

Tesis Doctoral

Efecto de la fludarabina en la sobrevida y funcionalidad de los linfocitos T de pacientes con leucemia linfática crónica: posibles implicancias en la falla terapéutica de la enfermedad

Nannini, Paula Romina

2013-12-16

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Nannini, Paula Romina. (2013-12-16). Efecto de la fludarabina en la sobrevida y funcionalidad de los linfocitos T de pacientes con leucemia linfática crónica: posibles implicancias en la falla terapéutica de la enfermedad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Nannini, Paula Romina. "Efecto de la fludarabina en la sobrevida y funcionalidad de los linfocitos T de pacientes con leucemia linfática crónica: posibles implicancias en la falla terapéutica de la enfermedad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-12-16.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efecto de la fludarabina en la supervivencia y funcionalidad de los linfocitos T de pacientes con leucemia linfática crónica: posibles implicancias en la falla terapéutica de la enfermedad.

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

Paula Romina Nannini

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, 2013

INDICE

ABREVIATURAS.....	3
RESÚMEN.....	4
ABSTRACT.....	7
AGRADECIMIENTOS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
1. El análogo de adenosina fludarabina.....	12
a. Transporte y metabolismo de fludarabina.....	13
b. Efectos citotóxicos inducidos por fludarabina.....	15
c. Efectos inmunomodulatorios mediados por fludarabina.....	16
2. Leucemia Linfática Crónica de células B (LLC).....	17
a. Características generales de la LLC.....	17
b. Características fenotípicas de las células LLC.....	18
c. Clasificación de los pacientes con LLC.....	21
d. La importancia del microambiente en la patogénesis de la LLC.....	24
e. Los linfocitos T de los pacientes con LLC.....	29
i. Características de los linfocitos T de los pacientes con LLC.....	29
ii. El efecto de las células de tipo nodriza (NLC) y el CXCL12 sobre los linfocitos T de los pacientes con LLC.....	33
f. Tratamiento de los pacientes con LLC.....	35
i. Los principales agentes terapéuticos en LLC.....	35
ii. El impacto del microambiente tumoral de los órganos linfoides en la efectividad del tratamiento quimioterápico.....	37
OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1. Reactivos generales y anticuerpos.....	42
2. Pacientes LLC.....	44
3. Obtención de células mononucleares y criopreservación de las muestras.....	45
4. Obtención de células de tipo nodriza (<i>nurse like cells</i> , NLC).....	46

5. Purificación de linfocitos T.....	46
6. Co-cultivos de NLC y linfocitos T.....	46
7. Determinación de la apoptosis por microscopía de fluorescencia.....	47
8. Citometría de flujo.....	48
9. Ensayos de migración <i>in vitro</i>	51
10. Microscopía confocal.....	52
11. Ratones BALB/c.....	53
12. Análisis estadístico.....	56
RESULTADOS.....	57
RESULTADOS OBJETIVO N° 1.....	59
1. Las células de tipo nodriza (NLC) previenen la apoptosis espontánea de los linfocitos T de los pacientes con LLC.....	59
2. Las células de tipo nodriza (NLC) protegen a los linfocitos T de la apoptosis inducida por fludarabina.....	68
RESULTADOS OBJETIVO N° 2.....	76
1. El tratamiento <i>in vitro</i> con fludarabina aumenta la proliferación de los linfocitos T de los pacientes con LLC.....	76
2. El tratamiento <i>in vitro</i> con fludarabina no modifica la capacidad migratoria de los linfocitos T de los pacientes con LLC en respuesta a las quimiocinas CXCL12 y CCL21.....	82
RESULTADOS OBJETIVO N° 3.....	85
1. El tratamiento <i>in vivo</i> de ratones BALB/c con fludarabina induce un aumento en el número total de linfocitos T en los ganglios linfoides.....	85
2. El tratamiento <i>in vitro</i> de los linfocitos murinos con fludarabina no aumenta su reclutamiento a los órganos linfáticos de ratones BALB/c.....	89
3. El tratamiento <i>in vivo</i> con fludarabina incrementa la proporción de linfocitos Ki-67 ⁺ en el área T de los ganglios de los ratones.....	93
DISCUSIÓN.....	97
BIBLIOGRAFÍA.....	109

ABREVIATURAS

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

BSA: Seroalbúmina bovina

CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CMT: Células mononucleares totales

DMSO: Dimetilsulfóxido

FLU: Fludarabina

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

HMS: Hipermutación somática

Ig: Inmunoglobulina

IgVH: Región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina

LLC: Leucemia Linfática Crónica de células B

mAcs: Anticuerpos monoclonales

MIF: Media de Intensidad de fluorescencia

NLC: *Nurse like cells*, células tipo nodriza

PBS: Tampón fosfato salino

PE: Ficoeritrina

PerCP: Complejo proteico peridina-clorofila

PHA: *phytohaemagglutinin*, fitohemaglutinina

SFB: Suero Fetal Bovino

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

ZAP-70: *ξ-associated protein*.

RESUMEN

Efecto de la fludarabina en la supervivencia y funcionalidad de los linfocitos T de pacientes con leucemia linfática crónica: posibles implicancias en la falla terapéutica de la enfermedad.

