriba, y se cultivaron por dos horas sobre las NLC autólogas o solas. Luego, se agregaron partículas de poliestireno recubiertas con anti-CD3 o con el correspondiente control de isotipo, para evaluar la expresión de CD25 y CD69 sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> luego de 24 horas. Para los experimentos de bloqueo del CXCR4, las CMT se pre incubaron con 50 µg/ml de anticuerpo anti-CXCR4 (12G5) a 37°C por 1 hora antes del cultivo de NLC.

### **9. Citometría de flujo.**

Los estudios de citometría de flujo se realizaron utilizando un citómetro de flujo Becton Dickinson de Becton Dickinson Immunocytometry System (San Jose, CA, USA). Los datos fueron analizados empleando el software CellQuest de Becton Dickinson. Las células luego de las marcaciones se lavaron con PBS y se re suspendieron en *Buffer Isoflow* de Becton Dickinson para ser analizadas inmediatamente en el citómetro FACScan.

#### **a. Determinación de la expresión de ZAP-70 por citometría de flujo.**

Para la determinación de ZAP-70 en las células leucémicas, las CMT se fijaron y permeabilizaron utilizando el Kit Fix&Perm (Caltag Laboratories) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los linfocitos se marcaron, antes de fijarlos, con anticuerpos contra CD3 y CD56 marcados con PE y con anticuerpos contra CD19 marcados con Cy. Posteriormente se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para ZAP-70 acoplado a FITC. Se utilizaron las poblaciones de linfocitos T y de células NK para establecer una línea de corte y así cuantificar el porcentaje de linfocitos CD19<sup>+</sup> (linfocitos B, >98/ células LLC) que expresan ZAP-70. El análisis de las células CD19<sup>+</sup> nos permitió corroborar el resultado.

Consideramos que un paciente es positivo para ZAP-70 cuando presentó un 20/ ó más de linfocitos B que expresen ZAP-70<sup>61</sup>.

### **b. Determinación de la expresión de CD38 por Citometría de flujo.**

Para determinar la expresión del marcador CD38 sobre las células leucémicas de los pacientes se marcaron a las CMT con anticuerpos específicos para CD19 PerCP y para CD38 PE o el correspondiente control de isotipo.

Para determinar la expresión de CD38 en las células T se siguió el mismo protocolo cambiando el anticuerpo para CD19 por uno específico para CD3 PerCP. Se analizó la expresión de CD38 en la población CD3<sup>+</sup> obteniéndose la media de intensidad de fluorescencia (MIF).

### **c. Determinación de la expresión de CD3, CD38, CD45, CD3, CXCR4, CXCR7 y CCR7 en los linfocitos T por Citometría de flujo.**

Para comparar la expresión de CD3 sobre los linfocitos T se marcaron CMT de pacientes con LLC y de dadores normales con anticuerpos específicos para CD3 PerCP y se analizó por citometría de flujo, obteniéndose la media de intensidad de fluorescencia (MIF) para CD3.

Para estudiar la expresión de CD38 y CD45 sobre linfocitos T se marcaron CMT de pacientes con LLC y de dadores normales con anticuerpos específicos para CD3 PerCP y para CD45 PE, CD38 PE o con el correspondiente control de isotipo. Se analizó las MIF para CD38 y CD45 sobre los linfocitos CD3<sup>+</sup>.

La expresión de CXCR4, CXCR7 y CCR7 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> se evaluó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para los receptores de quimiocinas (PE) o el correspondiente control de isotipo (PE), para CD3 (PerCP) y para CD4 (FITC) o para CD56 (FITC). Para determinar la expresión basal de CXCR4, las CMT luego de su obtención fueron cultivadas en medio completo por dos horas a 37°C para recuperar los niveles del receptor<sup>118</sup>. Para comparar la expresión de CXCR4 luego del co-cultivo con NLCs, las CMT

fueron cultivadas en medio completo por 14 días para la diferenciación de NLC como se describió más arriba. Al cabo de los 14 días las células no adherentes se recolectaron, se lavaron y se cultivaron nuevamente sobre las NLC o solas. A las 24 horas de cultivo se evaluó la expresión de CXCR4 por citometría de flujo en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que fueron cultivados con las NLC o solos.

Para determinar la expresión intracelular de CXCR7 se incubaron a las células en primer lugar con los anticuerpos específicos para los marcadores de membrana, luego las células se fijaron y permeabilizaron utilizando el kit comercial Fix&Perm (Caltag Laboratories), y luego se incubaron 30 minutos con el anticuerpo para CXCR7 o el control de Isotipo.

**d. Determinación de la expresión de CD69, CD25, CD154, IFN $\gamma$ , en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia o ausencia de CXCL12 por citometría de flujo.**

La expresión de CD25 y CD69 sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se evaluó por citometría de flujo luego de 24 horas de cultivo con los diferentes tratamientos. Para esto las CMT o linfocitos T purificados se marcaron con anticuerpos específicos para CD25, CD69 o el correspondiente control de isotipo conjugado a PE y anticuerpos específicos para CD4 conjugado con FITC.

La molécula CD154 (CD40L) es expresada en la superficie de los LT CD4<sup>+</sup> luego de ser activados a través de su TCR. La detección del CD154 en la membrana de los LT CD4<sup>+</sup> presenta ciertas limitaciones, dado que luego de ser expresada, la molécula CD154 es rápidamente endocitada y degradada o secretada al medio extracelular. Es por esto que para poder detectar la expresión del CD154 en LT activados utilizamos un método previamente descrito<sup>122</sup>, en el que se agrega al cultivo durante la activación el anticuerpo específico para CD154 marcado con FITC junto con monensina. La monensina impide que el CD154 marcado con el anticuerpo se degrade o sea secretado. El

protocolo consiste brevemente en agregar durante el cultivo anticuerpos específicos para CD154 (FITC) junto a 2  $\mu$ M de monensina, luego de 24 horas las células se recolectaron y marcaron con anticuerpos específicos para CD4 (PE) y se evaluó por citometría de flujo.

La expresión intracelular de IFN $\gamma$  se midió agregando Brefeldina A (10  $\mu$ g/ml) durante las últimas 4 horas de cultivo para inhibir la secreción de la citoquina. Las células que produjeron IFN $\gamma$  se detectaron luego de 24 horas por citometría de flujo usando anticuerpos específicos para IFN $\gamma$  (PE) y CD4 (FITC).

Se midió la expresión de CD3 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> tratados o no con CXCL12 (1 $\mu$ g/ml) por dos horas usando anticuerpos específicos para CD3, o el correspondiente control de isotipo, (PerCP), para CD4 (FITC) y para CD56 (PE).

### **e. Evaluación de la proliferación de los linfocitos CD19<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo.**

Para evaluar la proliferación de las poblaciones CD19<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup>, se utilizó el método de dilución de CFSE<sup>123,124</sup>. Para esto, las CMT se marcaron con 5  $\mu$ M de CFSE por 20 minutos en estufa a 37°C y se lavaron 3 veces con medio RPMI 1640 5/ de SFB. Luego las células se incubaron por 2 horas en presencia o ausencia de CXCL12 (1  $\mu$ g/ml) y más tarde fueron transferidas a una placa de 48 pocillos con anticuerpo anti-CD3 o el correspondiente control de isotipo inmovilizado en el fondo (1  $\mu$ g/pocillo). En el caso de los cocultivos con NLC, las CMT descongeladas se marcaron con CFSE de la misma manera y se cultivaron como se describió más arriba. Luego de 5 días de cultivo, las células se recolectaron, se lavaron y marcaron con anticuerpos específicos para CD4 o CD19 (PerCP) y se adquirieron en el citómetro de flujo. El porcentaje de células que había proliferado se determinó evaluando el porcentaje de los linfocitos CD19<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> con baja expresión de CFSE (comparada con la expresión de CFSE del día antes de iniciar el cultivo) dentro de la región de linfocitos viables.

### 10. Microscopía confocal

Las CMT de pacientes con LLC se cultivaron utilizando el sistema de cámara de cultivo de LABTEK (*chamber slide*), que consta de un portaobjetos con pocillos aptos para el cultivo celular en una concentración de  $1 \times 10^6$  de CMT en 0,3 ml de medio completo. Al cabo de 14 días de cultivo, las células no adherentes se descartaron y las NLC se cultivaron con CMT autólogas descongeladas. Luego de 24 horas las células adheridas se lavaron suavemente con PBS, se fijaron con paraformaldehído 3% en PBS por 30 minutos, se trataron con glicina 0,1 M en PBS por 10 minutos, se lavaron dos veces y se marcaron con anticuerpos específicos para CD19 y CD4 (FITC o PE). Las marcaciones de los núcleos se realizaron con los colorantes TOPRO-3 o Ioduro de Propidio. Luego se montaron cubreobjetos sobre los portaobjetos utilizando Fluoromount G. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus, Tokio, Japón) usando un objetivo Plapon 60 X 1.42 NA de inmersión en aceite y las imágenes fueron analizadas utilizando el software de Olympus FV10-ASW.

### 11. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0. La significancia estadística se determinó utilizando los test no paramétricos: *Wilcoxon signed rank test* o *Mann Whitney test* para comparar entre muestras pareadas o no pareadas respectivamente. La significancia de los porcentajes de migración con respecto al control se analizó utilizando la prueba *Wilcoxon signed rank test*. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

---

## **RESULTADOS**

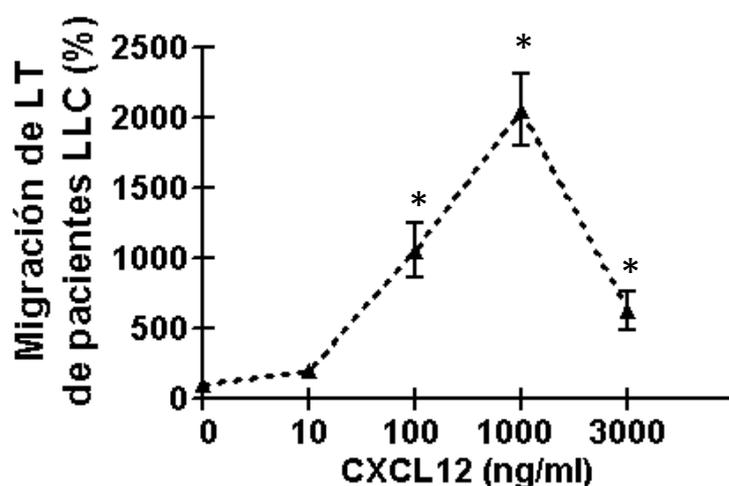
El presente estudio fue llevado a cabo en el Laboratorio de Inmunología Oncológica del Instituto de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires (IMEX CONICET-ANM) con pacientes LLC evaluados al diagnóstico y durante el curso de la enfermedad que son atendidos en la Sección de Clínica Médica del Instituto de Investigaciones Hematológicas (Academia Nacional de Medicina), Hospital Bancario y Hospital Álvarez (rango de edad de los pacientes LLC: 41-86, media: 67 años). Las muestras de dadores sanos de edad y sexo similar pertenecen a pacientes que se atienden en la Sección de Clínica Médica del Instituto de Investigaciones Hematológicas (rango de edad de los dadores sanos: 45-80, media: 68 años). En todos los casos tanto los pacientes como los dadores sanos fueron informados acerca de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento por escrito. Los pacientes incluidos en el estudio no fueron tratados o se encontraban libres de tratamiento por al menos 6 meses previo a la extracción de la muestra. El proyecto contó con el aval del Comité de Ética de la Academia de Medicina de Buenos Aires.

## RESULTADOS OBJETIVO N°1

### 1. Los linfocitos T de los pacientes LLC migran menos en respuesta al CXCL12 en comparación a los linfocitos T provenientes de dadores sanos.

Tal como mencionamos anteriormente nuestro primer objetivo fue evaluar la capacidad migratoria de los linfocitos T de los pacientes con LLC en respuesta al CXCL12. Para ello realizamos ensayos de migración con células mononucleares totales (CMT) de pacientes con LLC tal como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Para estos ensayos se utilizaron placas de 24 pocillos (Transwells) que poseen dos compartimentos separados por una membrana de policarbonato de 6,5 mm de diámetro y poros de 5  $\mu$ m. Las CMT de los pacientes LLC se sembraron en el compartimento superior y en el compartimento inferior se dispuso el medio de cultivo solo (control) o el medio de cultivo suplementado con la quimocina. En este sistema, las células capaces de responder a la quimocina migran desde el compartimento superior, atravesando la membrana, hacia el compartimento inferior. El ensayo se detuvo luego de 2 horas de cultivo a 37°C en estufa gaseada y las células presentes en el compartimento inferior fueron recolectadas para su posterior recuento y marcación. El recuento de las células que migraron al compartimento inferior se realizó por citometría de flujo, determinando el número de células adquiridas en un minuto (143) y la marcación se realizó empleando anticuerpos específicos para CD3 PerCP, CD56 PE y CD4 FITC. El porcentaje de migración de linfocitos T totales ( $CD3^+CD56^-$ ) se calculó relativizando el número de células que migraron al compartimento inferior en respuesta a la quimocina respecto al número de células que migraron en ausencia de la misma (control) (144). Con el objetivo de encontrar la concentración óptima de CXCL12 para los linfocitos T realizamos ensayos de migración con concentraciones crecientes de CXCL12 (0, 10, 100, 1000 y 3000

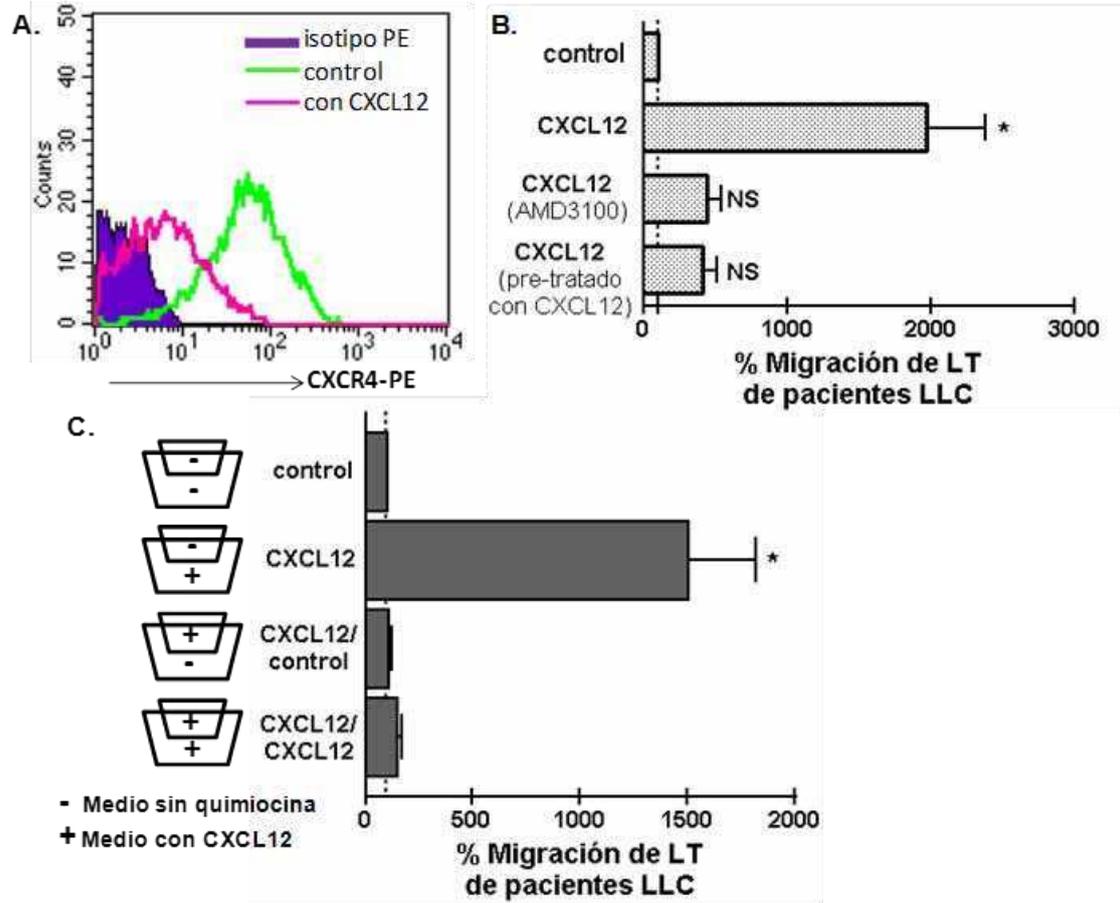
ng/ml). En la **Figura 6** se muestra la curva de migración obtenida con linfocitos T de pacientes LLC en respuesta al CXCL12, la cual presenta el clásico aspecto de curva bifásica que caracteriza a la respuesta migratoria que inducen las quimiocinas. Tal como puede observarse, obtuvimos una migración significativamente mayor con respecto al control para los 100, 1000 y 3000 ng/ml de CXCL12. El mayor porcentaje de migración de linfocitos T se obtuvo con 1000ng/ml de CXCL12, mientras que las células CD19<sup>+</sup> de las mismas muestras presentaron, tal como está descrito, una migración máxima con 100ng/ml (no mostrado) <sup>108</sup>. A partir de estos resultados, decidimos emplear 1000ng/ml para los próximos ensayos.



**Figura 6. Curva de migración de linfocitos T (LT) de pacientes con LLC en respuesta al CXCL12.** Se realizaron ensayos de quimiotaxis en Transwells con CMT de pacientes con LLC tal como se detalló en la sección Materiales y Métodos. Brevemente, en el compartimento superior del Transwell se colocaron las CMT, y en compartimento inferior se colocó medio solo (control) o medio con concentraciones crecientes de la quimiocina CXCL12 (10, 100, 1000 y 3000 ng/ml). Luego de dos horas de incubación a 37°C, se recuperaron las células que migraron al compartimento inferior, se las marcó con anticuerpos específicos para CD3 y CD56 y se determinó el número de células por citometría de flujo. La migración de LT se expresa en porcentaje y se calculó como el número de LT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) que migraron en respuesta a la quimiocina con respecto al número de células que migraron espontáneamente (control sin quimiocina). En la figura se muestran las medias  $\pm$  ES de la migración obtenida con cada concentración de CXCL12 para los 10 pacientes LLC. \*estadísticamente significativo,  $p < 0,05$ ; vs control sin quimiocina, Wilcoxon Signed Rank Test.

A modo de control corroboramos que la pre-incubación de las células con el CXCL12 inhibiera su capacidad de migración en los ensayos *in vitro*. Esto se debe a que uno de los eventos transduccionales que se produce a consecuencia de la interacción del CXCL12 con su receptor, el CXCR4, es la endocitosis del mismo <sup>13</sup>. Por eso, como era de esperar, al pre-tratar a las CMT de los pacientes con CXCL12 observamos una fuerte disminución en la expresión del CXCR4 en los linfocitos T (**Figura 7 A**) y una inhibición en su respuesta migratoria hacia la quimioquina (**Figura 7 B**). Además, el pre-tratamiento de las células con un inhibidor específico del CXCR4, el compuesto AMD3100, también inhibió la migración en respuesta al CXCL12 (**Figura 7 B**). Estos resultados demuestran que el CXCR4 está involucrado en la migración de los linfocitos T de los pacientes LLC hacia el CXCL12. Por último, quisimos determinar si la mayor presencia de linfocitos T en el compartimento inferior de los Transwells inducido por el CXCL12 era debido a un proceso de quimiotaxis, es decir una respuesta direccional de las células en función de la concentración de su ligando o era consecuencia de un proceso de quimioquinesis. En este último caso las células no se movilizan en forma direccional sino que incrementan su motilidad en forma aleatoria. Para estudiar este punto realizamos los ensayos de migración en las condiciones antes mencionadas, en presencia o ausencia de CXCL12 en el compartimento superior del Transwell. Tal como puede verse en la **Figura 7 C**, cuando suplementamos con la misma concentración de CXCL12 el compartimento superior e inferior, la ausencia del gradiente inhibió la migración de las células al compartimento inferior. Tampoco se incrementó el número de células en el compartimento inferior cuando sólo pusimos CXCL12 en el compartimento superior. En su conjunto, estos resultados demuestran que el CXCL12 induce la quimiotaxis y no la motilidad al azar (quimioquinesis) de los linfocitos T de los pacientes LLC.

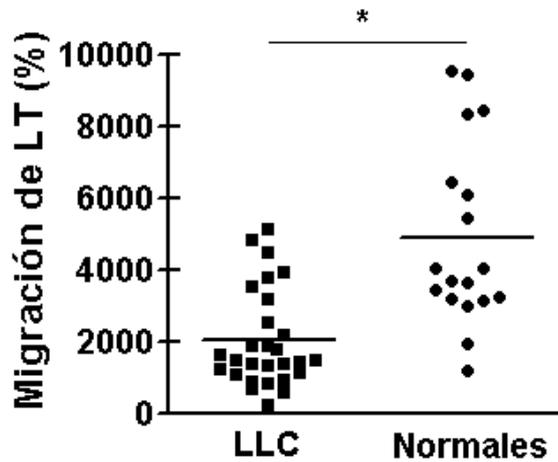
## RESULTADOS OBJETIVO N°1



**Figura 7. La migración de linfocitos T (LT) de pacientes con LLC en respuesta al CXCL12 está mediada por el CXCR4.** Las células mononucleares (CMT) de sangre periférica de 6 pacientes con LLC fueron pre-tratadas por 1 hora con el inhibidor específico para CXCR4 (AMD3100, 40 $\mu$ M) o con CXCL12 (1 $\mu$ g/ml) y luego se realizaron ensayos de migración en Transwells en respuesta al CXCL12 (1 $\mu$ g/ml) tal como se detalló en Materiales y Métodos. **A.** Se evaluó la expresión de CXCR4 en los LT de pacientes con LLC luego de 1 hora de cultivo en medio solo o con CXCL12. Como era de esperar el tratamiento con CXCL12 indujo la disminución de la expresión de CXCR4. En la figura se muestra un histograma representativo para la expresión de CXCR4 sobre los LT de un paciente LLC. El inhibidor AMD3100 inhibe el pegado del anticuerpo específico para CXCR4 clon 12G5, por lo que no se pudo determinar la expresión de CXCR4 en las células tratadas con el inhibidor. **B.** Se muestran la media  $\pm$  ES del / de migración de LT en respuesta al CXCL12 en cada caso. La migración espontánea (control) fue tomada como 100%. **C.** Se realizaron ensayos de migración en respuesta al CXCL12 (1 $\mu$ g/ml) suplementando además el compartimento superior con o sin CXCL12 en la misma concentración. Se muestran la media  $\pm$  ES del / de migración de LT en cada caso, siempre relativizando con la migración espontánea (control) que fue tomada como 100%. NS: estadísticamente no significativo, \* $p$ <0,05, Wilcoxon Signed Rank test, CXCL12 vs control.

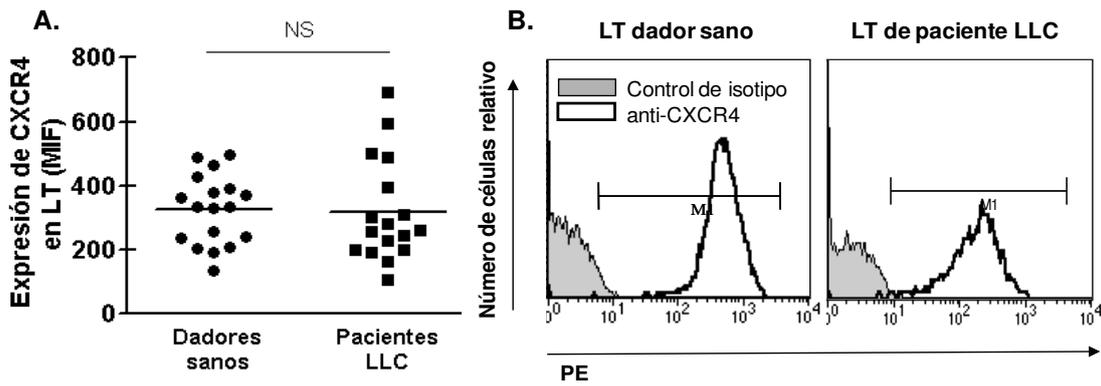
Cuando comparamos la capacidad migratoria de los linfocitos T de los pacientes con la respuesta que mostraban los linfocitos T provenientes de

dadores sanos de edad y sexo similar, observamos que los primeros responden menos al CXCL12 en comparación a los dadores sanos (**Figura 8**).

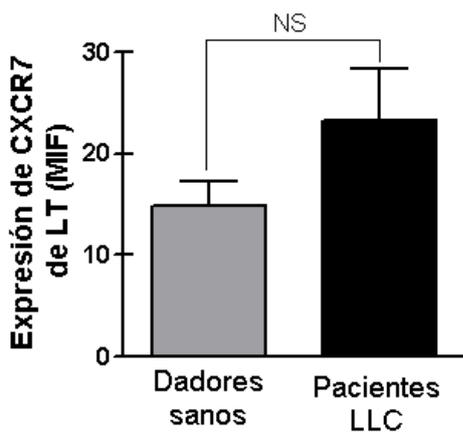


**Figura 8. Migración de linfocitos T (LT) de pacientes LLC y dadores sanos en respuesta al CXCL12.** Se realizaron ensayos de quimiotaxis en Transwells con CMT de pacientes con LLC (n=28) y de dadores sanos de edad y sexo similar (n=18) en respuesta a la concentración óptima de CXCL12 para la migración de LT (1 $\mu$ g/ml), tal como se detalló en Materiales y Métodos. En el gráfico se muestra para cada muestra el número de células T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) que migraron en presencia de las quimiocina relativizadas al número de linfocitos T que migraron en forma espontánea (control). \*Estadísticamente significativo,  $p < 0,0001$  Mann Whitney test.

La causa más sencilla que podría explicar estas diferencias en la migración de los linfocitos T al CXCL12 podría involucrar una distinta expresión de su principal receptor, el CXCR4<sup>12</sup>, o del otro receptor para CXCL12 descrito más recientemente, el CXCR7<sup>19</sup>. Sin embargo, al evaluar su presencia en los linfocitos T de pacientes LLC y dadores sanos por citometría de flujo encontramos que ambos grupos expresan niveles similares de los mismos (**Figuras 9 y 10**). Vale la pena mencionar que no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas al evaluar comparativamente la migración y la expresión de CXCR4 y CXCR7 entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y TCD8<sup>+</sup> (resultados no mostrados).



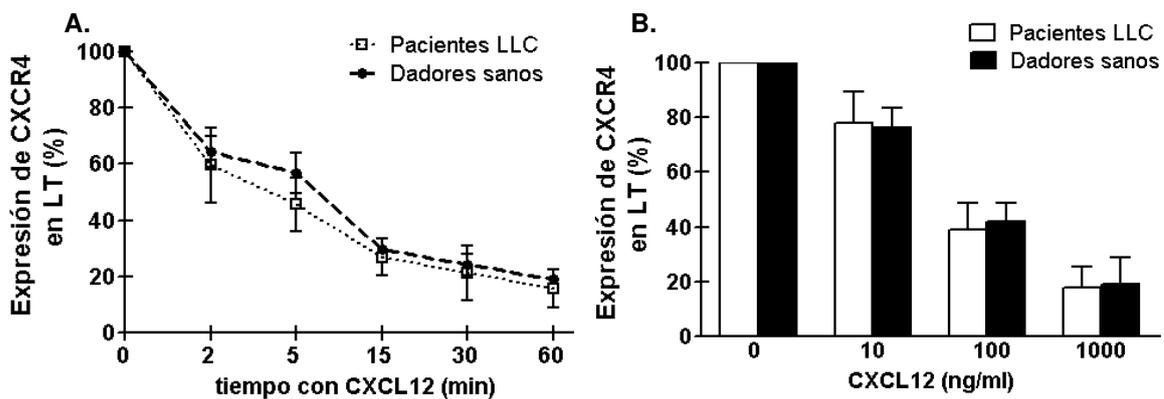
**Figura 9. Expresión del receptor para CXCL12, el CXCR4, en LT.** A. Se evaluó por citometría de flujo la expresión de CXCR4 sobre los LT de sangre periférica tal como se detalló en la sección Materiales y Métodos. En la figura se muestra la media de intensidad de fluorescencia (MIF) del CXCR4 sobre la población de LT de pacientes con LLC y de dadores sanos. En B. se muestran histogramas representativos de la expresión de CXCR4 sobre los LT de un dador sano y un paciente LLC. NS: estadísticamente no significativo, Mann Whitney test.



**Figura 10. Expresión del receptor CXCR7 en linfocitos T de dadores sanos y de pacientes con LLC.** Se evaluó la expresión de CXCR7 por citometría de flujo tal como se detalló en Materiales y Métodos. Se muestra la media  $\pm$  ES de las Medias de Intensidad de Fluorescencia (MIF) obtenidas para la expresión del CXCR7 de 8 dadores sanos y 10 pacientes con LLC en la membrana de los linfocitos T. NS: estadísticamente no significativo, Mann Whitney test.

Dado que los resultados que presentamos en la Figura 7 demuestran que el CXCR4 está involucrado en la migración de los linfocitos T de los pacientes LLC hacia el CXCL12, decidimos evaluar la endocitosis del receptor luego del contacto con su ligando. A fin de evaluar comparativamente este proceso en ambos grupos, realizamos cinéticas de activación cultivando a las CMT de pacientes LLC y de dadores sanos en ausencia (control) o presencia de CXCL12 (1 $\mu$ g/ml). El cultivo se detuvo a los 2, 5, 15, 30 y 60 minutos, luego de lo cual se evaluó la expresión del CXCR4 por citometría de flujo en los linfocitos T

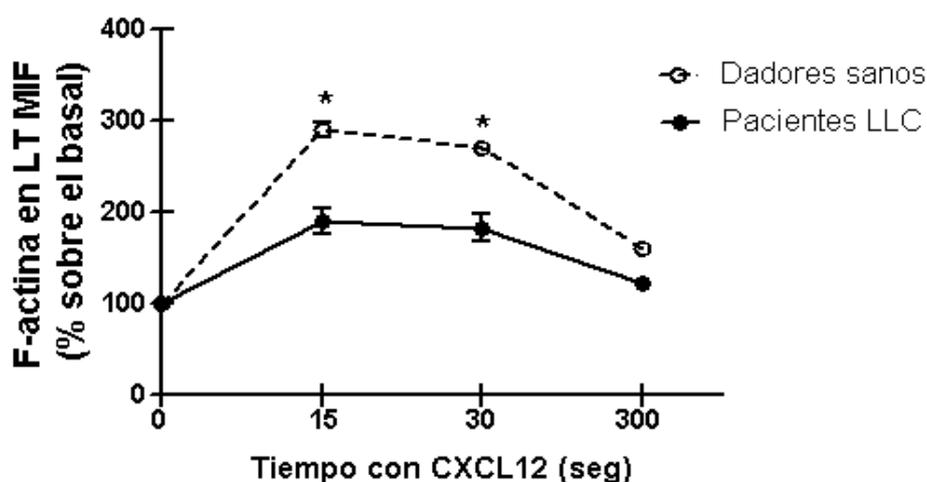
provenientes de los cultivos controles y tratados con la quimiocina. También evaluamos la endocitosis del receptor luego de 60 minutos de tratamiento con distintas concentraciones de CXCL12 (10, 100 y 1000 ng/ml). En la **Figura 11** se muestran los resultados como porcentaje de expresión del CXCR4 en los linfocitos T tratados con CXCL12 respecto a los linfocitos T controles (sin quimiocina) en función del tiempo de incubación con CXCL12 1µg/ml (**Figura 11 A**) o en función de la concentración de la quimiocina (**Figura 11 B**). Tal como puede verse, los linfocitos T de los pacientes LLC muestran una disminución progresiva en la expresión del CXCR4 la cual es muy similar a la de los linfocitos T de dadores sanos. Estos resultados demuestran que la menor migración al CXCL12 que presentan los linfocitos T de los pacientes LLC no puede explicarse por defectos en la normal endocitosis del receptor al contactar con su ligando.



**Figura 11. Internalización del receptor CXCR4 en linfocitos T (LT) de pacientes LLC y dadores sanos luego del contacto con su ligando.** **A.** Se evaluó la disminución en la expresión del CXCR4 en los LT luego del contacto con el CXCL12 (1µg/ml) tal como se detalló en la sección Materiales y Métodos. Brevemente, se incubaron CMT a 37°C de pacientes con LLC en presencia o ausencia de CXCL12. A los 0, 2, 5, 15, 30 y 60 minutos de incubación se marcaron las células con anticuerpos específicos para CXCR4 y CD3 y se evaluó la expresión del receptor en los LT por citometría de flujo. En el gráfico se muestran las medias ± ES del porcentaje de expresión de CXCR4 (MIF) en los LT tratados con CXCL12 con respecto a las no tratadas. **B.** También se evaluó la endocitosis del CXCR4 en función de la dosis del CXCL12, para esto se incubaron a 37°C CMT con distintas dosis de CXCL12 (0, 10, 100 y 1000 ng/ml). Luego de los 60 minutos se evaluó la expresión de CXCR4 en los LT por citometría de flujo como se detalló la sección Materiales y Métodos. Las barras representan las medias ± ES del porcentaje de expresión de CXCR4 (MIF) en los LT tratados con CXCL12 con respecto a las no

tratadas. Los ensayos se realizaron con 12 pacientes LLC y 6 dadores sanos de edad y sexo similar.

Por último, dado que la reorganización del citoesqueleto es un evento clave en la migración celular en respuesta a las quimiocinas, decidimos evaluar la capacidad del CXCL12 de inducir cambios en la polimerización de actina de los linfocitos T de ambos grupos. Para ello, examinamos la expresión de F-actina en los linfocitos T cultivados en presencia o ausencia de CXCL12 durante 15, 30 y 300 segundos. Tal como se observa en la **Figura 12**, encontramos que los linfocitos T de los pacientes y de los dadores sanos lograron reorganizar los microfilamentos de actina y mostraron un pico de expresión transitorio de F-actina luego de los 15 segundos de exposición a la quimiocina, el cual disminuye a medida que avanza el tiempo. Sin embargo los linfocitos T de los pacientes LLC mostraron una menor capacidad de polimerizar actina luego del contacto con CXCL12 en comparación a los dadores sanos, hecho que podría estar involucrado en la menor migración que muestran los pacientes LLC en respuesta a la quimiocina.



**Figura 12. Polimerización de actina luego del contacto con el CXCL12 en linfocitos T (LT) de pacientes con LLC y dadores sanos.** Se evaluó la polimerización de actina por citometría de flujo incubando LT purificados de 10 pacientes LLC y 8 dadores sanos por 0, 15, 30 y 300 segundos con CXCL12 (1µg/ml). Pasado el tiempo correspondiente se

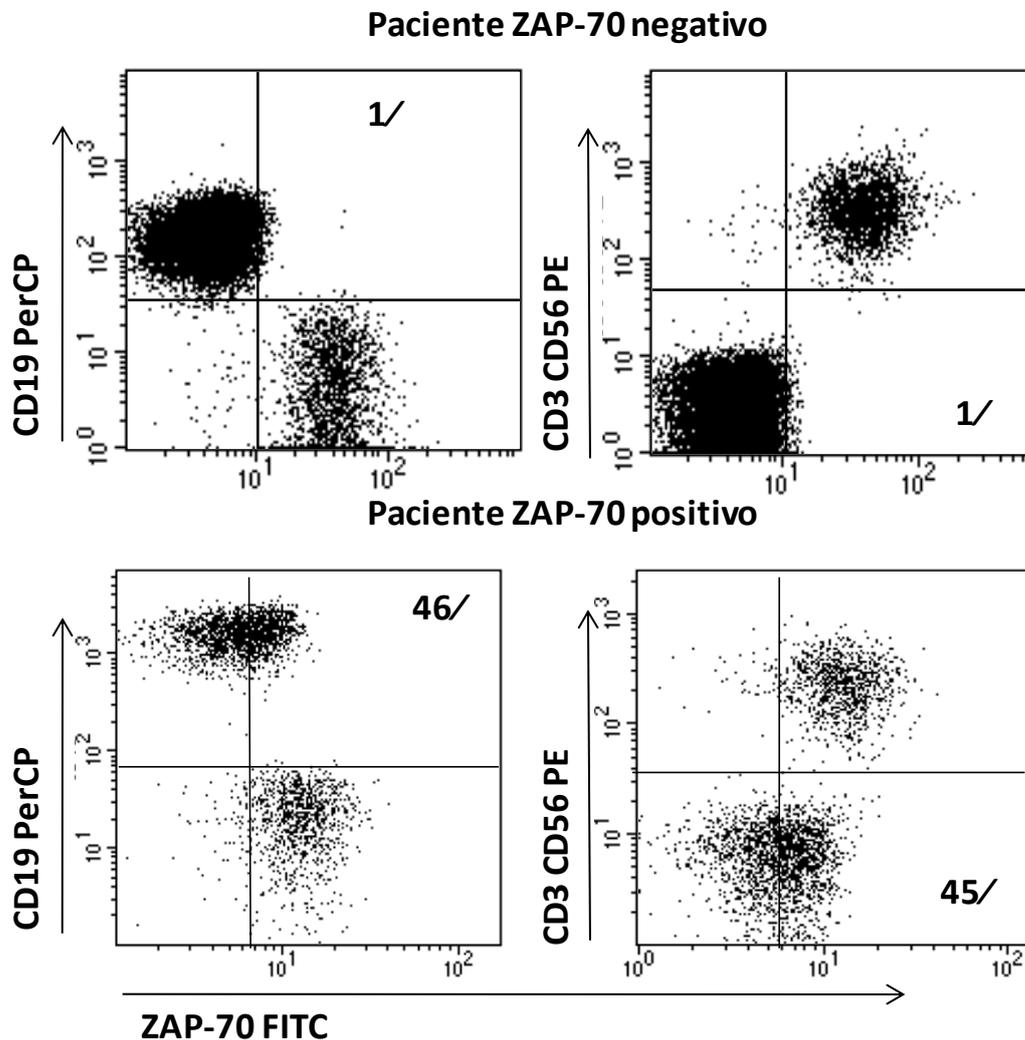
fijaron, permeabilizaron y marcaron las células como se detalló en la sección Materiales y Métodos. En el gráfico se muestran las medias  $\pm$  ES del porcentaje de expresión de F-actina (MIF) en LT tratados con CXCL12 con respecto a no tratados, en función del tiempo de exposición con CXCL12 en segundos. \*Estadísticamente significativo,  $p < 0,05$ , Mann Whitney test.

**2. Los linfocitos T de los pacientes LLC ZAP-70<sup>-</sup> migran menos en respuesta al CXCL12 en comparación a los linfocitos T provenientes de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup>.**

Posteriormente decidimos estudiar comparativamente la respuesta migratoria al CXCL12 en los pacientes LLC de buen y mal pronóstico. Para esto analizamos los datos de la respuesta quimiotáctica de los linfocitos T de pacientes LLC segregándolos en base a la expresión de los marcadores de mal pronóstico CD38 y ZAP-70 en las células CD19<sup>+</sup>.

La evaluación de ZAP-70 por citometría de flujo es una técnica que presenta algunas dificultades por tratarse de una proteína intracitoplasmática y porque varios de los anticuerpos monoclonales para ZAP-70 que se han desarrollado no dieron los resultados esperados. En nuestro laboratorio se ha puesto a punto una técnica de marcación directa utilizando un anticuerpo monoclonal para ZAP-70 marcado con fluoresceína (FITC). Los linfocitos se marcaron además con anticuerpos específicos para CD3 y para CD56 marcados con ficoeritrina (PE) y con un anticuerpo específico para CD19 marcado con PerCP. Resultados similares se obtuvieron al cambiar los fluorocromos para estos 3 anticuerpos (anti-CD3 y anti-CD56-PerCP y anti-CD19-PE) (resultados no mostrados). Dado que los linfocitos T y las células NK expresan ZAP-70, estas poblaciones se utilizaron para establecer una línea de corte que permite cuantificar el porcentaje de linfocitos CD3<sup>-</sup> CD56<sup>-</sup> (linfocitos B, >98/ células LLC) que expresan ZAP-70. El análisis de las células CD19<sup>+</sup> nos permitió corroborar el resultado. Los pacientes fueron considerados positivos para ZAP-70 cuando presentaban un 20/ o más de linfocitos B que expresan dicho marcador<sup>61</sup>. En la

Figura 13 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de ZAP-70 de un paciente representativo ZAP-70<sup>-</sup> y otro ZAP-70<sup>+</sup>.

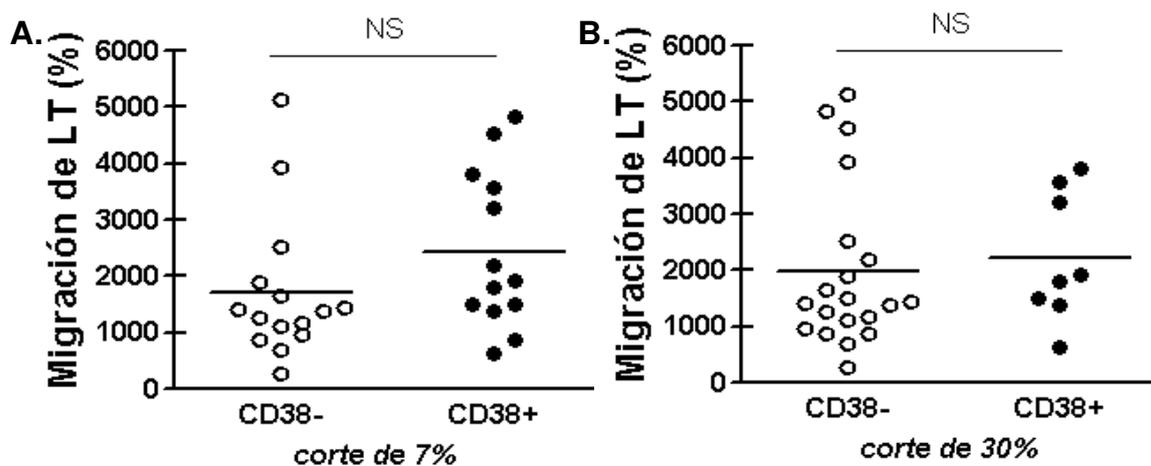


**Figura 13. Determinación de la expresión de la proteína ZAP-70 en células de pacientes LLC por citometría de flujo.** Para determinar el porcentaje de linfocitos B que expresan ZAP-70 se realizó una marcación utilizando anticuerpos específicos para ZAP-70, CD3, CD56 y CD19 según se detalla en Materiales y Métodos. Las poblaciones CD3<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup> se utilizaron para establecer una línea de corte y así cuantificar el porcentaje de linfocitos CD3<sup>-</sup> CD56<sup>-</sup> (linfocitos B, >98/ células LLC-B) que expresan ZAP-70. El análisis de las células CD19<sup>+</sup> se utilizó para corroborar el resultado. Se consideraron positivos para ZAP-70 a los pacientes que presentaron un 20/ o más de linfocitos B que expresaban dicha proteína. La figura muestra los resultados obtenidos en un paciente positivo y otro negativo para dicho marcador.

Para el caso de la molécula CD38, la técnica utilizada para determinar su expresión por citometría de flujo es más sencilla que la de ZAP-70 por tratarse

de una proteína que se expresa en la membrana de las células. Dado que los linfocitos T también pueden expresar CD38, se determinó el porcentaje de células B que expresan dicha proteína mediante una marcación directa utilizando un anticuerpo específico para CD38, o el correspondiente control de isotipo, acoplados a PE y un anticuerpo para CD19 PerCP. Así como existe consenso en relación a que poseer un 20% o más de células CD19<sup>+</sup>ZAP-70<sup>+</sup> determina que el paciente LLC es ZAP-70<sup>+</sup>, existen discrepancias en relación a qué porcentaje de células CD19<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> establece que una muestra sea o no CD38<sup>+</sup>. Es por ello que decidimos evaluar los dos puntos de corte más comúnmente usados para determinar si las muestras son positivas para dicho marcador: cuando más del 7% de las células CD19<sup>+</sup> son CD38<sup>+</sup> (corte 7%)<sup>69</sup> y cuando más del 30% de las CD19<sup>+</sup> son CD38<sup>+</sup> (corte 30%)<sup>65</sup>.