La leucemia linfática crónica (LLC) se caracteriza por la acumulación de linfocitos B (LB) clonales en sangre periférica y órganos linfáticos. La fludarabina es uno de los principales agentes quimioterápicos empleados para su tratamiento y posee claros efectos inmunomoduladores más allá de su tradicional capacidad citotóxica sobre los linfocitos. En la actualidad, la LLC continúa siendo una enfermedad incurable ya que las células leucémicas logran sobrevivir a los efectos pro-apoptóticos de la quimioterapia en los tejidos linfoides. Allí, proliferan en estructuras anatómicas denominadas centros proliferantes (CP) en contacto con linfocitos T (LT) activados, células estromales y células de tipo nodriza (NLC) que les brindan señales indispensables para su acumulación. El objetivo de este trabajo de Tesis fue estudiar los mecanismos que podrían estar involucrados en la falla terapéutica de los pacientes con LLC, centrándonos en el efecto de la fludarabina y el microambiente tumoral en la supervivencia y funcionalidad de los LT de los pacientes. Encontramos que las NLC autólogas protegen a los LT de la apoptosis espontánea e inducida por fludarabina, y que ésta droga es capaz de incrementar la activación y proliferación de los mismos. Estos hallazgos sugieren que luego del tratamiento con fludarabina, algunos LT podrán sobrevivir a sus efectos pro-apoptóticos en los CP en parte gracias a la presencia de las NLC. Dado que los LT brindan señales claves para la acumulación del clon leucémico, la mayor proliferación y activación que poseen

luego del tratamiento con la droga podría contribuir a la expansión de las células LLC que han sobrevivido, con la consecuente recaída del paciente.

Palabras claves: LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA; FLUDARABINA; LINFOCITOS T; CÉLULAS DE TIPO NODRIZA; MICROAMBIENTE TUMORAL.

ABSTRACT

Effects of fludarabine on survival and functionality of T cells from chronic lymphocytic leukemia patients: possible implications in therapeutic failure.

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is characterized by the accumulation of clonal B lymphocytes in peripheral blood and lymphoid organs. Fludarabine is one of the main chemotherapeutic agents employed in the treatment of CLL and it exerts clear immunomodulatory actions besides its traditional cytotoxic effects on lymphocytes. There is still no cure for CLL patients as leukemic cells can overcome the pro-apoptotic actions of chemotherapy in lymphoid tissues within proliferation centers (PC). In these sites, CLL cells are in close contact with activated T lymphocytes (TL), stromal cells and nurse like cells (NLC) which support leukemic cells accumulation through survival and proliferation signals. The aim of this Thesis was to study the mechanisms that could be involved in the therapeutic failure of CLL patients, focusing on the effect of fludarabine and the tumor microenvironment in the survival and functionality of TL. We found that autologous NLC protect TL from spontaneous and fludarabine-induced apoptosis, and that this drug enhances activation and proliferation of TL from CLL patients. These findings suggest that after fludarabine treatment TL could survive in PC, at least in part, due to the presence of NLC. Considering that TL provide key survival signals that support CLL cells accumulation, fludarabine

enhancement of TL proliferation and activation would contribute to the expansion of surviving leukemic cells, favoring the relapse of disease.

Key words: CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA, FLUDARABINE, T LYMPHOCYTES, NURSE LIKE CELLS, TUMOR MICROENVIRONMENT.

AGRADECIMIENTOS

A Romi.

A Mer, Pablo y Andy.

A Mirta.

A Moni.

A Julieta Panero y Silvia Vanzulli.

A todos mis compañeros de Inmunoonco.

A mis papás y a mis hermanos.

A mis amigos.

A mi amor, Carlos María.

Muchas Gracias.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El análogo de adenosina fludarabina

Los análogos de nucleósidos constituyen una importante clase de agentes quimioterápicos introducidos para el tratamiento de enfermedades hematológicas y, posteriormente, de tumores sólidos. Esta familia de compuestos incluye una gran variedad de nucleósidos derivados de purinas y pirimidinas que actúan como antimetabolitos compitiendo con los nucleósidos fisiológicos e interactuando con un gran número de “blancos” intracelulares para, finalmente, inducir citotoxicidad [1-3].

La fludarabina, también llamada 9-β-D-arabinosil-2-fluoroadenina o 2-F-Ara-A, es un análogo de adenosina con actividad citotóxica en distintos desórdenes proliferativos. Si bien no es activa en el tratamiento de tumores sólidos, presenta una alta efectividad para el tratamiento de linfomas B indolentes, particularmente en la leucemia linfática crónica de células B (LLC) y en el linfoma no-Hodgkin [4-5]. Además, debido a sus potentes propiedades inmunosupresoras, ha sido aplicada con éxito como quimioterapia condicionante no mieloablativa para el trasplante de precursores hematopoyéticos de médula ósea [6].

El desarrollo de esta droga se vio impulsado por las limitaciones en la utilización clínica del análogo de purina arabinosiladenina, también llamada AraA o Vidarabina, que resultaba rápidamente metabolizado por la enzima adenosin deaminasa. En la estructura química de la fludarabina (**Figura 1**), la presencia de un átomo de flúor en el carbono 2 da lugar a un análogo de adenosina resistente a la deaminación y su derivado monofosfato (2-F-Ara-AMP) permite la solubilidad en agua para su utilización en la clínica [7-8].