Tal como puede verse en la **Figura 14 A** al segregar a los pacientes LLC en base a los dos puntos de corte para CD38 encontramos que, a pesar de no ser estadísticamente significativo, los linfocitos T de los pacientes LLC CD38<sup>-</sup> mostraron una menor migración en respuesta a CXCL12 en comparación a los linfocitos T de los pacientes CD38<sup>+</sup> al utilizar el punto de corte de 7% , a pesar de expresar niveles similares de CXCR4 (**Tabla 2**).



**Figura 14.** Migración de los LT de pacientes con LLC inducida por el CXCL12 segregados por la expresión del marcador de mal pronóstico CD38. Se muestran los porcentaje de migración en respuesta al CXCL12 (1µg/ml) de los LT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) de

## RESULTADOS OBJETIVO N°1

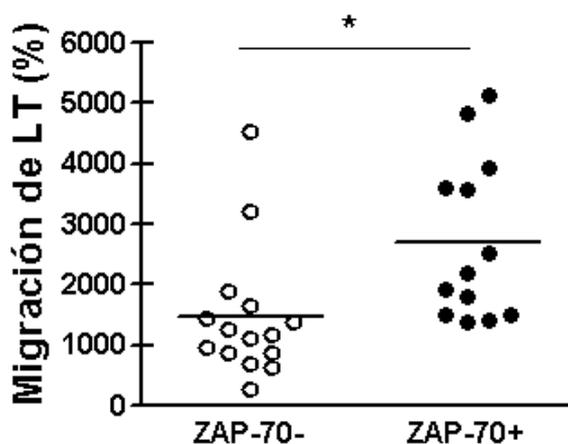
pacientes LLC segregados según la expresión de CD38, utilizando dos puntos de corte para definir a los pacientes CD38 negativos (CD38-) y positivos (CD38+), 7 y 30%. **A.** Los círculos blancos corresponden a los pacientes CD38<sup>-</sup> (con menos de un 7% de células leucémicas que expresan CD38), y los círculos negros a los pacientes CD38<sup>+</sup> (con un 7% o más de células leucémicas que expresan CD38). **B.** De la misma forma los círculos blancos corresponden a los pacientes CD38<sup>-</sup> y los negros a los pacientes CD38<sup>+</sup> en este caso según el punto de corte 30%. NS: estadísticamente no significativo, Mann Whitney test.

**Tabla 2. Expresión de CXCR4 en LT de pacientes LLC segregados según la expresión de ZAP-70 o CD38.**

Parámetro de riesgo	CXCR4		p
	<7%	≥7%	
<b>Células LLC CD38<sup>+</sup></b>	<7%	≥7%	
Media de expresión del receptor en LT (MIF)	328	300	
	(n=11)	(n=6)	0,366
<b>Células LLC CD38<sup>-</sup></b>	<30%	≥30%	
Media de expresión del receptor en LT (MIF)	301	397	
	(n=14)	(n=3)	0,659
<b>Células LLC ZAP-70<sup>+</sup></b>	<20%	≥20%	
Media de expresión del receptor en LT (MIF)	306	341	
	(n=11)	(n=6)	0,841

**Tabla 2. Expresión de CXCR4 en LT de pacientes con LLC segregados según la expresión de ZAP-70 o CD38.** Se evaluó por citometría de flujo la expresión de CXCR4 en la membrana de LT como se describió en la sección Materiales y Métodos. En la tabla se muestran las Medias de Intensidad de Fluorescencia (MIF) de cada receptor de quimiocinas como media de expresión en los LT de pacientes segregados según la expresión de CD38, utilizando dos puntos de corte 7 y 30%, y según la expresión de ZAP-70 utilizando el punto de corte 20%. Debajo de la media de expresión del receptor se muestra el número de pacientes utilizados en cada determinación (n). También se muestra el valor p de significancia correspondiente al test Mann Whitney al comparar la expresión del CXCR4 entre los grupos de pacientes.

Sin embargo, cuando analizamos la migración de los linfocitos T de los pacientes LLC segregados en base a la expresión de ZAP-70, claramente observamos que los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> migraban menos en respuesta al CXCL12 en comparación a los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> (**Figura 15**). Vale la pena destacar que esta diferencia es altamente significativa ( $p=0,009$ ) a pesar de que ambos grupos de pacientes expresan niveles comparables de CXCR4 (**Tabla 2**).

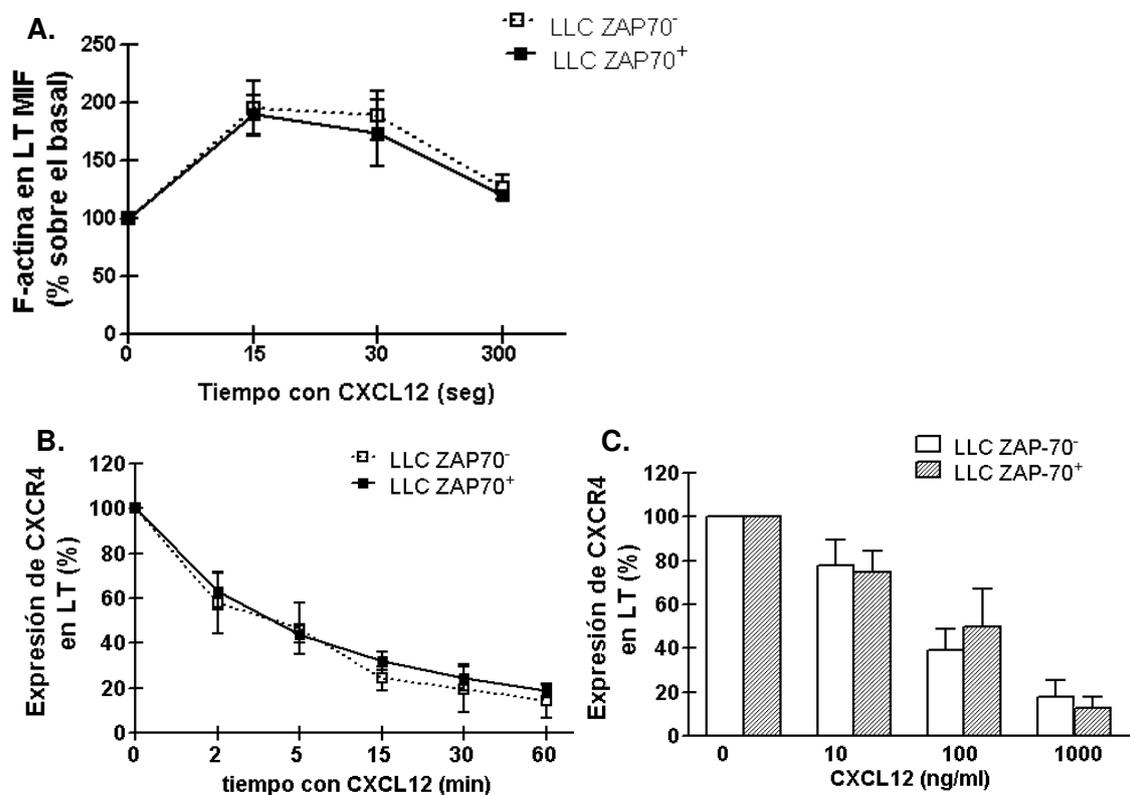


**Figura 15.** Los LT de los pacientes con LLC ZAP-70<sup>-</sup> migran significativamente menos en respuesta al CXCL12 que los LT de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup>. Se muestran los porcentajes de migración de los LT de pacientes con LLC segregados según la expresión de ZAP-70, en respuesta a CXCL12 (1µg/ml). Los círculos blancos corresponden a la migración de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> (con menos del 20% de las células leucémicas positivas para ZAP-70) y los círculos negros a la migración de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> (con 20% o más de células leucémicas positivas para ZAP-70). \*estadísticamente significativo,  $p < 0,01$  Mann Whitney test.

**3. La polimerización de los microfilamentos de actina en los linfocitos T y la endocitosis del CXCR4 luego del tratamiento con CXCL12 es similar en los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> y ZAP-70<sup>+</sup>.**

Con la intención de poder explicar las diferencias en la respuesta migratoria al CXCL12 entre los linfocitos T de los pacientes LLC ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup>, evaluamos comparativamente la expresión de F-actina en los linfocitos T cultivados en ausencia o presencia de CXCL12 durante 15, 30 y 300 segundos, sin encontrar

diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes (**Figura 16 A**). Asimismo, tampoco observamos diferencias entre los grupos al evaluar la disminución en la expresión del CXCR4 luego del contacto con su ligando en función del tiempo (**Figura 16 B**) o de la concentración de CXCL12 empleada (**Figura 16 C**). En su conjunto, estos resultados muestran que la menor migración de los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> en respuesta al CXCL12 no se debe a un defecto particular en la polimerización de actina o en el proceso de internalización del CXCR4 inducido por la quimiocina.

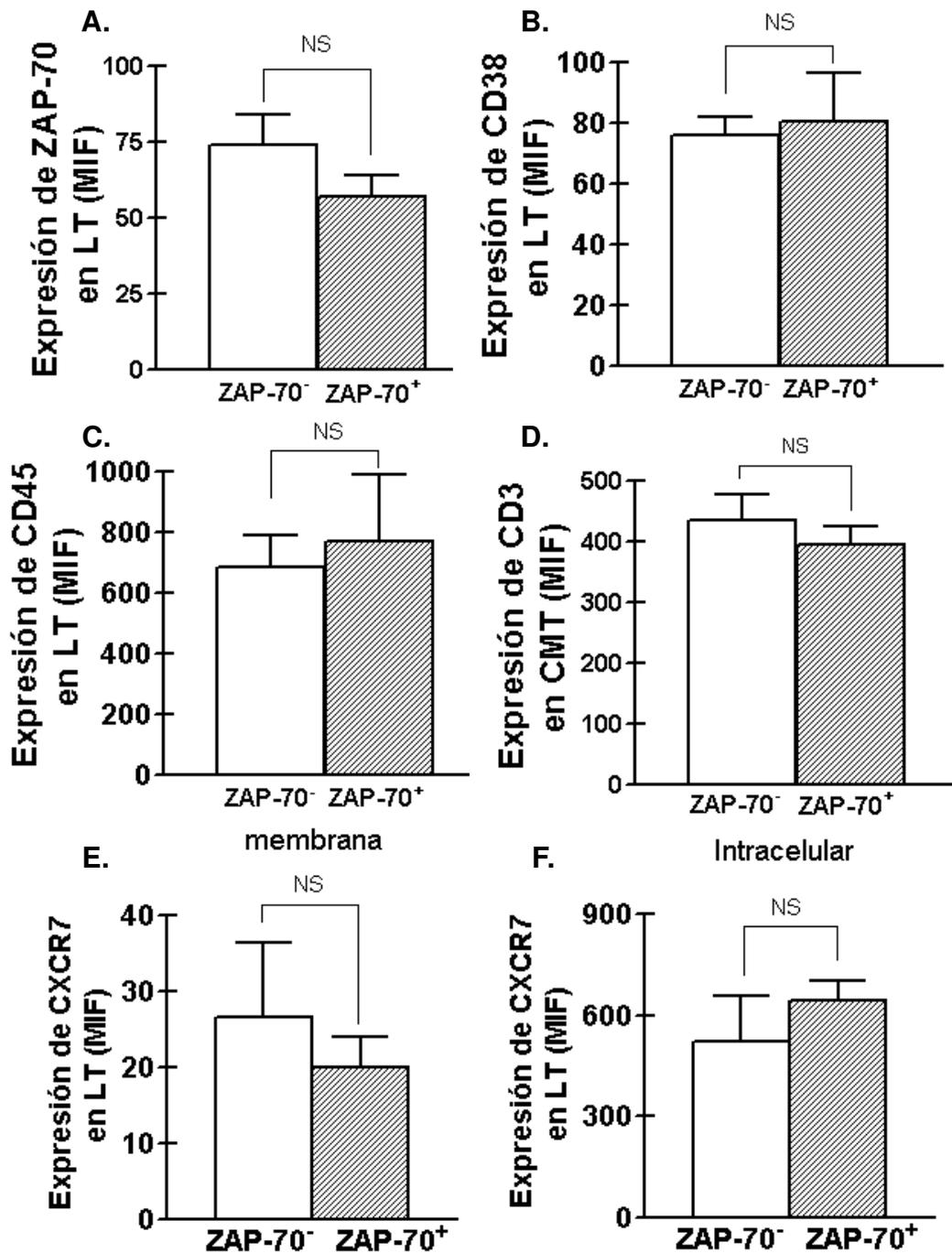


**Figura 16.** Los linfocitos T de los pacientes con LLC ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup> responden al contacto con el CXCL12 con una polimerización de actina y una internalización del CXCR4 similar. **A.** Se evaluó la polimerización de actina por citometría de flujo incubando LT purificados de 5 pacientes LLC ZAP-70<sup>+</sup> y 5 LLC ZAP-70<sup>-</sup> por 0, 15, 30 y 300 segundos con CXCL12 (1µg/ml). Pasado el tiempo correspondiente se fijaron, permeabilizaron y marcaron las células como se detalló en la sección Materiales y Métodos. En el gráfico se muestran las medias ± ES del porcentaje de expresión de F-actina (MIF) en LT tratados con CXCL12 con respecto a no tratados, en función del tiempo de exposición con CXCL12 en segundos. Los cuadrados negros corresponden a los pacientes con LLC ZAP-70<sup>+</sup> y los blancos a los ZAP-70<sup>-</sup>. **B.** Se evaluó la disminución en la expresión del CXCR4 en los LT luego del contacto con el CXCL12 (1µg/ml) tal como se

detalló la sección *Materiales y Métodos*. Brevemente, se incubaron CMT a 37°C de pacientes con LLC en presencia o ausencia de CXCL12. A los 0, 2, 5, 15, 30 y 60 minutos de incubación se marcaron las células con anticuerpos específicos para CXCR4 y CD3 y se evaluó la expresión del receptor en los LT por citometría de flujo. En el gráfico se muestran las medias  $\pm$  ES del porcentaje de expresión de CXCR4 (MIF) en los LT tratados con CXCL12 con respecto a las no tratadas. Los cuadrados blancos representan a los LT de pacientes LLC ZAP-70<sup>-</sup>, los cuadrados negros a los pacientes LLC ZAP-70<sup>+</sup>. El ensayo se realizó con 6 muestras para cada grupo. **C.** También se evaluó la endocitosis del CXCR4 en función de la dosis del CXCL12, para esto se incubaron a 37°C CMT de 6 pacientes con LLC ZAP-70<sup>-</sup> y 6 ZAP-70<sup>+</sup> por 60 minutos con distintas dosis de CXCL12 (0, 10, 100 y 1000 ng/ml). Luego se evaluó la expresión de CXCR4 en los LT por citometría de flujo como se detalló la sección *Materiales y Métodos*. Las barras representan las medias  $\pm$  ES del porcentaje de expresión de CXCR4 (MIF) en los LT tratados con CXCL12 con respecto a las no tratadas. Las barras blancas corresponden a los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> y las grises a los pacientes con LLC ZAP-70<sup>+</sup>.

**4. La menor migración de los linfocitos T de los pacientes LLC ZAP-70<sup>-</sup> no se asocia con una menor expresión de ZAP-70, CD3, CD45 o CD38 en esas células.**

Posteriormente decidimos evaluar en los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup> otras moléculas que podrían estar regulando su respuesta quimiotáctica al CXCL12. Está descrito que ZAP-70 participa activamente en la transducción de señales a través del CXCR4<sup>125</sup> y es un molécula indispensable para que el CXCL12 logre inducir la migración de los linfocitos T<sup>126</sup>. En base a estos antecedentes, nuestra hipótesis fue que la menor migración de los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> podría explicarse por una menor expresión de ZAP-70 en dichas células. Sin embargo, al evaluar la expresión de ZAP-70 en los linfocitos T de los pacientes LLC encontramos una expresión similar en ambos grupos de riesgo (**Figura 17 A**).



**Figura 17. Expresión de las proteínas ZAP-70, CD38, CD3, CD45 y CXCR7 en los LT de pacientes con LLC.** Se analizó por citometría de flujo la expresión de ZAP-70 (A), CD38 (B), CD3 (C), CD45 (D) y CXCR7 (E y F) en los LT de pacientes LLC tal como se detalló en la sección Materiales y Métodos. Las barras representan las medias  $\pm$  ES de la expresión de cada proteína (MIF) en los LT de 11 LLC ZAP-70<sup>-</sup> (barras blancas) y 6 pacientes con LLC ZAP-70<sup>+</sup> (barras grises) La expresión de CXCR7 fue evaluada en 5 muestras de cada grupo. NS: estadísticamente no significativo, Mann Whitney test.

En relación al CD38, se reportó que ésta molécula participa en la transducción de señales a través del CXCR4 expresado en las células leucémicas CD38<sup>+</sup> y que la ausencia o el bloqueo del CD38 con anticuerpos específicos disminuye la señalización a través del CXCR4<sup>127</sup>. Dado que los linfocitos T de los pacientes expresan CXCR4 y CD38, decidimos evaluar si el nivel de expresión CD38 en los linfocitos T de los pacientes LLC era distinto entre el grupo ZAP-70<sup>-</sup> y ZAP-70<sup>+</sup>, sin encontrar resultados estadísticamente significativos (**Figura 17 B**). Asimismo, la expresión de la molécula CD45, que puede influenciar la quimiotaxis en respuesta a CXCL12, fue similar en los linfocitos T de ambos grupos (**Figura 17 C**). Por último, un trabajo publicado en el año 2006 reportó que el CXCL12 favorece la asociación física entre el CXCR4 y el TCR/CD3 a fin de utilizar la maquinaria transduccional del receptor antigénico para la señalización<sup>33</sup>. El hecho de que los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> responden en forma menos eficiente al CXCL12 en comparación a los ZAP-70<sup>+</sup>, podría explicarse por una menor expresión del TCR/CD3 en la membrana celular del primer grupo de pacientes. A fin de evaluar su expresión en los linfocitos T de los pacientes LLC, realizamos inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 conjugados con PE y análisis por citometría de flujo, encontrando una expresión similar de CD3 en ambos grupos de pacientes (**Figura 17 D**). También evaluamos la expresión de CXCR7 tal como se describió anteriormente. La marcación de este receptor se evaluó tanto en la membrana de los linfocitos T (**Figura 17 E**) así como en condiciones permeabilizantes para evaluar además el contenido intracelular (**Figura 17 F**) ya que ha sido descrito que este receptor puede almacenarse dentro de la célula en ausencia de su ligando<sup>128</sup>. Como puede observarse en la **Figura 17** no encontramos diferencias en la expresión de CXCR7 en los linfocitos T de ambos grupos de riesgo en ninguna de las dos condiciones de marcación evaluadas.

En su conjunto estos resultados indican que la menor migración en respuesta al CXCL12 que presentan los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> no

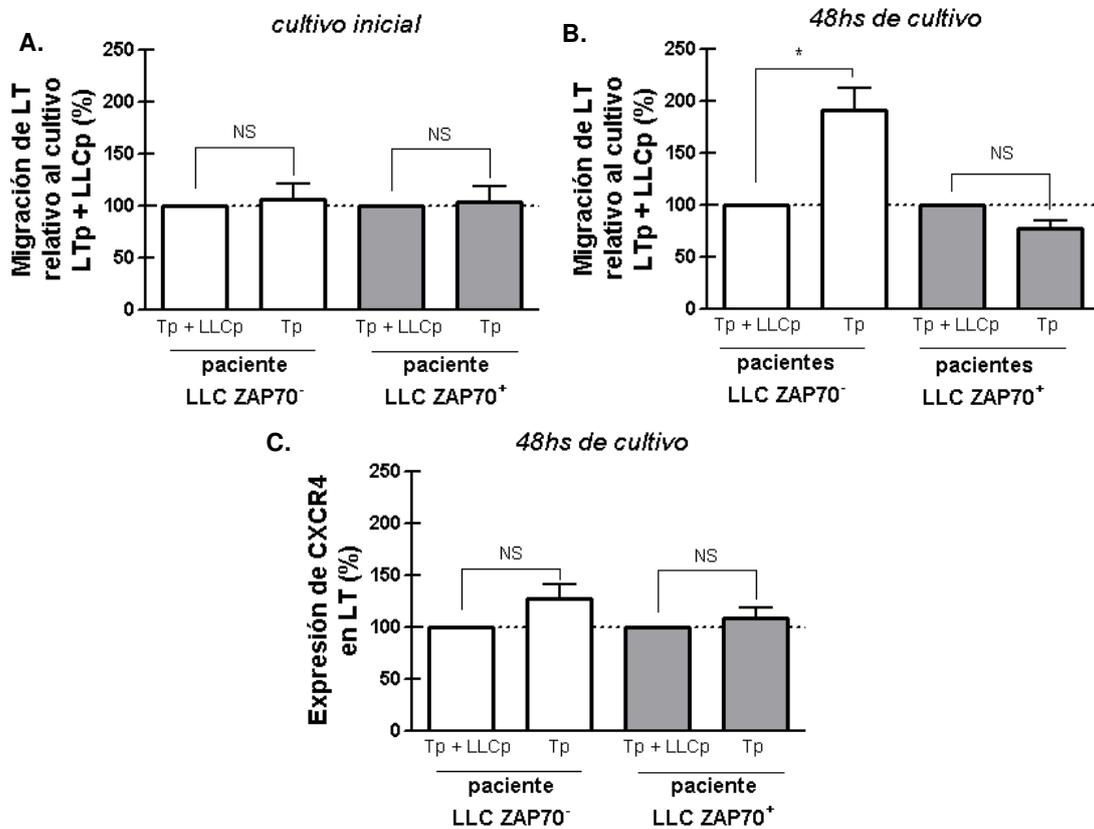
puede explicarse por una menor expresión de ZAP-70, CD38, CD45 o CD3 en esas células, ni por una distinta expresión de CXCR7.

**5. Las células leucémicas de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> y no la de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> reducen la migración de los linfocitos T autólogos en respuesta al CXCL12.**

Anteriormente había sido reportado que la presencia de las células leucémicas puede inducir cambios específicos en los linfocitos T que resultan en defectos funcionales de los mismos<sup>114,115,129</sup>. Por eso decidimos evaluar si las células LLC de los cultivos de CMT provenientes de pacientes ZAP-70<sup>-</sup> y ZAP-70<sup>+</sup> lograban modular la quimiotaxis de los linfocitos T autólogos en respuesta al CXCL12. Para ello, purificamos a los linfocitos T de los pacientes LLC y los cultivamos solos (LTp) o en presencia de células LLC autólogas purificadas (LTp+LLCp) y evaluamos la migración de los linfocitos T en respuesta al CXCL12 tal como lo veníamos haciendo. Como mostramos en la **Figura 18 A** al realizar el ensayo de migración inmediatamente luego de la purificación, la respuesta migratoria de los linfocitos T cultivados solos (LTp) fue similar a la de los linfocitos T cultivados en presencia de células leucémicas autólogas (LTp+LLCp), tanto en los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> como en los pacientes ZAP-70<sup>-</sup>. Llamativamente, luego de 48 horas de cultivo, los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> que fueron cultivados solos, migraron significativamente más que aquellos linfocitos T que estuvieron 48hs en presencia de las células leucémicas autólogas (LTp+LLC) (**Figura 18 B**), aún expresando los mismos niveles de CXCR4 (**Figura 18 C**). Esto es algo particular de los cultivos de pacientes ZAP-70<sup>-</sup>, ya que no se observaron diferencias en la capacidad de respuesta al CXCL12 de los linfocitos T cultivados solos o con LLC en los pacientes ZAP-70<sup>+</sup>. Estos resultados sugieren que las propias células LLC de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> serían las responsables de modular negativamente de

## RESULTADOS OBJETIVO N°1

los linfocitos T en respuesta al CXCL12, a través de un mecanismo que no hemos podido conocer hasta el momento.



**Figura 18. Las células leucémicas (LLC) de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> reducen la migración de los LT en respuesta al CXCL12.** Se cultivaron LT purificados de pacientes con LLC ZAP-70<sup>-</sup> (n=8) y de pacientes con LLC ZAP-70<sup>+</sup> (n=8) solos (LTp), o con LLC autologas en una relación 1:4 (cultivos LTp+ LLCp). Se evaluó la migración inducida por el CXCL12 (1 µg/mL) de los LT de estos cultivos frescos (A) y a las 48 horas de incubación a 37°C (B), como se describió en la sección Materiales y Métodos. Las barras representan las medias ± ES del porcentaje de migración de LT en los cultivos LTp + LLCp con respecto a la migración de los LTp + LLCp. NS: estadísticamente no significativo, \*p=0.008, Wilcoxon Signed Rank Test. C. Se determinó la expresión de CXCR4 por citometría de flujo en los cultivos de LTp y de LTp+ LLCp luego de las 48 horas. NS: estadísticamente no significativo, Wilcoxon Signed Rank Test.

Los resultados presentados en esta primera parte demuestran que los linfocitos T de pacientes con LLC son capaces de migrar en respuesta al CXCL12, aunque en menor medida que los linfocitos T de dadores sanos, probablemente debido a la menor polimerización de actina que muestran en respuesta al contacto con la quimiocina. Además, encontramos que los linfocitos T de

## *RESULTADOS OBJETIVO Nº1*

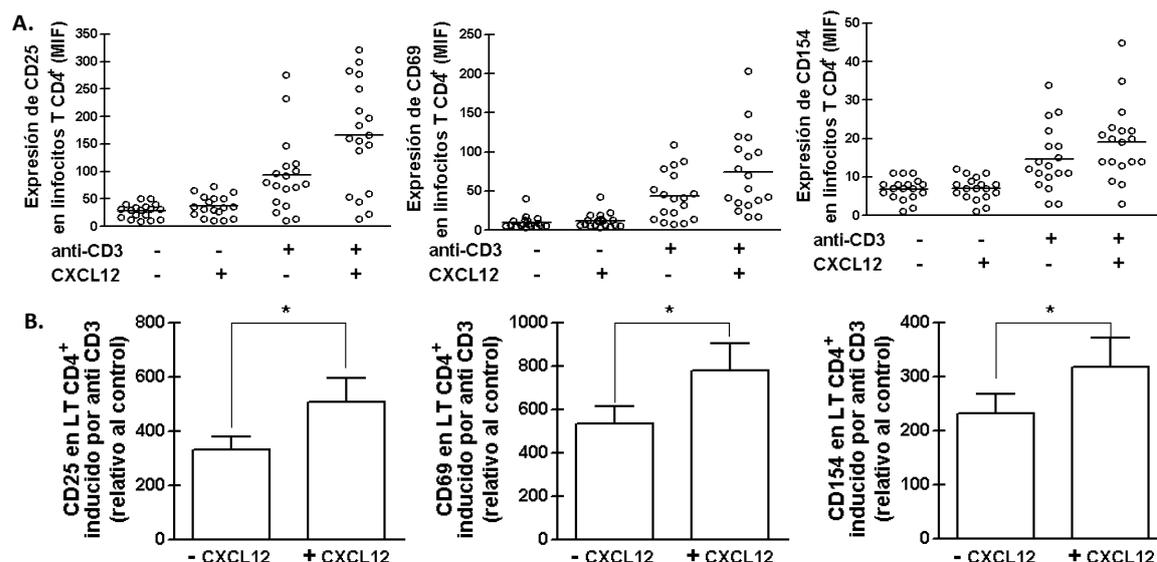
---

pacientes LLC ZAP-70<sup>-</sup> poseen una menor capacidad migratoria al CXCL12 que los linfocitos T de pacientes LLC ZAP-70<sup>+</sup>, hecho que parecería ser inducido por señales brindadas por el propio clon leucémico del primer grupo de pacientes.

## RESULTADOS OBJETIVO N°2

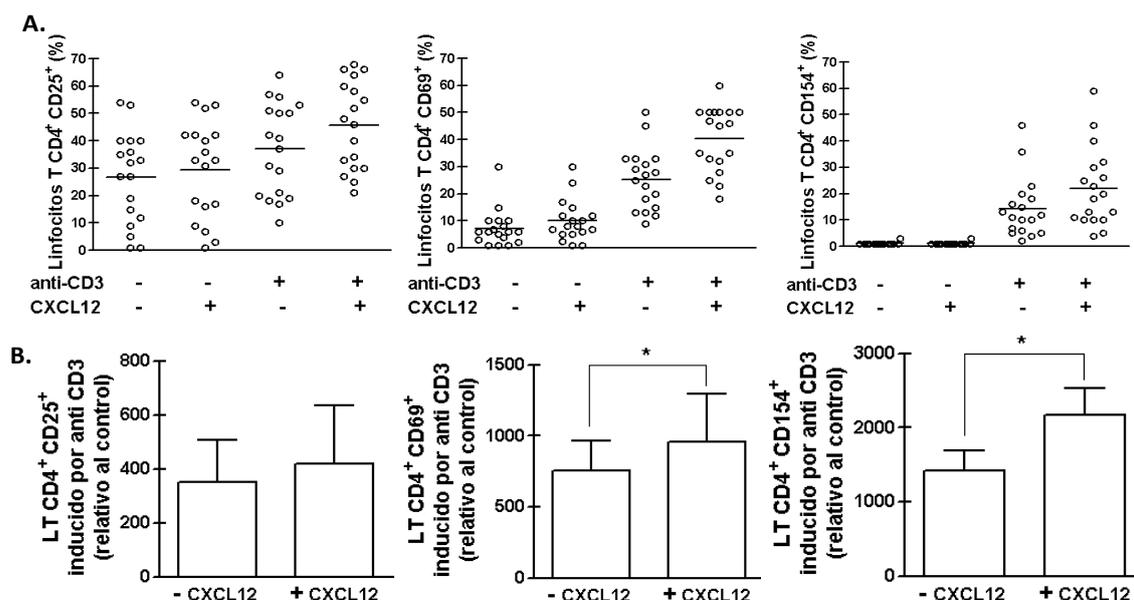
### 1. El CXCL12 aumenta la expresión de marcadores de activación sobre los linfocitos T de pacientes con LLC estimulados a través del TCR.

Luego quisimos evaluar otros aspectos de la fisiología de los linfocitos T que podrían modularse por el CXCL12. Es por esto que como parte del segundo objetivo de este trabajo de Tesis nos propusimos evaluar si el CXCL12 era capaz de aumentar la activación y proliferación de los linfocitos T de pacientes LLC. Para ello realizamos cultivos de células mononucleares totales (CMT) de pacientes LLC en presencia o ausencia de CXCL12 y activamos a los linfocitos T presentes en la muestra por entrecruzamiento del TCR/CD3 empleando anticuerpos anti-CD3 tal como se detalló en la sección Materiales y Métodos. La concentración de CXCL12 empleada fue 1µg/ml, la cual fue seleccionada previamente evaluando la migración óptima de los linfocitos T de los pacientes en respuesta a la quimiocina (**Figura 6**). Luego de 24 horas de cultivo evaluamos la expresión de los marcadores de activación CD25, CD69 y CD154 (CD40L) sobre la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo. Nos centramos en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ya que esta subpoblación es la que, una vez activada en los órganos linfáticos, es capaz de brindar señales de supervivencia y proliferación al clon leucémico<sup>109,117</sup>. Como era de esperar, la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> por entrecruzamiento del TCR/CD3 indujo un claro aumento en la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de CD25, CD69 y CD154 (**Figura 19 A**) y en el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> positivos para dichos marcadores (**Figura 20 A**). Por el contrario, el tratamiento con CXCL12 solo no indujo ningún cambio significativo en su expresión (**Figura 19 A y 20 A**). Llamativamente, la presencia de CXCL12 durante la activación de los linfocitos T incrementó significativamente la expresión de CD25, CD69 y CD154 por sobre los valores inducidos por el entrecruzamiento del TCR/CD3 (**Figura 19 A y B**).



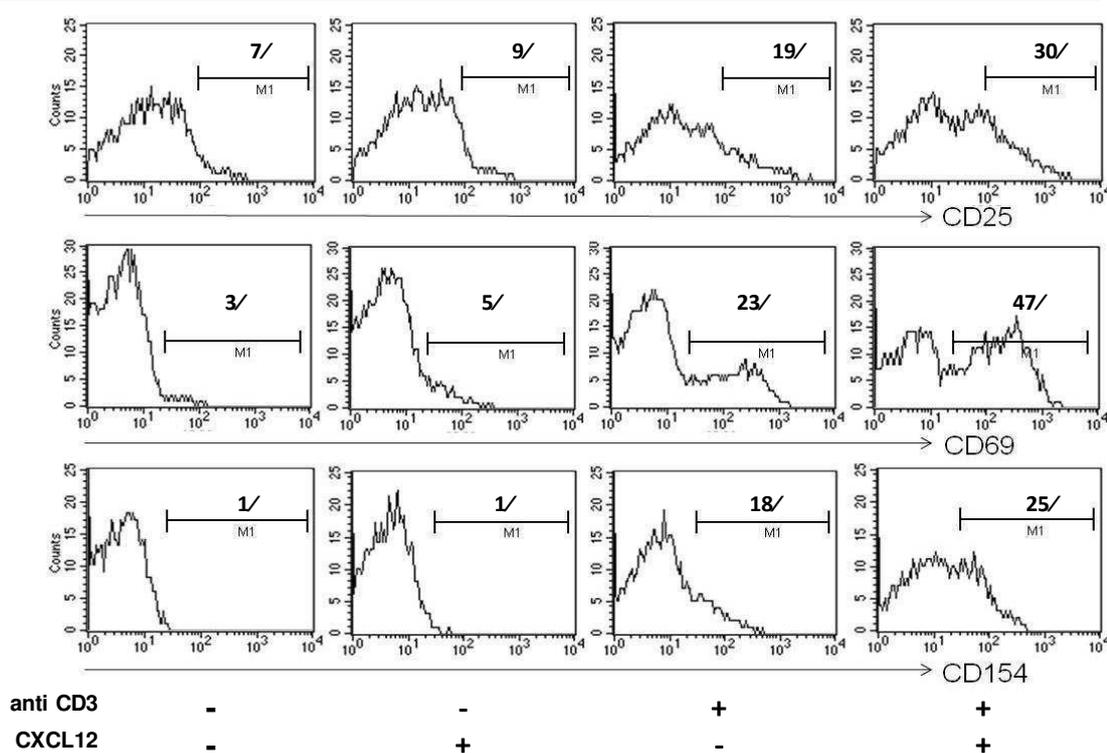
**Figura 19. El CXCL12 aumenta la expresión de CD25, CD69 y CD154 sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC estimulados a través del TCR.** Se realizaron cultivos con células mononucleares totales de 18 pacientes con LLC en presencia o ausencia de CXCL12 (1µg/ml) por dos horas y luego fueron sembradas sobre anticuerpos específicos para CD3 (anti-CD3) o el correspondiente control de isotipo inmovilizados en placa. Luego de 24 horas se midió la expresión de CD25, CD69 y CD154 en los linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo tal como se detalla en Materiales y Métodos. **A.** En la figura se muestran los valores de media de intensidad de fluorescencia (MIF) de CD25, CD69 y CD154 para cada paciente. **B.** Luego los valores obtenidos para cada paciente se utilizaron para calcular el porcentaje de aumento del marcador de activación inducido por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3. Las barras muestran la media  $\pm$  ES de los aumentos inducidos por anti-CD3 en ausencia y en presencia de CXCL12. \*  $p < 0,05$  Wilcoxon signed rank test

Del mismo modo, el CXCL12 aumentó la proporción de células positivas para dichos marcadores inducida por el anti-CD3 (**Figura 20 A y B**). En la **Figura 21** se muestran los histogramas de la expresión de los marcadores de activación de un paciente representativo en las cuatro condiciones de cultivo que mencionamos anteriormente. Estos resultados demuestran que el CXCL12 se comporta como un factor coestimulador para la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes LLC.



**Figura 20.** El CXCL12 aumenta el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> positivos para la expresión de CD25, CD69 y CD154 de pacientes LLC estimulados a través del TCR. Se realizaron cultivos con células mononucleares totales de 18 pacientes con LLC en presencia o ausencia de CXCL12 (1µg/ml) por dos horas y luego fueron sembradas sobre anticuerpos específicos para CD3 (anti-CD3) o el correspondiente control de isotipo inmovilizados en placa. Luego de 24 horas se midió la expresión de CD25, CD69 y CD154 en los linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo tal como se detalla en Materiales y Métodos. **A.** En la figura se muestran los porcentajes de LT CD4<sup>+</sup> positivos para CD25, CD69 y CD154 de cada paciente. **B.** Luego los valores obtenidos para cada paciente se utilizaron para calcular el porcentaje de aumento del marcador de activación inducido por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3. Las barras muestran la media ± ES de los aumentos inducidos por anti-CD3 en ausencia y en presencia de CXCL12. \* p<0,05 Wilcoxon signed rank test.

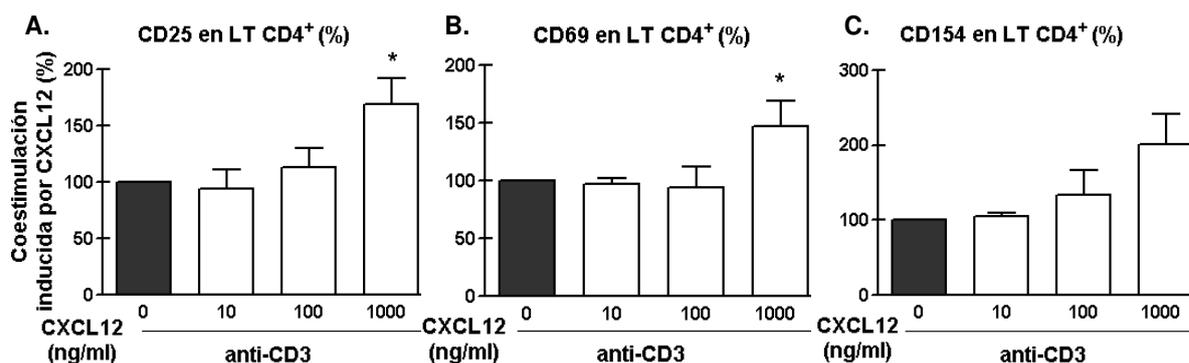
## RESULTADOS Objetivo N°2



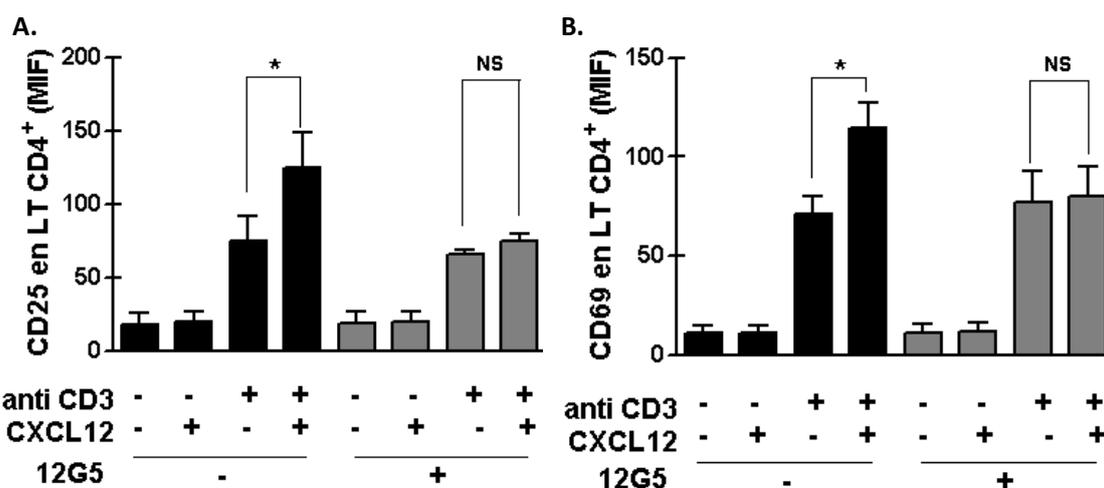
**Figura 21.** Expresión de CD25, CD69 y CD154 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LLC activados en ausencia y presencia de CXCL12. Se muestran los histogramas de la expresión de CD25, CD69 y CD154 sobre los LT CD4<sup>+</sup> de un experimento representativo. Sobre los histogramas se muestran los porcentajes de células positivas para los marcadores.

Al realizar estos mismos experimentos con concentraciones menores de CXCL12, encontramos que la coestimulación inducida por la quimiocina se hacía menos evidente, sugiriendo que el efecto coestimulador del CXCL12 es dosis-dependiente (**Figura 22**). Por otro lado, quisimos corroborar que este fenómeno coestimulador mediado por el CXCL12 involucraba a su principal receptor, el CXCR4. Para esto, pre-tratamos a las CMT de los pacientes con un anticuerpo bloqueante para el CXCR4 (clon 12G5) o su correspondiente control de isotipo y luego procedimos a realizar los cultivos en las cuatro condiciones mencionadas anteriormente. Como puede verse en la **Figura 23** el pre-tratamiento con el anticuerpo bloqueante para CXCR4 inhibió el efecto coestimulador del CXCL12 indicando que el fenómeno de coestimulación T que describimos es mediado por el receptor CXCR4.

## RESULTADOS Objetivo N°2

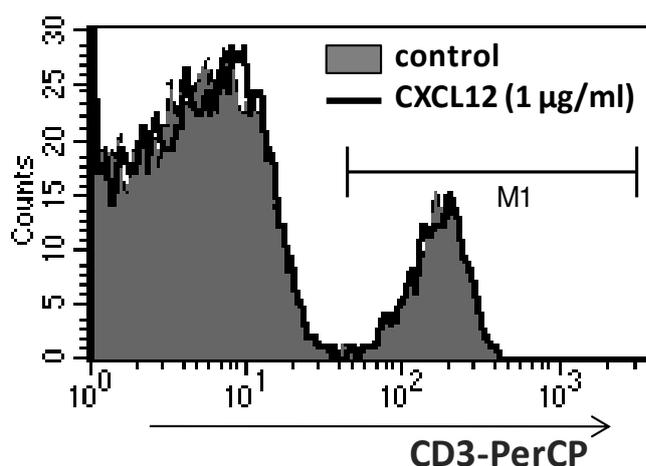


**Figura 22. Efecto dosis-dependiente del CXCL12 sobre la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC.** Se realizaron cultivos con células mononucleares totales de pacientes LLC en medio solo o en presencia de distintas concentraciones de CXCL12 (10, 100 y 1000 ng/ml) y luego se cultivaron sobre anti-CD3 o el correspondiente control de isotipo inmovilizado en placa. Luego de 24 horas se midió la expresión de CD25 y CD69 tal como se detalla en Materiales y Métodos. Las barras representan la media  $\pm$  ES para el aumento de expresión en el marcador de activación en los LT CD4<sup>+</sup> tratados con anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3, tomando como 100% la activación en ausencia de CXCL12. \*  $p < 0,05$  Wilcoxon signed rank test.