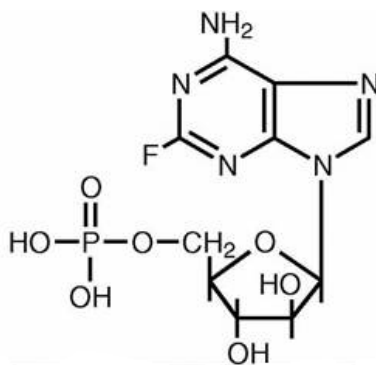


Figura 1: Estructura química de fludarabina.

1.a. Transporte y metabolismo de fludarabina

La fludarabina, como todo análogo de nucleósido, se administra como prodroga, ya que requiere ser metabolizado hasta su forma de nucleótido trifosfato para ejercer su efecto citotóxico. Una vez administrada por vía intravenosa, es rápidamente defosforilada por fosfatasas séricas y por las 5'-ecto-nucleotidasas (CD73) presentes en la membrana de células epiteliales, endoteliales y en distintas poblaciones leucocitarias, incluyendo linfocitos T y B [9]. Así, puede ingresar a las células por los transportadores de nucleósidos que son capaces de reconocerla y mediar su translocación (**Figura 2**). Existen dos familias de proteínas integrales de membrana que pueden mediar el ingreso de nucleósidos y análogos de nucleósidos a las células: transportadores de nucleósidos concentrativos y transportadores de nucleósidos equilibrativos [10]. En el caso de los transportadores de nucleósidos concentrativos, la translocación a través de éstos es dependiente del gradiente de sodio existente a través de la membrana plasmática. La unión de los sustratos a este tipo de transportadores es de alta afinidad y especificidad. En cambio, los transportadores de nucleósidos equilibrativos median el flujo de nucleósidos por transporte facilitado, el cual es reversible dependiendo del gradiente de

concentración del sustrato a través de la membrana plasmática [11]. Dentro de la célula, el paso limitante para la acumulación de la fludarabina es la acción de la enzima deoxicitidina quinasa (dCK) que la transforma a su forma monofosfato [12] y posteriormente, la acción secuencial de enzimas quinasa da como resultado el metabolito trifosfato activo F-ara-ATP [13] (**Figura 2**).

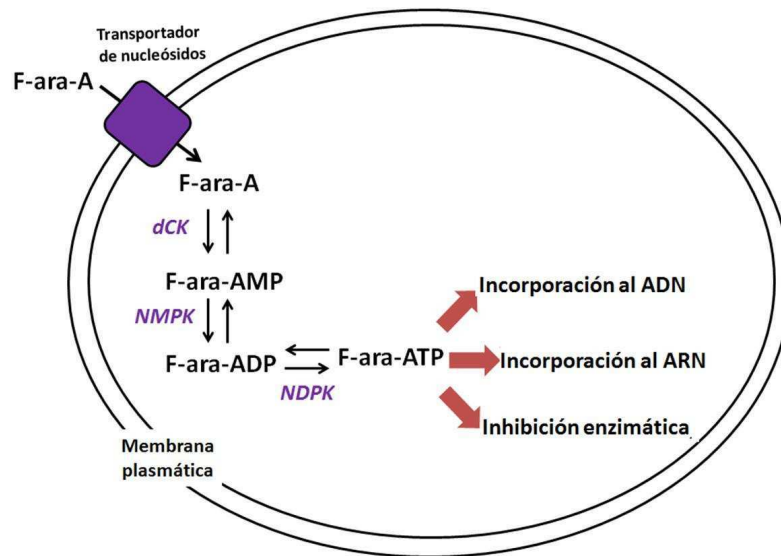


Figura 2: Características generales del transporte, metabolismo y mecanismo de acción citotóxico de la fludarabina. La fludarabina defosforilada (F-ara-A) ingresa a las células a través de transportadores específicos de nucleósidos. Una vez dentro de la célula es activada por sucesivas fosforilaciones, siendo la primera de ellas llevada a cabo por la deoxicitidina quinasa (dCK). A continuación, la acción de quinasa de nucleósidos monofosfatos (NMPK) y posteriormente, de quinasa de nucleósidos difosfatos (NDPK), dan lugar al metabolito activo fludarabina trifosfato (F-ara-ATP). La F-ara-ATP puede ejercer su acción citotóxica al ser incorporada al ADN o ARN, alterándolo o interfiriendo con enzimas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos. Estas acciones resultan en la inhibición de la síntesis de ADN o ARN y conducen a la apoptosis celular.

1.b. Efectos citotóxicos inducidos por fludarabina

Una de las ventajas de la fludarabina para su empleo como agente quimioterápico radica en la capacidad de ejercer su acción citotóxica tanto en células en división como en células en reposo. Los mecanismos involucrados en la apoptosis inducida por fludarabina se basan principalmente, en la interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos. En las células que se encuentran en activa proliferación, F-ara-ATP es incorporada al ADN causando la terminación de la elongación de la cadena de ácidos nucleicos e induciendo, de esta manera, la apoptosis de las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular [14]. La fludarabina actúa como sustrato inhibitorio de la ADN polimerasa, la ADN primasa y la ADN ligasa I [15-16]. Asimismo, inhibe a la ribonucleótido reductasa, enzima encargada de sintetizar los dNTPs precursores del ADN, potenciando de este modo su efecto al incrementar la relación F-ara-ATP: dATP, e inhibiendo de forma indirecta la replicación [17-18].

Para el caso de las células en reposo, su acción citotóxica involucra la interacción con la maquinaria de reparación del ADN, ya que la incorporación de F-ara-ATP conduce a la progresiva acumulación de rupturas de ADN de cadena simple que inducen la apoptosis de las células por vías dependientes e independientes de p53 [2, 17]. Asimismo, se ha demostrado que la fludarabina interfiere con la transcripción de genes necesarios para la supervivencia de la célula mediante dos mecanismos: induciendo la terminación prematura del transcripto al incorporarse directamente al ARN, y por inhibición de la actividad de la RNA polimerasa II [19-20]. Por último, la fludarabina puede activar directamente la vía apoptótica de caspasa 9/caspasa 3 al interactuar con el factor pro-apoptótico Apaf-1 [21].

1.c. Efectos inmunomodulatorios mediados por fludarabina

Paralelamente a la inducción de apoptosis, distintos estudios han demostrado que la fludarabina tiene capacidad de inducir la activación y diferenciación en distintos tipos celulares. En este sentido, se ha reportado que la fludarabina puede estimular la activación y diferenciación de la línea monocítica humana U937, induciendo un aumento en la expresión de CD11b y de sus propiedades adherentes [22]. Asimismo, se ha demostrado que el tratamiento *in vitro* de células endoteliales humanas con fludarabina induce un aumento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y en su capacidad de estimular respuestas T citotóxicas alogeneicas [23]. Dado que, como se mencionó anteriormente, la fludarabina se emplea como parte de los regímenes condicionantes previos al trasplante alogeneico de células madre, estos resultados tienen relevancia en relación a los efectos proinflamatorios y el daño tisular que se observan como consecuencia de la quimioterapia condicionante [23].

Nuestro grupo demostró que la exposición de la línea monocítica humana U937 a fludarabina induce un aumento en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 y de la quimiocina IL-8, ambos involucrados en la migración de los leucocitos desde la sangre hacia los sitios donde se esté produciendo un foco inflamatorio, y que estos efectos son mediados a través de la activación de la vía MAPK/ERK [24]. A su vez, encontramos que la acción de fludarabina induce la activación del factor de transcripción AP-1 en las células U937, así como también en las células leucémicas de pacientes con LLC [24]. Uno de los genes blanco del factor de transcripción AP-1 es el de IFN γ , una de las citoquinas secretada por los linfocitos T que, como veremos más adelante, posee efectos anti-apoptóticos sobre el clon leucémico de los pacientes con LLC [25]. En este sentido, nuestro grupo reportó en el año 2006 que el tratamiento *in vitro* de las células mononucleares totales (CMT) de dadores sanos y de pacientes con LLC

con fludarabina, incrementa la producción de IFN γ por parte de los linfocitos T y de las células NK activadas con PHA (*phytohaemagglutinin*) o PMA (*phorbol myristate acetate*) con ionomicina [26].

En su conjunto estas evidencias demuestran que la fludarabina es capaz de ejercer efectos inmunomoduladores en distintos tipos celulares más allá de los clásicos efectos citotóxicos.

2. Leucemia linfática crónica de células B (LLC)

2.a. Características generales de la LLC

La LLC es una enfermedad oncohematológica caracterizada por la acumulación de linfocitos B clonales en la sangre periférica, los nódulos linfáticos y la médula ósea [27]. Es la leucemia más frecuente en el hemisferio occidental y a nivel mundial constituye el veintiocho por ciento de todos los casos de leucemia, con una incidencia de 1 a 5 personas cada 100.000 por año [28]. Esta patología afecta a personas mayores, principalmente de sexo masculino, con un pico de incidencia entre los 67 y los 72 años [29]. Algunas evidencias indican una susceptibilidad genética al desarrollo de la LLC, como lo son el hecho de que es una patología muy rara en países orientales y la existencia de casos de LLC familiares en los cuales la enfermedad se manifiesta a edades más tempranas en las sucesivas generaciones.

Una de las características de la LLC es su asociación con fenómenos autoinmunes que pueden complicar el curso de la enfermedad, en particular, con la producción de autoanticuerpos que reconocen antígenos de células hematopoyéticas [30-32]. El desorden autoinmune más frecuente es la anemia

hemolítica autoinmune que se presenta en un cinco a once por ciento de los pacientes [33], y en menor medida, púrpura trombocitopénica y neutropenia [32, 34]. Asimismo, todos los pacientes con LLC presentan algún grado de inmunodeficiencia. La inmunodeficiencia humoral más frecuente es la hipogamaglobulinemia, la cual puede presentarse hasta en un ochenta y cinco por ciento de los pacientes [35] y provoca infecciones bacterianas recurrentes [36-38]. De hecho, una de las mayores complicaciones que padecen los pacientes son las infecciones, las cuales constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en LLC. En este sentido, existen reportes que indican 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 [38-39]. Sin embargo, la inmunosupresión que caracteriza a los pacientes con LLC no involucra solamente defectos de la respuesta inmune humoral, sino que 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 a contraer distintos tipos de infecciones [38-39].