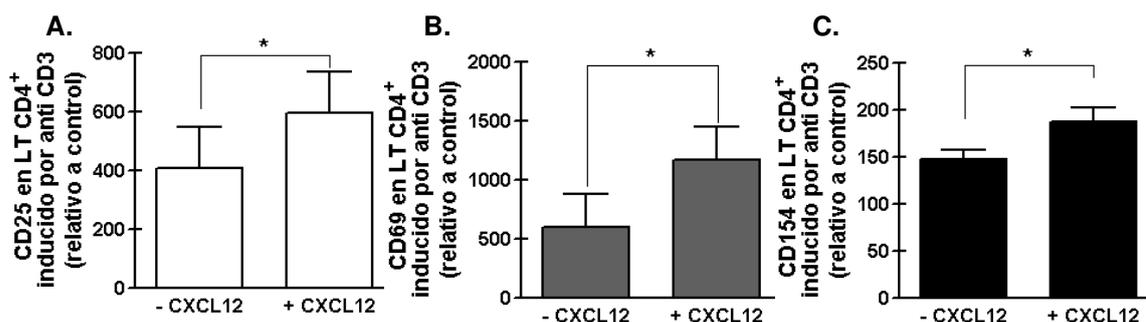
**Figura 23. El aumento inducido por el CXCL12 en la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados a través de su TCR es mediado por el CXCR4.** Las células mononucleares totales de 6 pacientes LLC se trataron con un anticuerpo bloqueante para CXCR4 (clon 12G5; 50  $\mu$ g/ml) o el correspondiente control de isotipo por 1 hora. Luego las células se trataron o no con CXCL12 (1  $\mu$ g/ml) y se sembraron sobre anti-CD3 (o el correspondiente control de isotipo) inmovilizado en placa. Al cabo de 24 horas se midió la expresión de CD25 y CD69 en los linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo tal se detalla en Materiales y Métodos. Las barras representan la media  $\pm$  ES para la media de intensidad de fluorescencia de los marcadores de activación sobre los LT CD4<sup>+</sup>. El pretratamiento con anti CXCR4 bloqueó por completo el efecto coestimulador del CXCL12. NS: estadísticamente no significativo; \*  $p < 0,05$  Wilcoxon signed rank test.

Teniendo en cuenta que las CMT son cultivadas por 2hs en presencia de CXCL12 y luego activadas con anti-CD3 existía la posibilidad de que la mayor activación de los linfocitos T en presencia de CXCL12 se debiera simplemente a que el tratamiento con la quimiocina aumentaba la expresión de CD3 en los linfocitos T, aumentando de esa forma, los sitios de unión del anticuerpo activador anti-CD3. Para evaluar esta posibilidad medimos por citometría de flujo la expresión de CD3 sobre los linfocitos T de pacientes con LLC tratados o no con CXCL12. En la **Figura 24** se muestra el histograma de expresión de CD3 sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tratados o no con CXCL12 de un paciente representativo y, tal como puede verse, el tratamiento con la quimiocina no modificó la expresión de CD3 sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.



**Figura 24.** El tratamiento con CXCL12 no modifica la expresión de CD3 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC. Se realizaron cultivos con células mononucleares totales de 10 pacientes LLC en presencia o ausencia de CXCL12 (1µg/ml) por 2 horas y luego se midió la expresión de CD3 sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo tal se detalla en la sección Materiales y Métodos. En la figura se muestra el histograma de expresión de CD3 de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de un experimento representativo.

Por último, quisimos evaluar si la coestimulación observada sobre los linfocitos T era dependiente de la presencia de otro tipo celular, para lo cual repetimos los experimentos de coestimulación antes mencionados con linfocitos T purificados. Como puede observarse en la **Figura 25** la coestimulación del CXCL12 sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se evidenció aún en ausencia de otro tipo celular en el cultivo, lo que sugiere que el CXCL12 estaría teniendo un efecto directo sobre el CXCR4 de los linfocitos T de los pacientes.

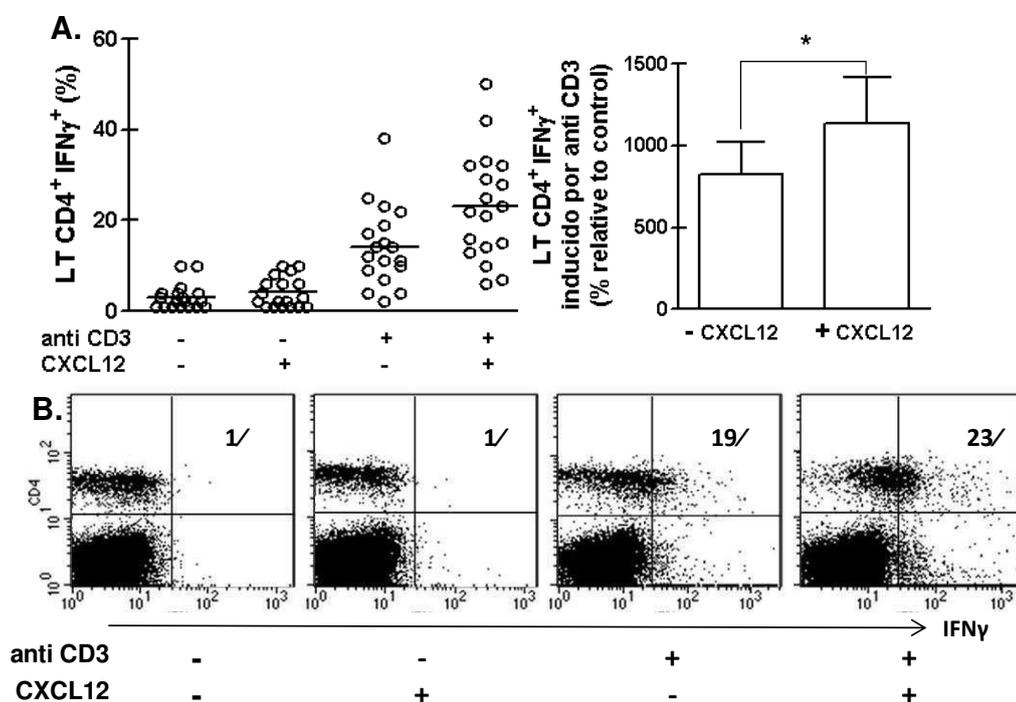


**Figura 25. Efecto coestimulador del CXCL12 sobre linfocitos T purificados (LTp) activados a través del TCR.** Se purificaron LT de 6 pacientes LLC tal como se detalla en Materiales y Métodos. Los LTp se cultivaron en medio solo o con CXCL12 (1µg/ml) y luego se sembraron sobre anti-CD3 o el correspondiente control de isotipo inmovilizado en placa. Al cabo de 24 horas se midió la expresión de CD25, CD69 y CD154 por citometría de flujo tal como se detalla en Materiales y Métodos. Las barras representan la media  $\pm$  ES para el aumento en la MIF de CD25 (A), CD69 (B) y CD154 (C) inducido por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3, en ausencia y presencia de CXCL12. \*  $p < 0,05$  Wilcoxon signed rank test.

## 2. El CXCL12 aumenta la expresión de IFN $\gamma$ en los linfocitos T de pacientes con LLC estimulados a través del TCR.

Tal como se mencionó en la introducción, las células leucémicas de los pacientes con LLC reciben en los órganos linfáticos señales del microambiente que favorecen su proliferación y supervivencia. Entre estas señales el IFN $\gamma$  parecería jugar un rol importante dado que las células leucémicas expresan altos niveles del receptor para IFN $\gamma$  y el tratamiento *in vitro* de células leucémicas con la citocina es capaz de inhibir la apoptosis espontánea e inducida por drogas<sup>102,130,131</sup>. Por este motivo decidimos estudiar la capacidad del CXCL12 de aumentar la expresión de IFN $\gamma$  inducida por la activación con anti-CD3. Para ello realizamos cultivos de CMT de pacientes con LLC en las cuatro condiciones mencionadas anteriormente por 24 horas. En las últimas 4 horas de cultivo se agregó Brefeldina A (10 µg/ml) para inhibir la secreción de IFN $\gamma$  y se midió la expresión intracitoplasmática de IFN $\gamma$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo. Tal como se muestra en la **Figura 26 A**, encontramos que el CXCL12 logró incrementar en forma significativa la producción de IFN $\gamma$  inducida por anti-CD3.

En la **Figura 26 B** se muestran los resultados de citometría de un paciente representativo.

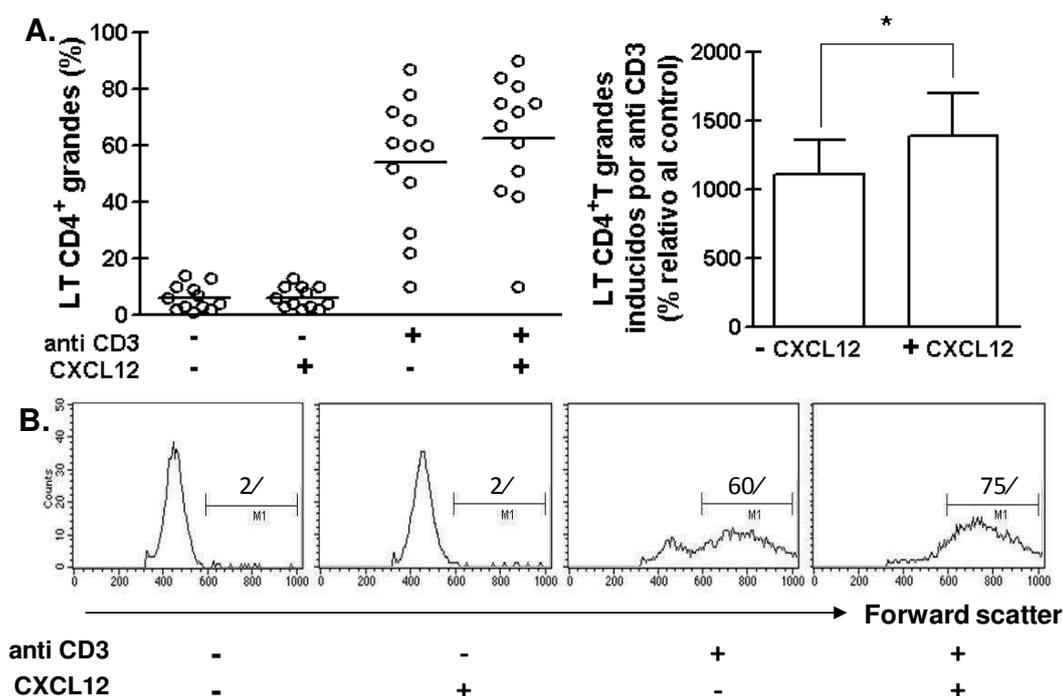


**Figura 26.** El CXCL12 aumenta la expresión de IFN $\gamma$  en los linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC activados a través del TCR. Se realizaron cultivos con células mononucleares totales de 18 pacientes con LLC en presencia o ausencia de CXCL12 (1 $\mu$ g/ml) por dos horas y luego fueron sembradas sobre anticuerpos específicos para CD3 (anti-CD3) o el correspondiente control de isotipo inmovilizados en placa por 24 horas. En las últimas 4 horas de cultivo se agregó Brefeldina A (10  $\mu$ g/ml) para luego evaluar la expresión intracitoplasmática de IFN $\gamma$  en los LT CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo. **A.** En el panel izquierdo se muestran los porcentajes de LT CD4<sup>+</sup> positivos para IFN $\gamma$  de cada paciente LLC. Luego se utilizaron los valores de cada paciente para calcular el porcentaje de aumento en la cantidad de LT CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> inducida por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3. En el panel de la derecha se muestra la media  $\pm$  ES para el aumento de LT CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> inducido por anti-CD3 en ausencia y en presencia de CXCL12. **B.** Se muestran los dot plots para la expresión de IFN $\gamma$  en los LT CD4<sup>+</sup> de un experimento representativo. \* p < 0,05 Wilcoxon signed rank test.

### 3. El CXCL12 aumenta el tamaño y la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LLC estimulados a través del TCR.

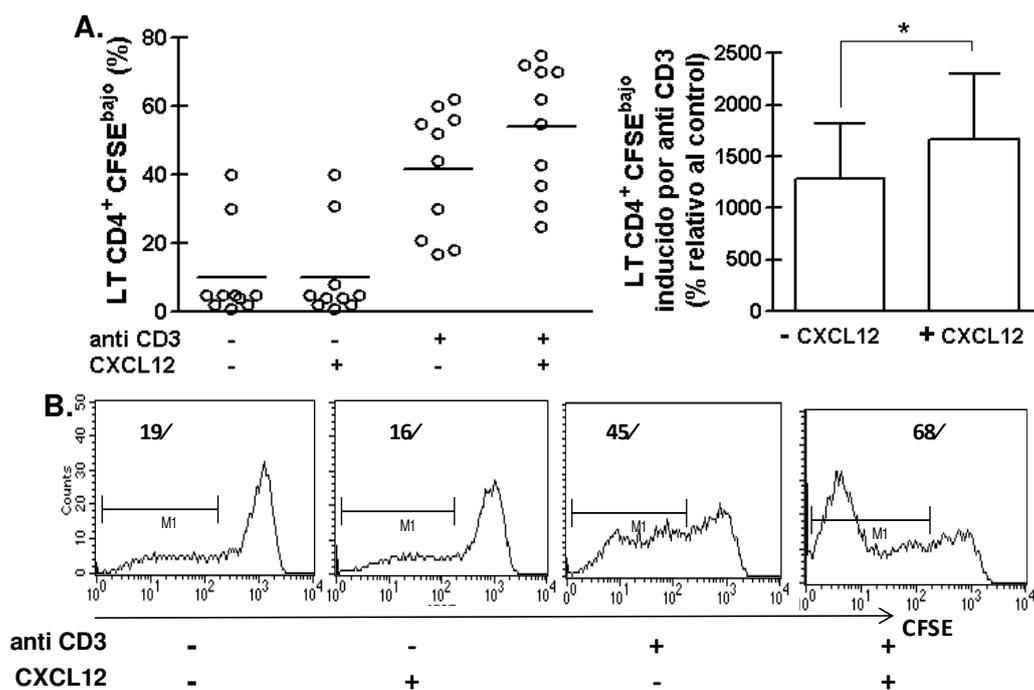
El aumento en el tamaño celular es característico de células en estado de activación. Es por esto que evaluamos el aumento del tamaño de los linfocitos T

CD4<sup>+</sup> al ser activados en presencia o ausencia de CXCL12. Realizamos cultivos de CMT de pacientes LLC tal como se describió anteriormente y al cabo de 5 días se evaluó el tamaño de la población de T CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo. Tal como esperábamos el aumento del tamaño celular inducido por anti-CD3 fue significativamente mayor en presencia de CXCL12 que en ausencia de la quimiocina (**Figura 27 A**). En la **Figura 27 B** se muestran los histogramas obtenidos de un paciente representativo.



**Figura 27.** El CXCL12 induce un aumento en el tamaño de los linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC activados a través del TCR. Se realizaron cultivos con células mononucleares totales de 12 pacientes con LLC en presencia o ausencia de CXCL12 (1µg/ml) por dos horas y luego fueron sembradas sobre anticuerpos específicos para CD3 (anti-CD3) o el correspondiente control de isotipo inmovilizados en placa. Luego de 5 días se evaluó el aumento en el tamaño de los LT CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo. **A.** En el panel izquierdo de la figura se muestran los valores de porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> con tamaño mayor a 600 en el grafico de forward scatter (✓ de LT CD4<sup>+</sup> grandes) obtenido por citometría de flujo de cada paciente. Luego se utilizaron los valores de cada paciente para calcular el aumento en el porcentaje de células grandes inducido por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3. En el panel derecho de la figura se muestra la media ± ES para el porcentaje de células grandes inducido por anti-CD3 en ausencia y presencia de CXCL12. **B.** Se muestran los histogramas para el parámetro de forward scatter (tamaño celular) de un experimento representativo. \* p < 0,05 Wilcoxon signed rank test.

Posteriormente quisimos evaluar si el CXCL12 también lograba tener un efecto coestimulador en la proliferación de los linfocitos T inducida por el entrecruzamiento del TCR/CD3. Para ello empleamos el método de dilución del colorante CFSE. El CFSE es una molécula que se une irreversible e inespecíficamente a las células viables y que puede ser detectada en el citómetro de flujo a través del canal FL1. Las células que sufran algún evento de división celular reparten la cantidad de colorante inicial resultado en una media de intensidad de fluorescencia (MIF) menor que aquellas que no sufrieron divisiones celulares. Entonces, luego de cultivar por 5 días a las CMT de los pacientes LLC marcadas con CFSE en presencia o ausencia de CXCL12 y activadas o no con anti-CD3, calculamos el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que presentaba una baja expresión de CFSE (CFSE<sup>bajo</sup>) dentro de la región de células viables. Tal como puede observarse en la **Figura 28** el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>bajo</sup> inducido por el cultivo con anti-CD3 fue significativamente mayor en presencia de CXCL12 que en ausencia de la quimiocina, demostrando que el CXCL12 logra coestimular la proliferación de los linfocitos T inducida por anti-CD3.

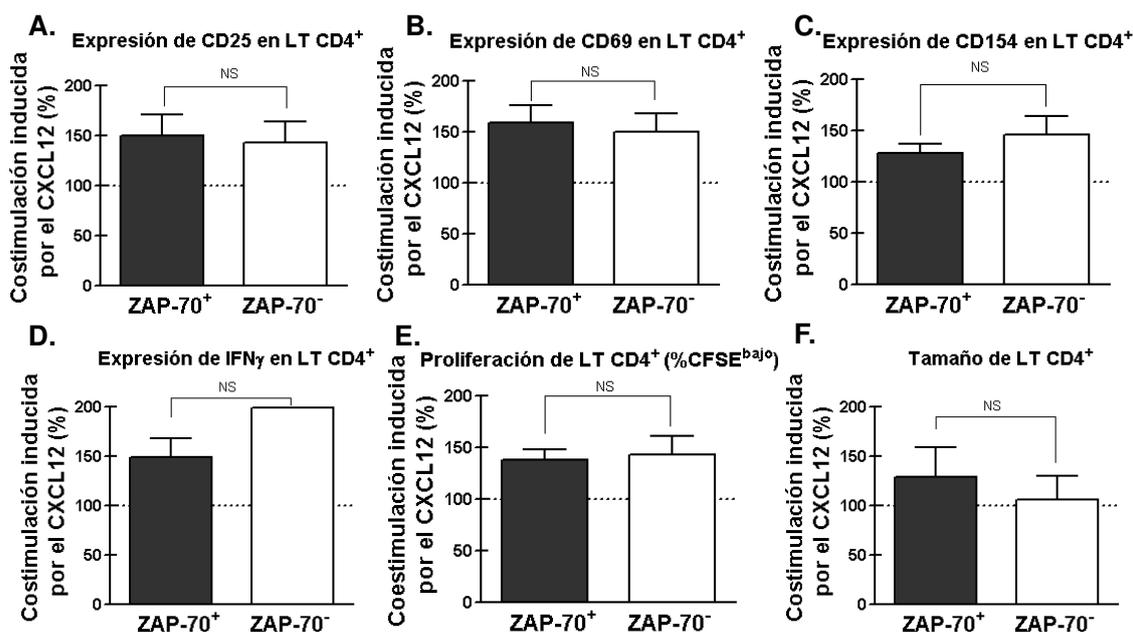


**Figura 28. El CXCL12 aumenta la proliferación de linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC activados a través del TCR.** Se realizaron cultivos con células mononucleares totales de 10 pacientes con LLC en presencia o ausencia de CXCL12 (1µg/ml) por dos horas y luego fueron sembradas sobre anticuerpos específicos para CD3 (anti-CD3) o el correspondiente control de isotipo inmovilizados en placa. Al cabo de 5 días de cultivo las células se marcaron con mAbs específicos para CD4 (PerCP) y se evaluó la proliferación de los LT CD4<sup>+</sup> tal como se detalla en Materiales y Métodos. **A.** Se muestran los valores de / de LT CD4<sup>+</sup> con bajos niveles de CFSE (LT CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>bajo</sup>) para cada paciente LLC. Luego Los valores obtenidos para cada paciente se utilizaron para calcular el porcentaje de aumento en LT CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>bajo</sup> inducido por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3. En el panel derecho se muestra la media ± ES para el porcentaje de aumento de LT CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>bajo</sup> inducido por anti-CD3 en ausencia y presencia de CXCL12. **B.** Se muestran histogramas de un experimento representativo. \* p < 0,05 Wilcoxon signed rank test.

**4. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup> activados en presencia de CXCL12 poseen similares niveles de coestimulación.**

Tal como mostramos en la sección anterior (Resultados Objetivo N°1) las células T provenientes de pacientes LLC ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup> difieren en su capacidad migratoria en respuesta al CXCL12. Por este motivo decidimos comparar la capacidad coestimuladora del CXCL12 sobre la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC segregados según la expresión del marcador pronóstico ZAP-

70. En la **Figura 29** puede observarse que los linfocitos T provenientes de ambos grupos de riesgo respondieron con niveles similares de coestimulación. Asimismo, cuando se comparó la coestimulación que induce el CXCL12 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes LLC y con la de los dadores sanos, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (resultados no mostrados).

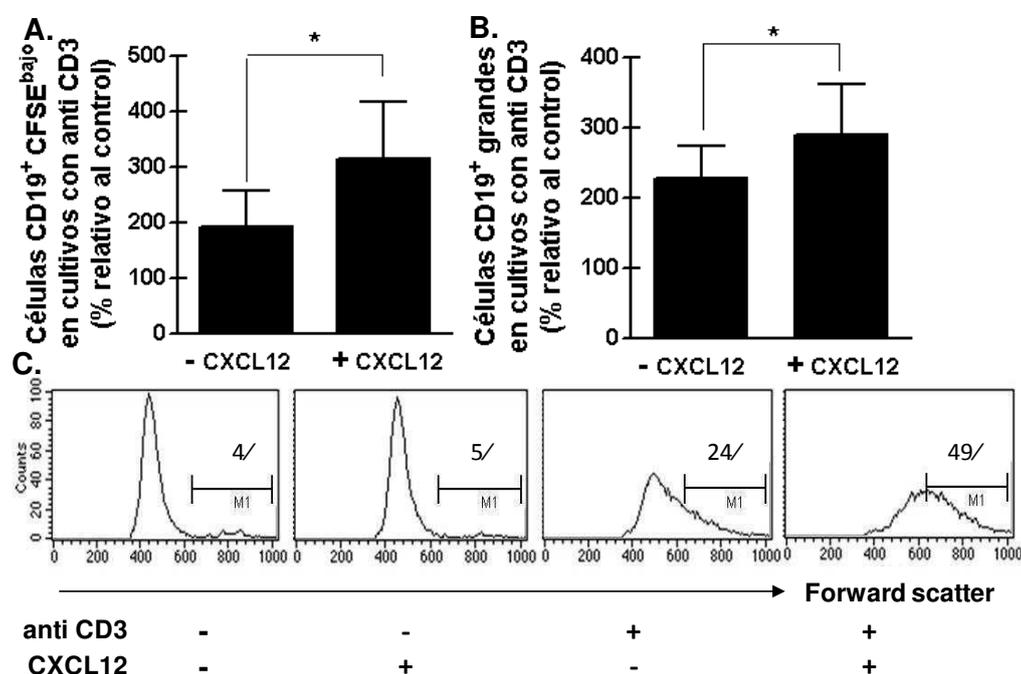


**Figura 29.** El CXCL12 induce niveles similares de coestimulación sobre linfocitos T CD4<sup>+</sup> provenientes de pacientes LLC ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup>. Se segregaron a los pacientes según la expresión del marcador de mal pronóstico ZAP-70 tal como se detalla en Materiales y Métodos. Los pacientes se consideraron ZAP-70 positivos (ZAP-70<sup>+</sup>) cuando un 20% o más de sus células leucémicas eran positivas para ZAP-70, y se consideraron ZAP-70 negativos (ZAP-70<sup>-</sup>) aquellos pacientes con un porcentaje menor a 20 de células leucémicas positivas para el marcador. Luego se calculó el porcentaje de coestimulación inducida por CXCL12 como el porcentaje de aumento en el parámetro de activación inducido por el anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3 en presencia de CXCL12, tomando como 100% la activación en ausencia de CXCL12. Las barras representan la media  $\pm$  ES de los porcentajes de coestimulación inducida por CXCL12 para la expresión de CD25 (A), CD69 (B), CD154 (C), IFN $\gamma$  (D), proliferación media con CFSE (E) y aumento de tamaño (F). NS: estadísticamente no significativo, Mann Whitney test.

**5. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de CXCL12 inducen una mayor activación y proliferación de las células leucémicas.**

Dado que los resultados que presentamos hasta este punto indican que el CXCL12 logra incrementar la proliferación y activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes LLC nos propusimos evaluar si esto repercutía en la activación y proliferación de las propias células leucémicas. En este sentido, existen reportes demostrando que tratamiento de células LLC *in vitro* con la molécula CD154 (CD40L) sintética o el cocultivo con linfocitos T autólogos activados, induce la proliferación del clon leucémico<sup>103,132</sup>. Estas evidencias experimentales, sumadas a la observación de que *in vivo* la activación y proliferación de los linfocitos T autólogos son claves para la proliferación de las LLC<sup>117</sup> nos alentaron a evaluar qué sucedía con las células leucémicas presentes en las muestras de CMT de los pacientes LLC que se cultivaban con o sin anti-CD3 y CXCL12. Para ello las CMT de los pacientes fueron marcadas con CFSE y luego cultivadas en las cuatro condiciones mencionadas anteriormente. Luego de 7 días de cultivo la proliferación de las células leucémicas se determinó analizando el porcentaje de linfocitos CD19<sup>+</sup> con CFSE<sup>bajo</sup>. Como puede observarse en la **Figura 30 A** el porcentaje de linfocitos CD19<sup>+</sup> CFSE<sup>bajo</sup> inducido por anti-CD3 fue significativamente mayor cuando en el cultivo se encontraba la quimiocina CXCL12 que en su ausencia. Asimismo, al evaluar el tamaño de los linfocitos CD19<sup>+</sup> por citometría de flujo, como medida de su activación, encontramos un mayor porcentaje de linfocitos CD19<sup>+</sup> con tamaño grande en los cultivos con anti-CD3 en presencia de CXCL12 en comparación a los cultivos ausencia de la quimiocina (**Figura 30 B**). En la **Figura 30 C** se muestran histogramas de un paciente representativo. Con el objeto de confirmar que la población de linfocitos CD19<sup>+</sup> activados/proliferante pertenecían al clon leucémico y no al ínfimo porcentaje de linfocitos B normales que acompañan a las LLC, evaluamos la expresión de las cadenas livianas kappa y lambda de dichas células por citometría de flujo. En todos los casos evaluados la totalidad de la población

CD19<sup>+</sup> proliferante expresaba la misma cadena liviana del clon leucémico (resultados no mostrados).



**Figura 30. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de CXCL12 inducen la activación y proliferación de células leucémicas. A.** Se realizaron cultivos con células mononucleares totales de 11 pacientes con LLC en presencia o ausencia de CXCL12 (1µg/ml) por dos horas y luego fueron sembradas sobre anticuerpos específicos para CD3 (anti-CD3) o el correspondiente control de isotipo inmovilizados en placa. Al cabo de 7 días se evaluó la proliferación de la población CD19<sup>+</sup> por citometría de flujo tal como se detalla en Materiales y Métodos. Las barras representan la media ± ES para el aumento en el porcentaje de linfocitos CD19<sup>+</sup> CFSE<sup>bajo</sup> en los cultivos activados con anti-CD3 relativo al control sin activar, en ausencia y presencia de CXCL12. \* p<0,05 Wilcoxon signed rank test. **B.** Se evaluó por citometría de flujo el aumento en el tamaño celular de los linfocitos CD19<sup>+</sup> en los cultivos activados o no con anti-CD3 en presencia o ausencia de CXCL12. Las barras representan la media ± ES para el aumento en el porcentaje de linfocitos CD19<sup>+</sup> con valores de forward scatter mayores a 600 en los cultivos activados con anti-CD3 relativo a los cultivos sin anti-CD3. **C.** Se muestran los histogramas para el parámetro de forward scatter (tamaño celular) de un experimento representativo. \* p<0,05 Wilcoxon signed rank test.

Los resultados presentados en esta segunda parte demuestran que el CXCL12 es capaz de incrementar los marcadores de activación CD25, CD69 y CD154, la secreción de IFN $\gamma$  y la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de

*RESULTADOS Objetivo N°2*

---

pacientes con LLC, y que esa mayor activación favorece la activación y proliferación del clon leucémico.

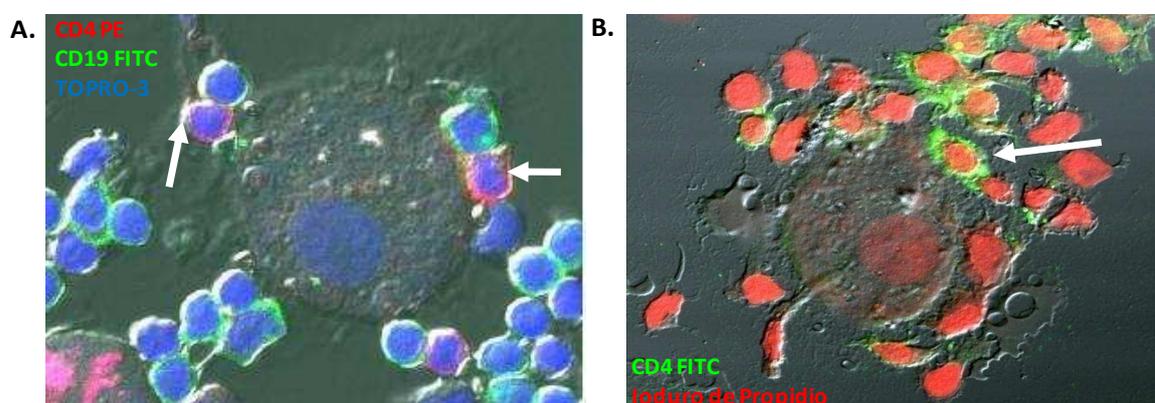
## RESULTADOS OBJETIVO N°3

1. Las células de tipo nodriza (NLC) diferenciadas *in vitro* contactan con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes con LLC e inducen la endocitosis del receptor para CXCL12.

En este último objetivo, quisimos evaluar si las células de tipo nodriza o *Nurse like cells* (NLC) de los pacientes LLC, que son una fuente fisiológica de CXCL12, son capaces de incrementar la activación y proliferación de los linfocitos T. Las NLC son células de estirpe mieloide que se encuentran en los órganos linfáticos de los pacientes con LLC<sup>133</sup> y pueden ser diferenciadas *in vitro* a partir de células mononucleares totales (CMT) de pacientes con LLC<sup>110</sup>. Las NLC producen, entre otros factores, altas cantidades de CXCL12, el cual promueve no solo la migración de las células leucémicas sino también actúa como un factor de supervivencia, inhibiendo la apoptosis espontánea e inducida por drogas del clon leucémico<sup>110</sup>. Si bien numerosos trabajos reportan que las NLC diferenciadas *in vitro* contactan con linfocitos B leucémicos, no hay información en la literatura que mencione la interacción de estas células con los linfocitos T de los pacientes con LLC, a pesar de lo cual es sabido que ambos tipos celulares conviven en los centros proliferantes de los órganos linfoides<sup>133</sup>.

Primeramente quisimos confirmar que los linfocitos T de los pacientes LLC logran interactuar con las NLC. Para ello realizamos la diferenciación *in vitro* de estas células a partir de cultivos de CMT de pacientes con LLC. Tal como esperábamos, luego de 14 días de cultivo se observan células con el fenotipo característico de las NLC: células grandes, adherentes, redondeadas y rodeadas de linfocitos. Posteriormente, una vez diferenciadas las NLC las células no adherentes fueron removidas de esos cultivos, se descongelaron CMT provenientes del mismo paciente y se cultivaron sobre las NLC autólogas. Tal como se muestra en la **Figura 31**, luego de 24hs de cultivo observamos que las

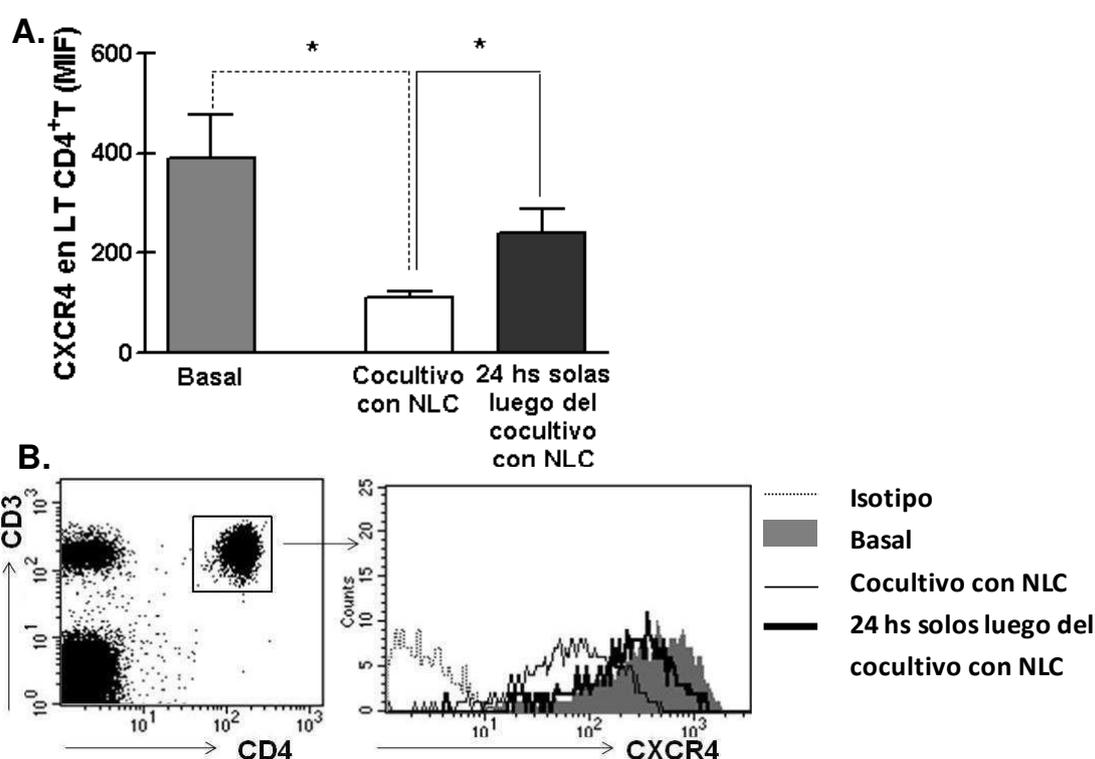
NLC se rodeaban no sólo de linfocitos CD19<sup>+</sup> sino que también los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (flechas blancas) interaccionaban con ellas.



**Figura 31. Células de tipo nodriza (NLC) diferenciadas in vitro a partir de células mononucleares totales (CMT) de pacientes con LLC contactan con linfocitos T CD4<sup>+</sup> autólogos.** Se diferenciaron NLC a partir del cultivo de CMT de pacientes con LLC tal como se detalla en Materiales y Métodos. Luego se cultivaron por 24 horas con CMT autólogas, se fijaron, se marcaron con anticuerpos específicos para su análisis por microscopía confocal. **A.** Se utilizaron anticuerpos específicos para CD19 conjugados a FITC y para CD4 conjugado a PE (clon SK3), los núcleos se evidenciaron con TOPRO-3. **B.** Se utilizaron anticuerpos anti CD4 FITC (clon RPA-T4) y los núcleos se tiñeron con Ioduro de Propidio (IP). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal FluoView FV1000 con un objetivo 60 X 1.42 NA de inmersión en aceite, las imágenes fueron analizadas utilizando el software de Olympus FV10-ASW. Las flechas blancas muestran LT CD4<sup>+</sup> en contacto con las NLC.

Dado que las células NLC producen altas cantidades de CXCL12<sup>110</sup>, decimos evaluar si el contacto con NLC inducía la normal internalización del CXCR4 en la superficie de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La expresión del mismo se evaluó mediante citometría de flujo sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en tres condiciones diferentes. Por un lado determinamos la expresión basal de CXCR4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> luego de la obtención de las CMT. Por otro lado, cultivamos las CMT 14 días en medio completo y una vez obtenidas las NLC, se recolectaron las células no adherentes, se lavaron y se volvieron a cultivar sobre las NLC (cocultivo con NLC) o en medio completo solas (24 horas solas luego del cocultivo con NLC). Posteriormente medimos la expresión de CXCR4 por citometría de flujo sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentes en las CMT. La **Figura 32** muestra la expresión de

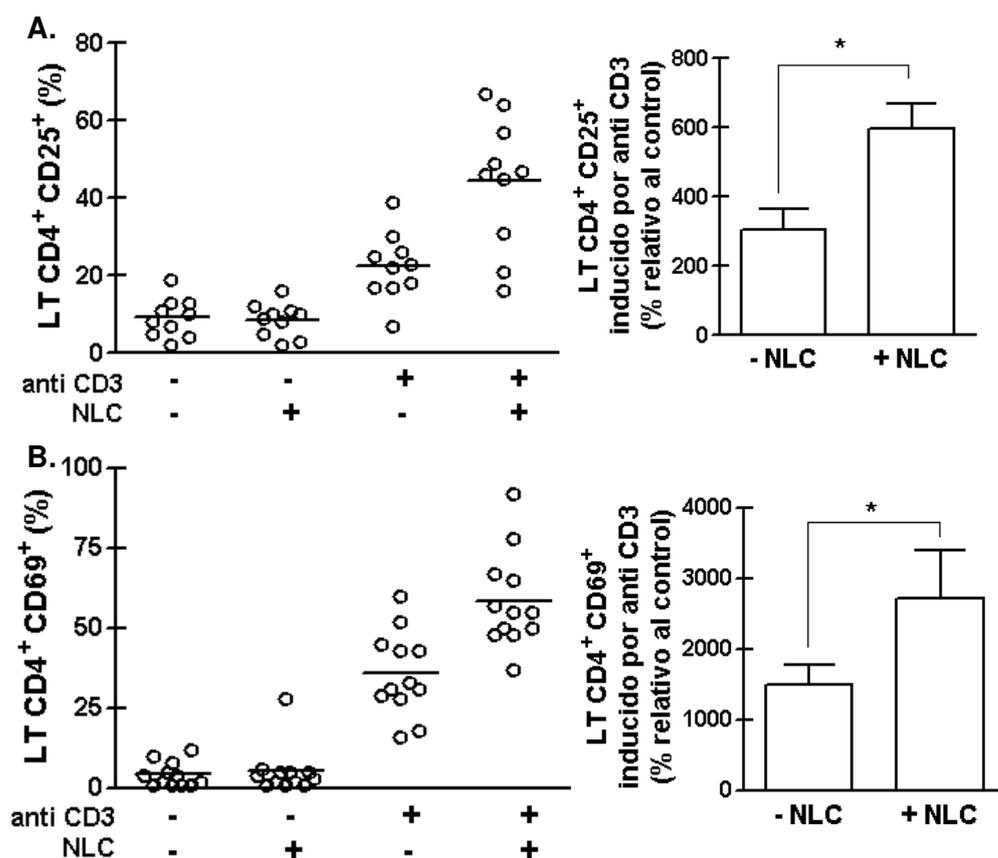
CXCR4 (MIF) sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en las tres condiciones mencionadas (basal, cocultivo con NLC, y 24 horas solas luego del cocultivo con NLC) y, tal como esperábamos, el cultivo con NLC indujo una disminución en la media de intensidad de fluorescencia del CXCR4 con respecto al basal. Por otro lado los linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron separadas del cocultivo con NLC y cultivados en medio completo por 24 horas mostraron una recuperación parcial en la expresión CXCR4. En conjunto, estos resultados demuestran que las NLC contactan con los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes LLC y e inducen la endocitosis del CXCR4.



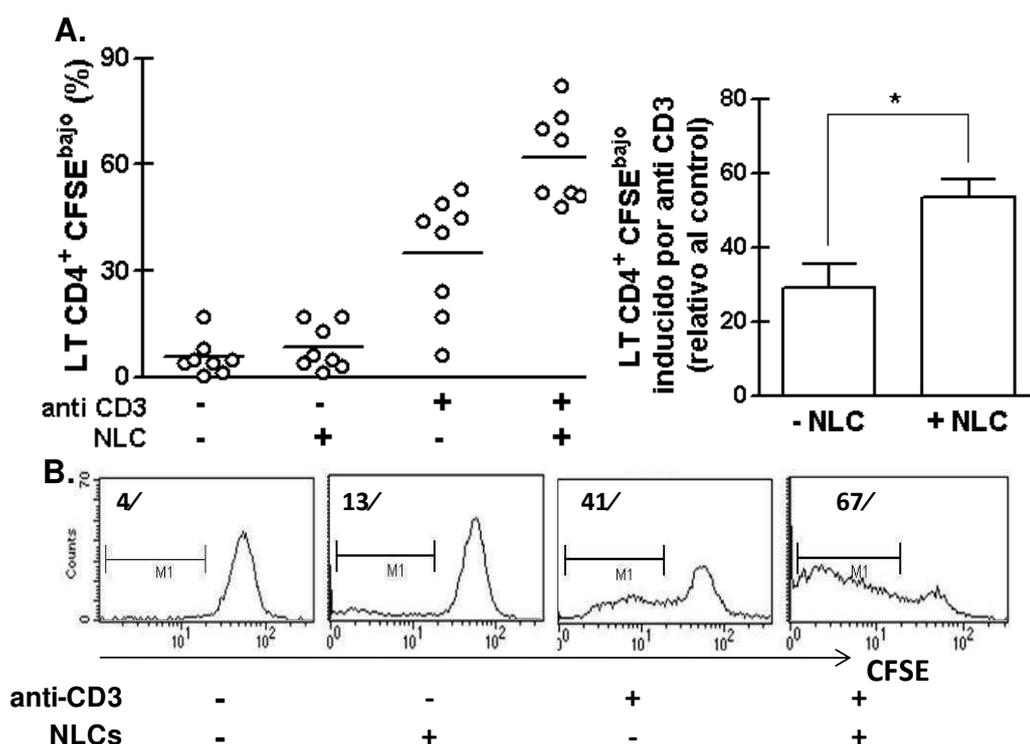
**Figura 32. Modulación de la expresión del CXCR4 en los linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup> por el cocultivo con NLC autólogas.** Se evaluó la expresión de CXCR4 sobre LT CD4<sup>+</sup> de muestras de células mononucleares totales (CMT) recién purificadas (basal) por citometría de flujo tal como se detalla en Materiales y Métodos. Luego las CMT se cultivaron por 14 días en medio completo para la obtención de NLC. Una vez diferenciadas las NLC, las células no adherentes se recolectaron, se lavaron y se sembraron nuevamente sobre las NLC (cocultivo con NLC) o en medio solas (24 horas solas luego del cocultivo con NLC). Al cabo de 24 horas de cultivo se analizó nuevamente la expresión de CXCR4 por citometría de flujo sobre los LT CD4<sup>+</sup>. **A.** Las barras representan la media  $\pm$  ES para la MIF de CXCR4 sobre los LT CD4<sup>+</sup> de 6 pacientes con LLC. **B.** se muestran histogramas para la expresión de CXCR4 de un experimento representativo. \*  $p < 0,05$  Mann Whitney test.

**2. Las células de tipo nodriza (NLC) incrementan la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> autólogos estimulados a través del TCR.**

Una vez que probamos que el contacto con NLC lograba inducir la endocitosis del receptor para CXCL12 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, decidimos evaluar si el co-cultivo con NLC era capaz de incrementar la activación de estas células inducida por el anti-CD3. Para ello, se diferenciaron NLC tal como describimos anteriormente, luego se descongelaron CMT de pacientes con LLC y se cultivaron sobre NLC autólogas o solas y se activaron o no con partículas de poliestireno cubiertas con anticuerpos anti-CD3 (o el correspondiente control de isotipo). Luego de 24 horas de cultivo evaluamos la expresión de CD25 y CD69 sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Tal como puede observarse encontramos que la proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> positivos para la expresión de los marcadores de activación CD25 (**Figura 33 A**) y CD69 (**Figura 33 B**) inducida por anti-CD3 fue significativamente mayor en presencia de las NLC que en ausencia de estas. Obtuvimos resultados similares al analizar la media de intensidad de fluorescencia en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> positivos para CD25 y CD69 (resultados no mostrados). Por otro lado evaluamos la capacidad de las NLC de aumentar la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> inducida por el anti-CD3 empleando el colorante CFSE y, tal como se muestra en la **Figura 34 A**, las NLC lograron coestimular en forma significativa la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En la **Figura 34 B** se muestran los histogramas de expresión de CFSE para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de un paciente representativo.