2.b. 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 expresan la mayoría de los linfocitos B circulantes como CD5 y CD23 [40-42]. Al igual que todos los linfocitos B maduros, las células LLC expresan inmunoglobulinas (Igs) en la membrana, las cuales forman parte del receptor para el antígeno (BCR). En la **Figura 3** puede observarse un esquema de la estructura de la Ig, la cual está constituida por dos cadenas pesadas (H) idénticas entre sí, unidas por puentes disulfuro y dos cadenas livianas (L) idénticas entre sí, unidas a las cadenas H por

puentes disulfuro. La porción amino-terminal (N terminal) de ambas cadenas constituye la región variable de la Ig responsable del reconocimiento antigénico, mientras que la porción carboxi-terminal (C terminal) constituye la región constante de la Ig. Las distintas zonas constantes de la cadena H (CH) dan lugar a los diferentes tipos o clases de anticuerpos conocidos (IgM, IgG, IgA, IgE e IgD) y tienen 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 [40, 42-43].

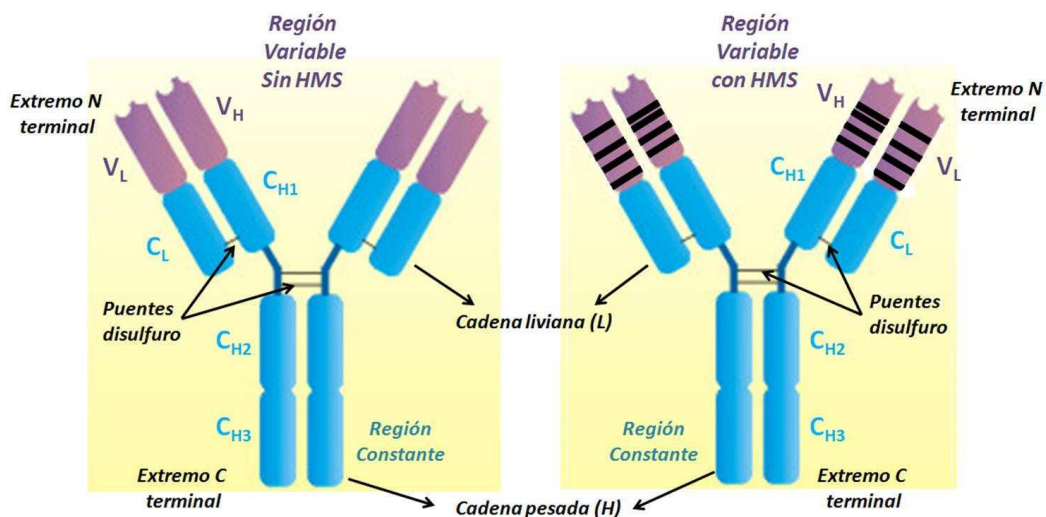


Figura 3. Estructura de las inmunoglobulinas. La molécula de Ig está compuesta por dos cadenas pesadas (H) idénticas (PM: 50 kDa) y dos cadenas livianas (L) idénticas (PM: 25 kDa) unidas por puentes disulfuro. Las cadenas livianas están compuestas por dos dominios tipo inmunoglobulina mientras que las cadenas pesadas contienen entre 3 y 4 dominios de Ig dependiendo del isotipo. Los dominios N terminales de las cadenas pesadas y livianas constituyen la región variable de la Ig (violeta), responsable del reconocimiento antigénico, mientras que el resto de los dominios de las cadenas pesadas y livianas constituyen la región constante de la Ig (celeste). Las líneas negras en la región variable de la Ig de la derecha representan los cambios de bases introducidos por el proceso de hipermutación somática (HMS), y a la izquierda se esquematiza una Ig que no ha sufrido dicho proceso.

Durante la ontogenia de los linfocitos B, se generan Igs que presentan una secuencia de aminoácidos en las porciones variables de las cadenas H (VH) y L (VL) que es característica de cada linfocito B, existiendo millones de moléculas

distintas de Igs en un mismo individuo, un tipo particular expresada por cada linfocito B maduro. 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 ontogenia 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 denomina **hipermutación somática** y ocurre en los tejidos linfáticos secundarios (nódulos linfáticos, bazo, placas de Peyer) durante la formación del centro germinal que se da 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.

En el año 1994 el Dr. Guillermo Dighiero del Instituto Pasteur de París, demostró que en LLC los genes que codifican para la porción variable de la cadena pesada de la Ig (IgVH) presentan mutaciones en alrededor del cincuenta por ciento de los pacientes [44]. Estas observaciones fueron posteriormente confirmadas por otros autores, y dieron lugar a la clasificación de 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. Dado que, como se mencionó anteriormente, la hipermutación somática ocurre luego del reconocimiento del antígeno, 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. De este modo, en el grupo de los pacientes con IgVH no mutados, la malignización de la célula leucémica se habría producido previo al contacto con el antígeno, mientras que en el grupo de pacientes con IgVH mutados, la malignización habría sido posterior al contacto antigénico. Sin embargo, al estudiar en profundidad 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 [45] y por lo tanto expresan las proteínas CD23, CD25, CD69, CD71 y altos niveles de HLA-DR [45-46]. 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 o autoantígenos involucrados en el proceso de malignización del clon leucémico. Sin embargo, varios trabajos publicados en el año 2004, demostraron que la porción variable de las cadenas de la Ig clonal, la cual interacciona con el determinante antigénico, es llamativamente similar entre distintos pacientes LLC (alrededor del veinte por ciento 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 [47-50].