**Figura 33.** Las células de tipo nodriza (NLC) incrementan la expresión de CD25 y CD69 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> autólogos estimulados a través del TCR. Las células mononucleares totales de pacientes LLC se sembraron sobre NLC autólogas o solas y se trataron con partículas de poliestireno cubiertas con anti-CD3 o el correspondiente control de isotipo. Luego de 24 horas de cultivo se evaluó la expresión de CD25 y CD69 por citometría de flujo tal como se detalla en Materiales y Métodos. En los paneles izquierdo se muestran los valores de LT CD4<sup>+</sup> positivos para los marcadores CD25 (A) y CD69 (B) de cada paciente LLC. Luego los valores obtenidos para cada paciente se utilizaron para calcular el porcentaje de aumento en la expresión de los marcadores de activación inducido por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3. Las barras representan la media  $\pm$  ES para el aumento en los marcadores de activación inducido por anti-CD3 en ausencia o presencia de NLC. \*  $p < 0,05$  Wilcoxon signed rank test.

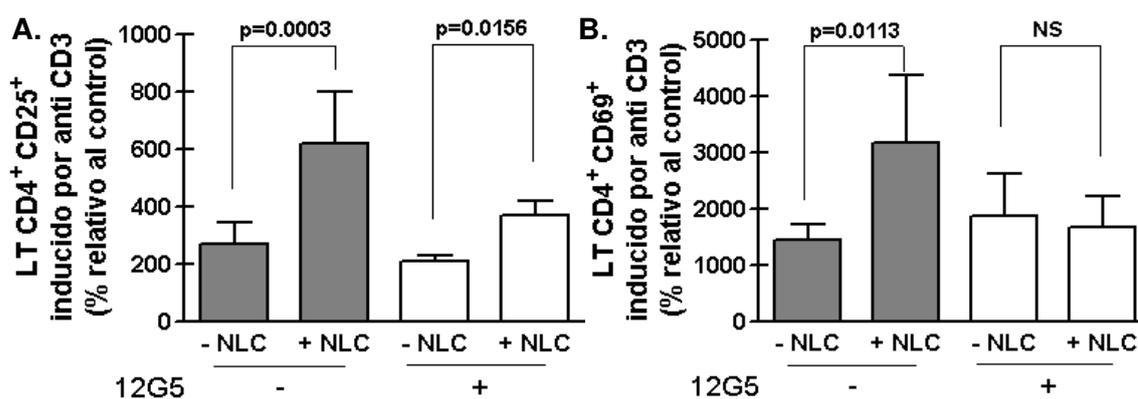


**Figura 34.** Las células de tipo nodriza (NLC) incrementan la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> autólogos estimulados a través del TCR. Se sembraron células mononucleares totales de pacientes LLC marcadas con CFSE sobre NLC autólogas o solas y se trataron con partículas de poliestireno cubiertas con anti CD3 o el correspondiente control de isotipo. Luego de 5 días de cultivo se evaluó la proliferación de los LT CD4<sup>+</sup> por citometría de flujo tal como se detalla en Materiales y Métodos. **A.** En el panel izquierdo se muestran los valores de porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>bajo</sup> de cada paciente LLC. Luego los valores obtenidos para cada paciente se utilizaron para calcular el porcentaje de aumento en el porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>bajo</sup> inducido por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3 (panel de la derecha). Las barras representan la media ± ES para el aumento en el porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>bajo</sup> inducido por anti CD3 en ausencia o presencia de NLC. \* p<0,05 Wilcoxon signed rank test. **B.** Se muestran los histogramas obtenidos con un paciente representativo.

### 3. La coestimulación inducida por las NLC sobre la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> es en parte mediada por el CXCR4.

Para determinar si el CXCL12 producido por las NLC estaba involucrado en la coestimulación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> utilizamos un anticuerpo bloqueante para CXCR4 (clon 12G5). En estos experimentos, las CMT de pacientes con LLC fueron incubadas previamente con el anticuerpo bloqueante 12G5 y luego

fueron cultivadas en presencia o ausencia de NLC y tratadas con microesferas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 (o el correspondiente control de isotipo). Luego de 24 horas se evaluó la expresión de CD25 y CD69 sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante citometría de flujo. Tal como se muestra en la **Figura 35**, encontramos que la coestimulación inducida por las NLC disminuyó significativamente al bloquear el receptor para CXCL12 de los linfocitos T.



**Figura 35. La coestimulación inducida por las NLC es en parte mediada por el receptor para el CXCL12, el CXCR4.** Las células mononucleares totales de pacientes con LLC se pretrataron con un anticuerpo bloqueante para CXCR4 (clon 12G5) o el correspondiente control de isotipo por 1 hora, luego se sembraron sobre NLC autólogas o solas y se trataron con partículas de poliestireno cubiertas con anti-CD3 o el correspondiente control de isotipo. Luego de 24 horas de cultivo se evaluó la expresión de CD25 y CD69 por citometría de flujo tal como se detalla en Materiales y Métodos. Los valores de LT CD4<sup>+</sup> positivos para cada marcador de activación de cada paciente se utilizaron para calcular el porcentaje de aumento en la expresión de los marcadores de activación inducido por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3. Las barras representan la media  $\pm$  ES para el aumento en los marcadores de activación inducido por anti-CD3 en ausencia o presencia de NLC. NS: estadísticamente no significativo; \*  $p < 0,05$  Wilcoxon signed rank test.

En conjunto, los resultados presentados en esta tercera parte, demuestran que las NLC de los pacientes LLC logran incrementar la activación y proliferación de los linfocitos T autólogos parcialmente a través del CXCR4 de los linfocitos T.

## DISCUSIÓN

---

### DISCUSIÓN

La visión tradicional de la LLC posicionaba a la célula leucémica como un linfocito inerte que se acumulaba lentamente en periferia y que rara vez se dividía. Sin embargo, hoy en día se considera a la LLC como una enfermedad dinámica, donde el compartimento de células leucémicas en sangre periférica crece paulatinamente gracias al aporte de linfocitos que proliferan en los centros proliferantes presentes en los órganos linfoides. Una de las evidencias claves en la que se sustenta esta nueva visión de la enfermedad corresponde a los resultados obtenidos por el grupo del Dr. Chiorazzi en un meticuloso trabajo donde evaluaron *in vivo* en pacientes con LLC la división celular y encontraron una tasa de proliferación no despreciable en las células leucémicas de todos los pacientes LLC estudiados, la cual era mayor en los pacientes progresores en comparación con aquellos que padecían una enfermedad estable <sup>134</sup>. La expansión del clon leucémico en los centros proliferantes, se da gracias a las señales de supervivencia y proliferación que brinda el microambiente tumoral de la médula ósea, los ganglios linfáticos y otros órganos linfáticos secundarios. Nuestro interés se centró en el CXCL12, una quimiocina clave para la patogénesis y progresión de la LLC. Numerosos trabajos demostraron su papel protagónico, junto con otras quimiocinas, en el reclutamiento de las células LLC a los órganos linfoides <sup>87,108,135</sup> además de su capacidad para incrementar la supervivencia del clon leucémico <sup>108,110</sup>. Sin embargo, no había sido explorado aún el impacto que podría tener dicha quimiocina sobre la fisiología de los linfocitos T de los pacientes con LLC. Cuando evaluamos la capacidad migratoria de estas células al CXCL12 en ensayos de quimotaxis *in vitro*, encontramos que los linfocitos T de los pacientes con LLC fueron capaces de migrar en forma dosis dependiente a la quimiocina. Comprobamos también que esta migración era mediada por el principal receptor para CXCL12, el CXCR4, dado que al pre-tratar a los linfocitos T con el compuesto AMD3100, un inhibidor específico de dicho receptor, se impedía la migración en respuesta al CXCL12. Al comparar la

respuesta migratoria de los linfocitos T de los pacientes con LLC con los de dadores sanos encontramos que los primeros mostraron en forma muy consistente una menor capacidad de respuesta hacia dicha quimiocina. Llamativamente, a pesar de estas diferencias en la respuesta migratoria, los linfocitos T de los pacientes LLC y los dadores sanos expresan niveles comparables de CXCR4. Ésta no sería la primera vez en que se reporta una falta de correlación entre la expresión y funcionalidad de este receptor. En este sentido, se ha observado que los linfocitos B que se desarrollan en la médula ósea muestran una expresión alta del CXCR4 en el estadio pre-B, la cual disminuye en el estadio B inmaduro y vuelve a aumentar al alcanzar el estadio B maduro, a pesar de lo cual el CXCL12 sólo induce una vigorosa respuesta en los estadios tempranos de diferenciación <sup>136</sup>. Asimismo, se ha reportado que los linfocitos B logran responder a la quimiocina CCL20 únicamente luego de inducida la activación celular, a pesar de que la expresión de su receptor no se modifica <sup>137</sup> e inclusive las células dendríticas maduras expresando el receptor CCR7 sólo logran una buena respuesta migratoria a sus ligandos luego de exponerse a la prostaglandina E2 <sup>138</sup>.

También evaluamos en los linfocitos T la expresión del receptor CXCR7, otro receptor del CXCL12 descrito recientemente <sup>19</sup>. La consecuencia de la unión del CXCL12 al CXCR7 es aún motivo de controversia. Mientras que algunos lo postulan como un receptor “*decoy*” o “*secuestrador*” que inhibiría las funciones mediadas por el CXCR4 <sup>20,139</sup>, otros proponen una función colaborativa entre ambos receptores <sup>21</sup>. Evaluamos entonces, la expresión del CXCR7 por citometría de flujo en los linfocitos T de pacientes LLC y de dadores sanos. Realizamos no sólo la marcación del CXCR7 en la superficie celular, sino que también permeabilizamos la membrana de las células para evaluar el contenido intracelular de CXCR7 (resultados no mostrados), ya que ha sido descrito que este receptor puede almacenarse dentro de la célula en ausencia de su ligando <sup>128</sup>. Sin embargo la expresión de CXCR7 fue similar en los linfocitos

T de pacientes LLC y dadores sanos, demostrando que la expresión del mismo no se asocia con la diferente capacidad de migración *in vitro* al CXCL12. Nuestros resultados sugieren que la menor migración de los linfocitos T de los pacientes LLC podría explicarse por los defectos en la capacidad de reorganización del citoesqueleto que mostraron en respuesta al CXCL12. Estas observaciones concuerdan con aquellas obtenidas por el grupo del Dr. Gribben, que demostró que los linfocitos T de los pacientes LLC que contactan con células presentadoras de antígeno, muestran una defectuosa polimerización de actina

114 .

Al segregar a los pacientes LLC en base a la expresión de ZAP-70 en sus células leucémicas, encontramos que los linfocitos T de los pacientes de buen pronóstico (ZAP-70<sup>-</sup>) mostraron un marcado defecto en la migración hacia CXCL12 en comparación a los pacientes de mal pronóstico (ZAP-70<sup>+</sup>). Por otro lado, el grupo del Dr. Roth ha reportado recientemente que la longitud de los telómeros de los linfocitos T de pacientes ZAP-70<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> es significativamente menor a la de aquellos pacientes ZAP-70<sup>-</sup> CD38<sup>-</sup>, lo que sugiere una mayor expansión clonal de los primeros (50). En su conjunto, nuestros resultados y aquellos obtenidos por el Dr. Roth demuestran que los linfocitos T que acompañan a las LLC de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup> son claramente diferentes.

La diferente capacidad de migración inducida a través de CXCR4 que presentan los linfocitos T de pacientes ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup> no se relacionó con una expresión diferente del receptor en ambos grupos de riesgo. Sorprendentemente encontramos que los linfocitos T puros provenientes de pacientes LLC ZAP-70<sup>-</sup>, pero no de los ZAP-70<sup>+</sup>, mostraban una mayor migración al ser cultivados solos por 48hs que al ser cultivados en presencia de LLC autólogas purificadas. Nuestras observaciones sugieren que en los pacientes ZAP-70<sup>-</sup>, la migración de los linfocitos T en respuesta al CXCL12 está afectada

por señales brindadas por el propio clon leucémico y que los linfocitos T necesitan un tiempo en el cultivo para “liberarse” del efecto inhibitor de las LLC. Si bien otros autores ya han reportado que las células leucémicas de los pacientes LLC pueden inducir fallas funcionales en los linfocitos T<sup>114,115</sup>, esta es la primera vez en que se reportan diferencias entre los grupos de buen y mal pronóstico. Hasta el presente no sabemos exactamente de qué forma el clon leucémico logra inhibir la migración de los linfocitos T hacia el CXCL12, sin embargo comprobamos que éste no induce en los linfocitos T una menor expresión de CXCR4, ZAP-70, CD38, CD3 y CD45 o fallas en la polimerización de actina y en la normal inhibición del receptor luego del contacto con su ligando. Es posible que las moléculas que participan en la transducción de señales a través del CXCR4, tales como las MAPK ERK1/2, p38 y Akt se fosforilen menos, o en forma menos sostenida, en los linfocitos T del grupo de pacientes ZAP-70<sup>-</sup> en comparación a los ZAP-70<sup>+</sup>. En relación a este punto, ya ha sido demostrado que las células leucémicas de los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> muestran una mayor capacidad de respuesta al CXCL12 en comparación a los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> a consecuencia de una fosforilación más sostenida de las MAPK ERK1/2<sup>87</sup>. Resta determinar si esto ocurre también en los linfocitos T de los pacientes.

Cuando evaluamos otros aspectos de la fisiología de los linfocitos T de los pacientes que pudieran ser modulados por el CXCL12, observamos que la quimiocina fue capaz de aumentar la expresión de los marcadores de activación CD25, CD69 y CD154, la producción de la citoquina anti-apoptótica IFN $\gamma$  y la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes LLC inducida a través del TCR/CD3. A diferencia de lo que ocurre en la respuesta migratoria al CXCL12, el efecto coestimulador fue similar en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> provenientes de pacientes LLC y de dadores normales, así como también entre los pacientes LLC ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup>. Estas observaciones sugieren que las vías transduccionales a través del CXCR4 involucradas en la respuesta migratoria de los linfocitos T de

## DISCUSIÓN

---

los pacientes LLC deben ser diferentes a las que participan en el fenómeno de coestimulación que aquí describimos.

Dado que en nuestro diseño experimental para evaluar la coestimulación inducida por el CXCL12 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, las células de los pacientes se cultivan primeramente con la quimiocina por dos horas y luego se activan a través del TCR/CD3 empleando anticuerpos específicos para CD3, la coestimulación inducida por el CXCL12 podría explicarse por un aumento en la expresión de moléculas de CD3 en la superficie de los linfocitos T. Sin embargo, este no es el caso, ya que hemos probado que luego de las dos horas iniciales de cultivo con la quimiocina, la expresión de la molécula CD3 no se modifica en absoluto. Asimismo, demostramos que el fenómeno de coestimulación mediado por el CXCL12 involucra a su principal receptor el CXCR4 ya que la coestimulación se inhibió sustancialmente al pre-incubar a los linfocitos T con el anticuerpo bloqueante anti-CXCR4.

Existen numerosas evidencias obtenidas *in vitro* e *in vivo* que demuestran la importancia de la activación y proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes LLC para permitir el crecimiento y supervivencia del clon leucémico<sup>104,117,140</sup>. Fue por ello que nos interesó evaluar el estado de activación y proliferación de las células LLC que contactan con los linfocitos T de los pacientes activados en presencia o ausencia del CXCL12. Nos resultó sumamente alentador observar que la proliferación y activación de las células del clon leucémico se incrementaba cuando se encontraban junto con los linfocitos T autólogos activados en presencia del CXCL12. Una posible explicación a estos resultados es que la mayor activación de las células leucémicas se deba a que contactan con linfocitos T más activados (por el CXCL12). Sin embargo, también es posible que la presencia de linfocitos T activados y la interacción del CXCL12 con el receptor CXCR4 del propio clon leucémico sea lo que incrementa aún más la activación y proliferación de las

## DISCUSIÓN

---

LLC. Independientemente de lo que esté sucediendo, es importante resaltar que los linfocitos T activados y la quimiocina CXCL12 (actuando únicamente como coestimulador de los linfocitos T o sobre las LLC) favorecen el crecimiento de las células leucémicas de los pacientes LLC.

Nuestro interés se centró en evaluar la capacidad coestimuladora del CXCL12 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> debido a que existen numerosas evidencias *in vitro* e *in vivo* que demuestran que es ésta la población de linfocitos T que favorece la expansión del clon leucémico<sup>117,132</sup>. El rol de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la patogénesis de la LLC es bastante más controvertido. En este sentido, hay trabajos donde proponen que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> podría tener efectos citotóxicos sobre las células LLC<sup>141,142</sup>, otros trabajos postulan que son débilmente citotóxicos debido a defectos inducidos por el clon leucémico que inhiben la formación de la sinapsis inmunológica y la expresión de proteínas que son necesarias para su función efectora<sup>114,115</sup>, mientras que un trabajo publicado recientemente muestra que la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes con LLC, y no de dadores sanos, es capaz de aumentar la sobrevivencia *in vitro* del clon leucémico<sup>143</sup>. Cuando nosotros evaluamos el efecto coestimulador sobre la población T CD8<sup>+</sup> con muestras de 7 pacientes LLC observamos que el CXCL12 fue capaz de aumentar la expresión de CD25 y CD69 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes LLC activados a través del TCR ( $p < 0,05$ ), mientras que solo indujo un leve aumento en la producción de IFN $\gamma$  ( $p = 0,0489$ ) y no tuvo efecto en la proliferación ( $p = 0,2072$ ) durante la activación de los linfocitos T. Estos resultados sugieren que el CXCL12 también podría estar teniendo algún efecto sobre la fisiología de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los pacientes con LLC y en nuestros experimentos, su activación junto con la de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de las muestras favorece la expansión del clon leucémico.

En los pacientes LLC, las principales productoras de CXCL12 *in vivo* son las células estromales y las NLC. En este sentido, ha sido demostrado que los

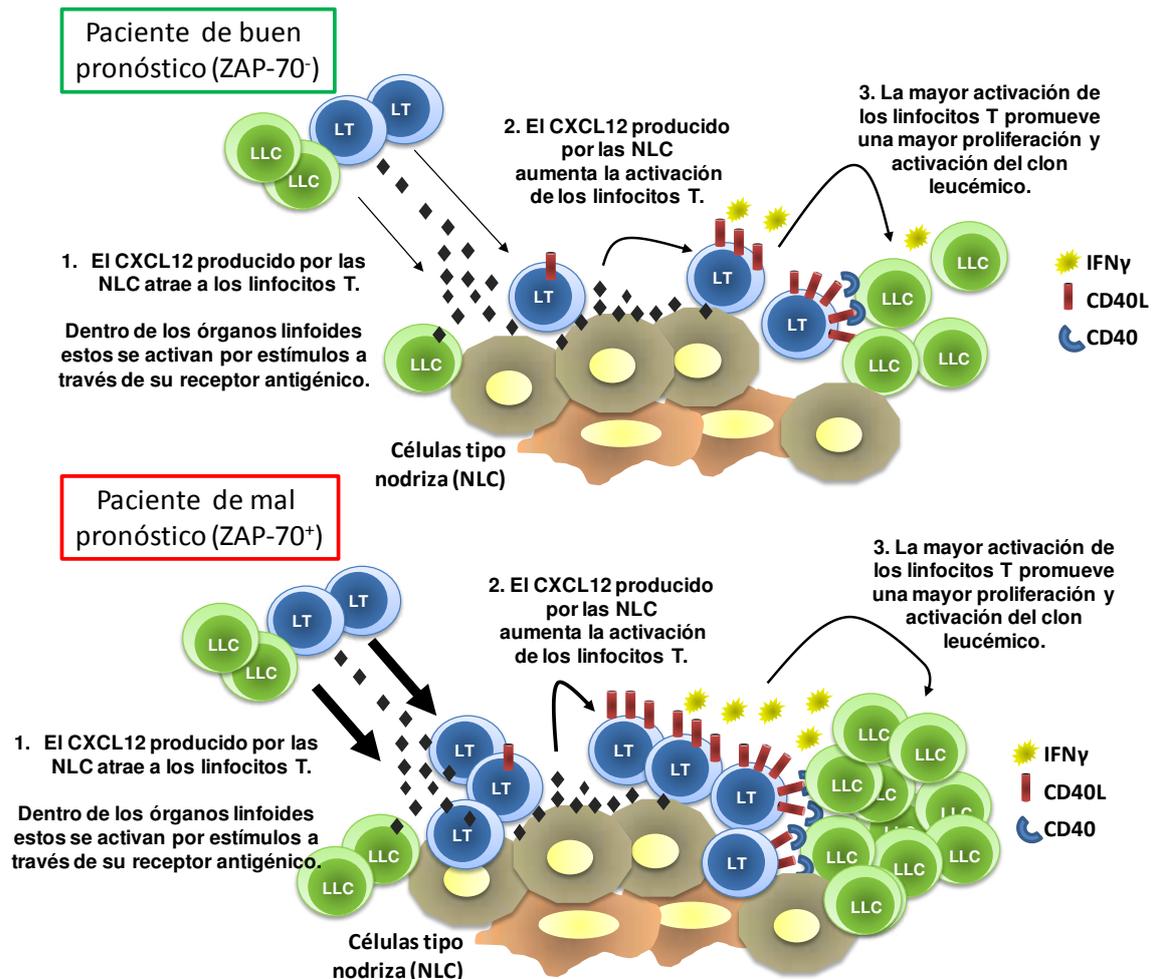
monocitos circulantes favorecen la supervivencia de las LLC <sup>97</sup> y pueden diferenciarse *in vitro* a NLC capaces de protegerlas de la apoptosis espontánea e inducida por drogas, en parte gracias a la producción de CXCL12 <sup>110</sup>. Por este motivo nos propusimos evaluar el efecto del co-cultivo con células NLC sobre la activación y proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes LLC. Cuando realizamos la diferenciación de NLC observamos que estas células no sólo interactúan con linfocitos B, tal como estaba descrito <sup>133</sup>, sino que también contactaban con linfocitos T CD4<sup>+</sup> sugiriendo que las NLC podrían comportarse como una “superficie” que favorece el contacto entre el clon leucémico y los linfocitos T autólogos *in vivo*. También encontramos que el co-cultivo con NLC indujo una disminución de la expresión del CXCR4 en los linfocitos T autólogos, por lo que presumimos que el CXCL12 producido por las NLC es capaz de interactuar con el CXCR4 e inducir la normal endocitosis del receptor, un evento que se da luego de la interacción de las quimiocinas con sus receptores específicos. Lo que nos resultó sumamente interesante fue ver que la presencia de las NLC incrementó la activación y proliferación de los linfocitos T autólogos sugiriendo que las NLC podrían también ser importantes para la fisiología de los linfocitos T de los pacientes LLC. Los resultados que obtuvimos al realizar el bloqueo del CXCR4 en los linfocitos T demuestran que la coestimulación observada en presencia de las NLC autólogas, se debe en parte a la producción de CXCL12 por parte de estas células. Probablemente otros factores producidos por las NLC, distintos del CXCL12, estén contribuyendo al aumento en la activación de los linfocitos T. En este sentido, se ha reportado que las NLC expresan dos ligandos de la familia TNF, BAFF (también llamado BLyS) y APRIL <sup>144</sup>, los cuales incrementan la supervivencia del clon leucémico <sup>144,145</sup> y pueden regular la activación de los linfocitos T de donadores sanos aumentando su proliferación y secreción de citoquinas <sup>146,147</sup>. Si bien no se ha evaluado aún si los linfocitos T de los pacientes con LLC responden de la misma forma a esos

ligandos, no podemos descartar que parte de la coestimulación observada en presencia de las NLC se deba también a la presencia de estos y/u otros factores.