2.c. Clasificación de los pacientes con LLC

La LLC es una patología que presenta una notable heterogeneidad clínica y los pacientes presentan una expectativa de vida muy variable al momento del diagnóstico. El curso clínico de la enfermedad oscila entre pacientes de buen pronóstico que presentan una enfermedad estable e indolente con una expectativa de vida similar a la de las personas sanas, y un grupo de pacientes de mal pronóstico, que debutan con una enfermedad agresiva o progresan rápidamente, falleciendo a los pocos años luego del diagnóstico [51-52]. Sin embargo, la existencia de ciertas características comunes en cuanto a los síntomas clínicos son utilizadas para clasificar a los pacientes con LLC en estadios clínicos determinados. Los dos sistemas de clasificación más difundidos a nivel internacional son los descritos por Rai [53] y Binet [54] (**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. Si bien 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. Por este motivo es de gran importancia la identificación de marcadores biológicos e inmunológicos con valor predictivo que posibiliten la elección de una conducta terapéutica adecuada.

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

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

La heterogeneidad de la LLC a nivel clínico se correlaciona con la heterogeneidad a nivel de la célula leucémica. En el año 1999 fue reportado que el estatus mutacional de los pacientes con LLC posee un importante valor predictivo ya que los pacientes pertenecientes al grupo mutado y no mutado

tienen una expectativa de vida significativamente diferente [55]. Así, la ausencia 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 cincuenta por ciento 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 supervivencia superior a los 20 años. Posteriormente se determinó que las células leucémicas con IgVH mutados y no mutados difieren también en la expresión de la proteína quinasa ZAP-70 (*ξ-associated protein*), estando ésta presente en el grupo no mutado [56-57]. ZAP-70 es una proteína quinasa normalmente expresada 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). Poco tiempo después se desarrolló una técnica para evaluar la expresión de ZAP-70 por citometría de flujo [56], la cual fue puesta a punto en nuestro laboratorio en el año 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 ese mismo año han demostrado que ZAP-70 tiene un valor pronóstico igual o mayor aún que el estatus mutacional de la IgVH [58-59].

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 [60-66]. La molécula CD38 es una ectoenzima que sintetiza componentes claves para la regulación de los niveles intracitoplasmáticos de calcio [67] y su entrecruzamiento luego de interactuar con su ligando natural, el CD31, [68] o con anticuerpos específicos induce la transducción de señales y la activación celular en linfocitos T [69], células NK [70], linfocitos B normales [71] y las propias células LLC [72]. Si bien existe cierta controversia respecto de cuál de los dos marcadores es el que mejor predice la progresión de la enfermedad, diversos estudios demuestran que la determinación simultánea de ZAP-70 y CD38 posee mayor valor

pronóstico que la determinación de una sola de estas moléculas [73-76]. 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 [77-78].

El conjunto de estas evidencias resalta la importancia de estos marcadores para predecir el curso de la enfermedad en cada paciente LLC. Sin embargo, es necesario mencionar que tanto ZAP-70 como CD38, no constituyen simples marcadores de progresión sino que a su vez juegan un papel muy importante en la fisio-patología de la célula leucémica. En este sentido, se ha reportado que células LLC ZAP-70⁺ 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 [79]. Del mismo modo, otros autores han reportado resultados similares para las células LLC positivas para CD38 [80]. Dado que se ha propuesto que el BCR jugaría un papel central en la patogénesis de la LLC, este hecho es de gran relevancia en la fisiología de las células leucémicas ya que una mayor transducción de señales a través del mismo contribuiría al desarrollo de una enfermedad más agresiva [81-82]. 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 a las quimiocinas que pueden atraerlas hacia los órganos linfoides [83-84].

2.d. La importancia del microambiente en la patogénesis de la LLC

En los pacientes con LLC, más del noventa y nueve por ciento de los linfocitos B presentes en sangre periférica se encuentran en la fase G₀ del ciclo celular, lo cual tradicionalmente llevó a pensar que la acumulación del clon leucémico en la periferia se producía por defectos en el proceso apoptótico más que por una

desregulación de la proliferación celular [85-86]. Asimismo, las células LLC presentan una sobre-expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 [87] y se ha observado que responden pobremente a la estimulación con mitógenos *in vitro* [88]. Estas evidencias hicieron que fueran consideradas linfocitos inertes que poseen una mínima o nula capacidad proliferativa y fallas intrínsecas en el proceso de muerte celular programada.

Sin embargo, otra serie de evidencias se contraponen a esta idea. Por un lado, como se mencionó anteriormente, las células leucémicas expresan marcadores de activación similares a los que presentan los linfocitos B activados por el antígeno, independientemente del estatus mutacional de su inmunoglobulina, lo que sugiere que son células que ya han sido activadas a través del receptor antigénico [45, 89]. Asimismo, la longitud de los telómeros es menor en las células leucémicas en comparación a los linfocitos B normales, lo que indica que el clon leucémico ha transitado por varios ciclos de proliferación [90]. De hecho, las células leucémicas con IgVH no mutadas poseen telómeros mucho más cortos que las mutadas, lo que implica una mayor historia replicativa en el grupo de pacientes de mal pronóstico [90]. Por otro lado, las células leucémicas mueren por apoptosis con relativa facilidad al ser cultivadas *in vitro*, lo que indica que no poseen fallas intrínsecas del programa apoptótico y sugiere la existencia de factores del microambiente *in vivo* capaces de incrementar la supervivencia y favorecer la acumulación del clon leucémico [42, 91-92].