Nuestras investigaciones actuales intentan determinar si las NLC logran además proteger a los linfocitos T de los pacientes LLC de la apoptosis inducida por las drogas quimioterápicas de elección para el tratamiento de esta patología, tal como se ha reportado para el clon leucémico<sup>148</sup>. En este sentido, las nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la LLC centran su interés en movilizar a las células leucémicas de los nichos de supervivencia a fin de hacerlas más susceptibles al tratamiento<sup>149-151</sup>. Si bien una significativa proporción de los pacientes responde inicialmente a la quimioterapia tradicional, la LLC es hasta el presente una enfermedad incurable y el fracaso en el tratamiento se debe, en parte, a que algunas células leucémicas sobreviven dentro de los órganos linfoides aún cuando son indetectables en circulación<sup>152</sup>. Esto hace que, tarde o temprano, el paciente recaiga dado que justamente en esos sitios el microambiente favorece la progresión de la enfermedad<sup>2,96,110</sup>. Actualmente se encuentra bajo estudio en Fase I con pacientes LLC la administración del inhibidor del CXCR4, el AMD3100 (también llamado Plerixafor) en combinación con el anticuerpo monoclonal Rituximab, que reconoce la molécula CD20 expresada en las células leucémicas. Los resultados preliminares indican que el AMD3100 es capaz de bloquear la interacción de las LLC con las NLC y/o estroma productor de CXCL12 en los órganos linfáticos, evitando que las células leucémicas queden allí retenidas y permitiendo la movilización de las mismas hacia la circulación donde son más susceptibles a la inmunoterapia (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00694590>). En base a nuestros resultados, es posible que el AMD3100 también esté bloqueando la interacción de los linfocitos T con las células productoras de CXCL12, impidiendo de esa forma que las células T incrementen su activación y puedan brindar señales de supervivencia al clon leucémico.

Como conclusión los resultados presentados en este trabajo de tesis demuestran que la quimiocina CXCL12 juega un rol dual sobre la fisiología de los linfocitos T de pacientes con LLC, actuando por un lado como factor quimiotractante y por otro lado aumentando la activación y proliferación de los linfocitos T activados, con la consecuente expansión del clon leucémico. En el modelo que proponemos en la **Figura 36** el CXCL12 producido por células del microambiente participa en el reclutamiento de los linfocitos T hacia estos sitios. El reclutamiento de los linfocitos T es menos marcado en los pacientes ZAP-70<sup>-</sup> en comparación a los pacientes ZAP-70<sup>+</sup> hecho que podría favorecer el curso más indolente que presenta el primer grupo. Una vez dentro de los órganos linfoides, y debido a que los pacientes suelen cursar procesos infecciosos recurrentes <sup>40,153</sup>, los linfocitos T podrían activarse por distintos estímulos antigénicos. El CXCL12 presente en los órganos linfoides favorecería la activación y proliferación de los linfocitos T, incrementando en última instancia la cantidad de señales de proliferación y supervivencia para el clon leucémico.

## DISCUSIÓN



**Figura 36. Modelo propuesto acerca del rol del CXCL12 en los centros proliferantes sobre la fisiología de los linfocitos T de pacientes con LLC de buen y mal pronóstico, y su impacto en las células leucémicas.** La menor respuesta migratoria de los LT de los pacientes con LLC ZAP-70<sup>-</sup> hacia el CXCL12 podría significar un menor acceso de estas células hacia los sitios donde se encuentran los centros proliferantes, principalmente a ganglios linfáticos. Una vez dentro de los órganos linfoides, el CXCL12 aumentará la activación y proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de forma similar en ambos grupos de pacientes. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados aumentarán la supervivencia y proliferación del clon leucémico. Sin embargo, el menor ingreso de LT en los pacientes de mejor pronóstico (ZAP-70<sup>-</sup>) hará que las células leucémicas de estos pacientes reciban una menor cantidad de señales de proliferación y supervivencia (CD40L, IFN $\gamma$ , IL-4), favoreciendo en última instancia la menor progresión de la enfermedad característica de este grupo de pacientes.

Una forma de estudiar si la distinta respuesta migratoria observada *in vitro* al CXCL12 por parte de los linfocitos T de pacientes LLC ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup> se correlaciona con una diferencia en el acceso a los órganos linfáticos *in vivo*,

sería evaluar comparativamente en muestras de tejidos linfoides de pacientes LLC la cantidad de linfocitos T presentes en los centros proliferantes, esperando encontrar un mayor número de linfocitos T en las muestras provenientes de pacientes ZAP-70<sup>+</sup>. Si bien el acceso a este tipo de muestras es limitado, en la medida que los médicos con los que trabajamos requieran la obtención de muestras de ganglios y médula ósea utilizaremos el remanente para estudiar este punto por inmunohistoquímica. Además tenemos planeado evaluar comparativamente la migración de los linfocitos T de pacientes LLC ZAP-70<sup>+</sup> y ZAP-70<sup>-</sup> en un sistema de migración *in vivo*, realizando transferencia adoptiva de linfocitos T de pacientes en ratones NOD/SCID<sup>154</sup>. Este estudio nos permitirá evaluar si los linfocitos T de pacientes ZAP-70<sup>+</sup> logran acceder más fácilmente hacia los órganos linfoides del ratón al compararlos con los linfocitos T de los pacientes ZAP-70<sup>-</sup>. Nuestras investigaciones actuales están encaminadas en este sentido.

Los resultados presentados en esta tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

---

- ***CXCL12-induced chemotaxis is impaired in T cells from ZAP-70<sup>-</sup> chronic lymphocytic leukemia patients.*** Borge M, Nannini PR, Galletti J, Morande P, Bezares FR, Giordano M, Gamberale R. *Haematologica*. 2010 May;95(5):768-75.
- ***CXCL12 is a costimulator for CD4<sup>+</sup> T cell activation and proliferation in Chronic Lymphocytic Leukaemia patients.*** Borge M, Nannini P, Morande P, Jancic C, Bistmans A, Bezares RF, Giordano M, Gamberale, R. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2012 (*en prensa*).

## BIBLIOGRAFÍA

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 1996;184:1101-1109.
2. Burger JA, Kipps TJ. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma*. 2002;43:461-466.
3. Bleul CC, Schultze JL, Springer TA. B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J Exp Med*. 1998;187:753-762.
4. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, et al. Structure and Chromosomal Localization of the Human Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF1) Gene. *Genomics*. 1995;28:495-500.
5. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:2305-2309.
6. Federspiel B, Melhado IG, Duncan AM, et al. Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics*. 1993;16:707-712.
7. Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem*. 1994;269:232-237.
8. Nomura H, Nielsen BW, Matsushima K. Molecular cloning of cDNAs encoding a LD78 receptor and putative leukocyte chemotactic peptide receptors. *Int Immunol*. 1993;5:1239-1249.
9. Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev*. 2000;177:175-184.

10. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996;272:872-877.
11. Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381:661-666.
12. Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*. 1996;382:829-833.
13. Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768:952-963.
14. Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, et al. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*. 1997;36:13570-13578.
15. Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:469-499.
16. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382:635-638.
17. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9448-9453.
18. Diaz GA. CXCR4 mutations in WHIM syndrome: a misguided immune system? *Immunol Rev*. 2005;203:235-243.
19. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2005;280:35760-35766.
20. Boldajipour B, Mahabaleswar H, Kardash E, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*. 2008;132:463-473.

21. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelerie F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*. 2009;113:6085-6093.
22. Kim CH, Broxmeyer HE. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol*. 1999;65:6-15.
23. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med*. 2000;343:1020-1034.
24. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:867-878.
25. Ebert LM, Schaerli P, Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol*. 2005;42:799-809.
26. Sallusto F, Palermo B, Hoy A, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in directing traffic of naive, type 1 and type 2 T cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;246:123-128; discussion 129.
27. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999;99:23-33.
28. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med*. 1999;189:451-460.
29. Okada T, Ngo VN, Ekland EH, et al. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med*. 2002;196:65-75.
30. Phillips R, Ager A. Activation of pertussis toxin-sensitive CXCL12 (SDF-1) receptors mediates transendothelial migration of T lymphocytes across lymph node high endothelial cells. *Eur J Immunol*. 2002;32:837-847.
31. Suzuki Y, Rahman M, Mitsuya H. Diverse transcriptional response of CD4(+) T cells to stromal cell-derived factor (SDF)-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4(+) T cells. *J Immunol*. 2001;167:3064-3073.

32. Nanki T, Lipsky PE. Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation. *J Immunol*. 2000;164:5010-5014.
33. Kumar A, Humphreys TD, Kremer KN, et al. CXCR4 Physically Associates with the T Cell Receptor to Signal in T Cells. *Immunity*. 2006;25:213-224.
34. Pritsch O, Maloum K, Dighiero G. Basic biology of autoimmune phenomena in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 1998;25:34-41.
35. Diehl LF, Ketchum LH. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. *Semin Oncol*. 1998;25:80-97.
36. Hamblin T. Is chronic lymphocytic leukemia a response to infectious agents? *Leuk Res*. 2006;30:1063-1064.
37. Hamblin TJ, Oscier DG, Young BJ. Autoimmunity in chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Pathol*. 1986;39:713-716.
38. Morrison VA. The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 1998;25:98-106.
39. Dighiero G. An attempt to explain disordered immunity and hypogammaglobulinemia in B-CLL. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1988;30:283-288.
40. Wadhwa PD, Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006;33:240-249.
41. Hamblin TJ, Oscier DG. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. *Blood Rev*. 1997;11:119-128.
42. Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia: clinical translations of biological features. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;294:165-185.
43. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*. 1999;17:399-408.
44. Catovsky D, Murphy RL. Key issues in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Eur J Cancer*. 1995;31A:2146-2154.

45. Schroeder HW, Jr., Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today*. 1994;15:288-294.
46. Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. *Blood*. 1991;78:1901-1914.
47. Schimmer AD, Munk-Pedersen I, Minden MD, Reed JC. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2003;4:211-218.
48. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:163-183.
49. Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 1999;26:107-114.
50. Rai KR, Sawitsky A. A review of the prognostic role of cytogenetic, phenotypic, morphologic, and immune function characteristics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells*. 1987;12:327-338.
51. Binet JL. [The lymphocytes of chronic lymphoid leukemia. Diagnostic, physiologic and prognostic significance]. *Bull Acad Natl Med*. 1989;173:73-76; discussion 77.
52. Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*. 2002;99:4087-4093.
53. Widhopf GF, 2nd, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1/ of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood*. 2004;104:2499-2504.
54. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2004;200:519-525.

55. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest.* 2004;113:1008-1016.
56. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The origin of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 2006;33:150-156.
57. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94:1848-1854.
58. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.* 2003;101:4944-4951.
59. Durig J, Nuckel H, Cremer M, et al. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2003;17:2426-2434.
60. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2004;351:893-901.
61. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2003;348:1764-1775.
62. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2004;363:105-111.
63. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood.* 2002;99:1023-1029.
64. Hamblin TJ, Orchard JA, Gardiner A, Oscier DG, Davis Z, Stevenson FK. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood.* 2000;95:2455-2457.

65. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1840-1847.
66. Ghia P, Guida G, Stella S, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*. 2003;101:1262-1269.
67. Durig J, Naschar M, Schmucker U, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2002;16:30-35.
68. Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;98:181-186.
69. Gentile M, Mauro FR, Calabrese E, et al. The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia patients studied prospectively at diagnosis: a single institute experience. *Br J Haematol*. 2005;130:549-557.
70. Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *Faseb J*. 1996;10:1408-1417.
71. Deaglio S, Dianzani U, Horenstein AL, et al. Human CD38 ligand. A 120-KDA protein predominantly expressed on endothelial cells. *J Immunol*. 1996;156:727-734.
72. Morra M, Zubiaur M, Terhorst C, Sancho J, Malavasi F. CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells. *Faseb J*. 1998;12:581-592.
73. Deaglio S, Zubiaur M, Gregorini A, et al. Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood*. 2002;99:2490-2498.
74. Lund FE, Yu N, Kim KM, Reth M, Howard MC. Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression. *J Immunol*. 1996;157:1455-1467.

75. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, et al. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2003;102:2146-2155.
76. D'Arena G, Tarnani M, Rumi C, et al. Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2007;82:787-791.
77. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2005;104:2124-2132.
78. Schroers R, Griesinger F, Trumper L, et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2005;19:750-758.
79. Hus I, Podhorecka M, Bojarska-Junak A, et al. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol*. 2006;17:683-690.
80. Cerretini R, Chena C, Giere I, et al. Structural aberrations of chromosomes 17 and 12 in chronic B-cell disorders. *Eur J Haematol*. 2003;71:433-438.
81. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;121:287-295.
82. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:4609-4614.
83. Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;105:2036-2041.
84. Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101:1087-1093.

85. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004;103:4389-4395.
86. Nedellec S, Renaudineau Y, Bordron A, et al. B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients. *J Immunol*. 2005;174:3749-3756.
87. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2006;107:3584-3592.
88. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood*. 2007.
89. Kipps TJ. Signal transduction pathways and mechanisms of apoptosis in CLL B-lymphocytes: their role in CLL pathogenesis. *Hematol Cell Ther*. 1997;39 Suppl 1:S17-27.
90. Robertson LE, Plunkett W. Apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1993;11 Suppl 2:71-74.
91. Kitada S, Andersen J, Akar S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*. 1998;91:3379-3389.
92. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*. 1967;29:Suppl:566-584.
93. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194:1639-1647.
94. Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood*. 2004;103:375-382.

95. Ghia P, Circosta P, Scielzo C, et al. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;294:135-145.
96. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;123:380-388.
97. Gamberale R, Geffner J, Arrosagaray G, et al. Non-malignant leukocytes delay spontaneous B-CLL cell apoptosis. *Leukemia.* 2001;15:1860-1867.
98. Gamberale R, Geffner JR, Trevani A, et al. Immune complexes inhibit apoptosis of chronic lymphocytic leukaemia B cells. *Br J Haematol.* 1999;107:870-876.
99. Mainou-Fowler T, Prentice AG. Modulation of apoptosis with cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma.* 1996;21:369-377.
100. Crawford DH, Catovsky D. In vitro activation of leukaemic B cells by interleukin-4 and antibodies to CD40. *Immunology.* 1993;80:40-44.
101. Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med.* 1992;176:1319-1326.
102. Buschle M, Campana D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV, Brenner MK. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 1993;177:213-218.
103. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1999;106:995-1004.
104. Granziero L, Ghia P, Circosta P, et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2001;97:2777-2783.
105. Chiorazzi N. Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20:399-413.

106. Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*. 2002;99:2977-2984.
107. Lopez-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, et al. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol*. 2004;76:462-471.
108. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. 1999;94:3658-3667.
109. Ghia P, Strola G, Granziero L, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol*. 2002;32:1403-1413.
110. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96:2655-2663.
111. Rezvany MR, Jeddi-Tehrani M, Osterborg A, Kimby E, Wigzell H, Mellstedt H. Oligoclonal TCRBV gene usage in B-cell chronic lymphocytic leukemia: major perturbations are preferentially seen within the CD4 T-cell subset. *Blood*. 1999;94:1063-1069.
112. Rezvany MR, Jeddi-Tehrani M, Wigzell H, Osterborg A, Mellstedt H. Leukemia-associated monoclonal and oligoclonal TCR-BV use in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003;101:1063-1070.
113. de Toter D, Reato G, Mauro F, et al. IL4 production and increased CD30 expression by a unique CD8+ T-cell subset in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;104:589-599.

114. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest*. 2008;118:2427-2437.
115. Gorgun G, Holderried TA, Zahrieh D, Neuberg D, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J Clin Invest*. 2005;115:1797-1805.
116. Roth A, de Beer D, Nuckel H, et al. Significantly shorter telomeres in T-cells of patients with ZAP-70+/CD38+ chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2008;143:383-386.
117. Bagnara D, Kaufman MS, Calissano C, et al. A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood*. 2011;117:5463-5472.
118. Borge M, Nannini PR, Galletti JG, et al. CXCL12-induced chemotaxis is impaired in T cells from patients with ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2010;95:768-775.
119. Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K, Broxmeyer HE. Stromal-cell-derived factor-1/CXCL12-induced chemotaxis of a T cell line involves intracellular signaling through Cbl and Cbl-b and their regulation by Src kinases and CD45. *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36:308-314.
120. Patrussi L, Ulivieri C, Lucherini OM, et al. p52Shc is required for CXCR4-dependent signaling and chemotaxis in T cells. *Blood*. 2007;110:1730-1738.
121. Gamberale R, Fernandez-Calotti P, Sanjurjo J, et al. Signaling capacity of FcγRII isoforms in B-CLL cells. *Leuk Res*. 2005;29:1277-1284.
122. Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M. Live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T-cell responses by CD154 expression. *Nat Protoc*. 2006;1:1-6.
123. Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, et al. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood*. 2004;103:4222-4231.

124. Galletti J, Canones C, Morande P, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells bind and present the erythrocyte protein band 3: possible role as initiators of autoimmune hemolytic anemia. *J Immunol.* 2008;181:3674-3683.
125. Kremer KN, Humphreys TD, Kumar A, Qian NX, Hedin KE. Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCL12 chemokine. *J Immunol.* 2003;171:360-367.
126. Ticchioni M, Charvet C, Noraz N, et al. Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood.* 2002;99:3111-3118.
127. Vaisitti T, Aydin S, Rossi D, et al. CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia;*24:958-969.
128. Canals M, Scholten DJ, de Munnik S, Han MK, Smit MJ, Leurs R. Ubiquitination of CXCR7 controls receptor trafficking. *PLoS One;*7:e34192.
129. Gorgun G, Ramsay AG, Holderried TA, et al. E(mu)-TCL1 mice represent a model for immunotherapeutic reversal of chronic lymphocytic leukemia-induced T-cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:6250-6255.
130. Tangye SG, Raison RL. Human cytokines suppress apoptosis of leukaemic CD5+ B cells and preserve expression of bcl-2. *Immunol Cell Biol.* 1997;75:127-135.
131. Gamberale R, Geffner JR, Giordano M. Immune complexes and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2002;43:251-255.
132. Patten PE, Buggins AG, Richards J, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood.* 2008;111:5173-5181.
133. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;99:1030-1037.

134. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 2005;115:755-764.
135. Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2007;110:3316-3325.
136. Honczarenko M, Douglas RS, Mathias C, Lee B, Ratajczak MZ, Silberstein LE. SDF-1 Responsiveness Does Not Correlate With CXCR4 Expression Levels of Developing Human Bone Marrow B Cells. *Blood.* 1999;94:2990-2998.
137. Liao F, Shirakawa AK, Foley JF, Rabin RL, Farber JM. Human B cells become highly responsive to macrophage-inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand-20 after cellular activation without changes in CCR6 expression or ligand binding. *J Immunol.* 2002;168:4871-4880.
138. Scandella E, Men Y, Legler DF, et al. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood.* 2004;103:1595-1601.
139. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One;*5:e9175.
140. Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol.* 2008;26:4497-4503.
141. Rezvany MR, Jeddi-Tehrani M, Rabbani H, et al. Autologous T lymphocytes may specifically recognize leukaemic B cells in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2000;111:608-617.
142. Kato K, Cantwell MJ, Sharma S, Kipps TJ. Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 1998;101:1133-1141.

143. Kiaii S, Kokhaei P, Mozaffari F, et al. T cells from indolent CLL patients prevent apoptosis of leukemic B cells in vitro and have altered gene expression profile. *Cancer Immunol Immunother.* 2012.
144. Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood.* 2005;106:1012-1020.
145. Endo T, Nishio M,ENZLER T, et al. BAFF And APRIL Support Chronic Lymphocytic Leukemia B Cell Survival Through Activation Of The Canonical NF- $\kappa$ B Pathway. *Blood.* 2006.
146. Huard B, Schneider P, Mauri D, Tschopp J, French LE. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. *J Immunol.* 2001;167:6225-6231.
147. Yu G, Boone T, Delaney J, et al. APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol.* 2000;1:252-256.
148. Burger M, Hartmann T, Krome M, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2005;106:1824-1830.
149. Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, et al. The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;118:3603-3612.
150. Rooij MFMD, Kuil A, Geest CR, et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.*
151. Stamatopoulos B, Meuleman N, De Bruyn C, et al. AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell -based microenvironment: preclinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments. *Haematologica.* 2011.

152. Alfonso-Perez M, Lopez-Giral S, Quintana NE, Loscertales J, Martin-Jimenez P, Munoz C. Anti-CCR7 monoclonal antibodies as a novel tool for the treatment of chronic lymphocyte leukemia. *J Leukoc Biol.* 2006;79:1157-1165.
153. Morrison VA. Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches. *Best Pract Res Clin Haematol*;23:145-153.
154. Hartmann TN, Grabovsky V, Wang W, et al. Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res.* 2009;69:3121-3130.