En la actualidad la LLC ha dejado de ser considerada una enfermedad caracterizada por la simple acumulación de células inertes e inclusive se ha demostrado en estudios de marcación *in vivo* en pacientes utilizando agua deuterada, que las células leucémicas proliferan y presentan una tasa de nacimiento más alta de la estimada, que alcanza valores de 0.1 a más del 1% del total del clon leucémico por día [93].

¿Dónde proliferan las células leucémicas? El conjunto de células leucémicas circulantes, que como se mencionó previamente, se encuentra en su gran mayoría arrestado en el estadio G₀ del ciclo celular, se mantiene e incrementa gracias al aporte de nuevos linfocitos del clon leucémico que proliferan principalmente en los nódulos linfáticos, pero también en la médula ósea y el bazo. La proliferación de las células LLC ocurre dentro de estructuras histológicas que reciben el nombre de centros proliferantes o *pseudofolículos* [92]. En estos nichos de supervivencia pueden observarse acúmulos de células leucémicas proliferantes en íntimo contacto con linfocitos T activados, muchos de ellos expresando la proteína de membrana CD40L, células estromales y un tipo de células de estirpe mieloide tipo nodriza, también llamadas *Nurse-like cells* (NLC), productoras de numerosos factores, entre los que se encuentra la quimiocina CXCL12 (Figura 4) [92].

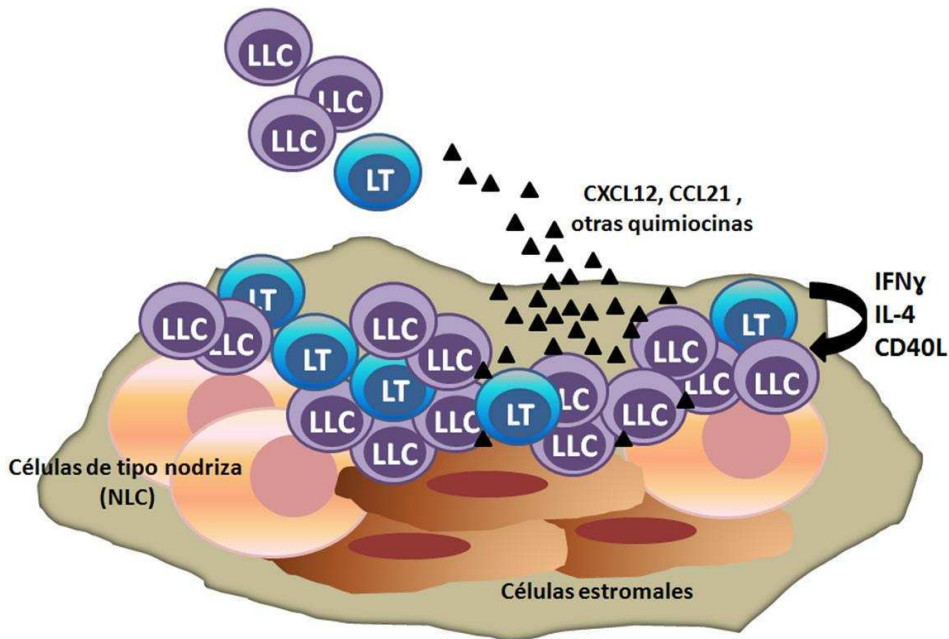


Figura 4: Centros proliferantes en ganglios linfoides y médula ósea de pacientes con LLC. En la figura se muestran las células leucémicas (LLC) proliferando en íntimo contacto con linfocitos T (LT), células estromales y células de tipo nodriza (NLC). También se esquematizan algunas de las quimiocinas que atraen a las células LLC y a los linfocitos T hacia esos sitios y las señales de supervivencia y proliferación que brindan los linfocitos T activados al clon leucémico.

¿Qué señales dirigen la migración de las células LLC hacia estos sitios?

El tráfico de los linfocitos desde la sangre hacia los tejidos linfáticos y otros tejidos periféricos es un proceso finamente regulado que se produce en pasos secuenciales e involucra la interacción de moléculas de adhesión con sus ligandos y de quimiocinas con sus respectivos receptores. Las quimiocinas CXCL12, CCL19, CCL21 y CXCL13 serían las responsables de la migración de las células LLC hacia los nódulos linfáticos [83, 94-95] estando sus receptores, el CXCR4 (para CXCL12), el CCR7 (para CCL19/21) y el CXCR5 (para CXCL13), expresados en mayores niveles en las células leucémicas en comparación a los linfocitos B normales [83, 96]. Asimismo, distintos estudios han demostrado una mayor respuesta a las quimiocinas CXCL12, CCL19 y CCL21 por parte 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. [83-84]. En conclusión, las células leucémicas de los pacientes de mal pronóstico tendrían una capacidad incrementada de acceder a los centros proliferantes, donde reciben 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 le brinda el microambiente tumoral a las células LLC? Hace más de una década nuestro grupo reportó que la presencia de los leucocitos que acompañan a las células leucémicas es capaz de prolongar la sobrevida de las células LLC en cultivo [97]. En este sentido, en algunos pacientes se encontró que tan sólo un 3-5% de células no-leucémicas en el cultivo logró que las células LLC duplicaran o triplicaran su sobrevida. Del mismo modo, 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 [98].

En los órganos linfoides los actores principales que favorecen la acumulación del clon leucémico son los linfocitos T activados, las células estromales y las NLC. En este sentido, las células LLC expresan altos niveles del receptor CXCR4 [96, 99] e interactúan con el CXCL12 producido por las células estromales y las NLC. Ha sido demostrado que esta quimiocina no actúa simplemente como un factor quimioattractante que dirige la migración de las células LLC hacia esos sitios sino que también constituye un factor de supervivencia para el clon leucémico [100]. Así, las NLC de los pacientes con LLC, que pueden diferenciarse *in vitro* a partir de una subpoblación de leucocitos CD14⁺ provenientes de células mononucleares de sangre periférica de pacientes, son capaces de proteger a las células LLC de la apoptosis a través de la expresión de CXCL12, BAFF, APRIL, CXCL13, CD31 y VCAM-1, entre otras [99-103].

Otra de las señales que reciben las células leucémicas proviene del entrecruzamiento de la molécula CD40 sobre su superficie a consecuencia de su interacción con la molécula CD40L expresada, principalmente, por los linfocitos T activados. Esto favorece un marcado incremento en la expresión de moléculas de adhesión y de co-estimulación, además de un aumento en la proliferación y producción de diversas citoquinas [104]. En este sentido, se ha demostrado que la interacción del 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 [105-106]. Asimismo, esta interacción también incrementa la producción de la quimiocina CCL22 por parte del clon leucémico, la cual atrae a más linfocitos T CD4⁺ activados (que expresan CD40L), perpetuando el círculo de activación tumoral. La activación a través del BCR o el cultivo de las células leucémicas en presencia de NLC, también favorece que las células LLC secreten otras quimiocinas capaces de atraer a los linfocitos T y los

monocitos, como son CCL3 y CCL4 [107]. De esta manera, las propias células leucémicas favorecen la generación de un microambiente anti-apoptótico y activador que se retroalimenta continuamente permitiendo la progresión de la enfermedad.

2.e. Los linfocitos T de los pacientes con LLC

2.e.i. Características de los linfocitos T de los pacientes con LLC

Ha sido demostrado a través de numerosos estudios, algunos de ellos reportados por nuestro grupo [108], que los linfocitos T de los pacientes con LLC presentan diversos defectos en su funcionalidad y particularidades en su distribución y fenotipo. Estas evidencias han contribuido a la comprensión de la compleja relación existente entre los linfocitos T, las células leucémicas y el resto del microambiente tumoral y a explicar por qué los linfocitos T de los pacientes no son capaces de montar una respuesta anti-tumoral frente al clon leucémico sino que, por el contrario, contribuyen a su supervivencia y proliferación.

En muchos pacientes se observa un aumento en el número absoluto de linfocitos T, a pesar de que su porcentaje se encuentra disminuido como consecuencia de la expansión del clon leucémico. Asimismo, la relación entre las subpoblaciones T CD4:CD8 en la sangre periférica suele presentar alteraciones, debido a un aumento en la proporción de las células CD8⁺ circulantes y a una prevalencia de las CD4⁺ en la médula ósea y en los ganglios comprometidos. Asimismo, si se los compara con donadores sanos de edad y sexo similar, los pacientes LLC presentan una mayor proporción de linfocitos T que expresan CD45RO, una molécula característica de células efectoras y de memoria y una menor proporción de linfocitos T CD45RA⁺, fenotipo que caracteriza a los linfocitos T vírgenes [109]. Además, en una gran proporción de los pacientes, se ha descrito

una expansión oligoclonal tanto en las poblaciones T CD4⁺ como en las CD8⁺ [110-111].

A nivel de la funcionalidad, ha sido reportado que los linfocitos T de los pacientes con LLC se activan y proliferan menos que los linfocitos T de dadores sanos en respuesta a mitógenos convencionales como PHA o PWM (*pokeweed mitogen*) [112-113]. Asimismo, nuestro grupo [108] y, más recientemente, el grupo del Dr. Gribben [114] demostramos que el contacto con las células leucémicas induce defectos en la capacidad migratoria de los linfocitos T de los pacientes con LLC. También se ha reportado que los linfocitos T de los pacientes con LLC presentan un perfil de expresión génica distinto al compararlo con los linfocitos T de dadores sanos de edad similar, el cual es inducido por el contacto con el propio clon leucémico [115]. En el caso de la población CD4⁺ de los pacientes con LLC, los genes menos expresados están involucrados en la diferenciación celular y la formación del citoesqueleto, mientras que en la subpoblación CD8⁺ se trata de genes asociados con la organización del citoesqueleto, el tráfico vesicular y la función citotóxica. Un trabajo posterior demuestra que los linfocitos T de los pacientes con LLC que presentan defectos en la polimerización de actina inducidos por el contacto con las células leucémicas, exhiben a su vez defectos en la formación de la sinapsis inmunológica con otras células presentadoras de antígeno [116]. Estos defectos que presentan los linfocitos T de los pacientes, afectan no solo su habilidad de reconocimiento antigénico sino también la capacidad de mediar una eficiente función citotóxica. Si bien varios trabajos han reportado la presencia de células T con TCR oligoclonales, presentando algunos de estos clones especificidad por antígenos presentes en las células leucémicas autólogas [110, 117-118], la respuesta anti-tumoral es claramente defectuosa. Esta incapacidad de los linfocitos T de los pacientes de montar una efectiva respuesta antitumoral involucra también características propias del clon leucémico. En este sentido, las células leucémicas no resultan buenas células presentadoras de antígenos ya

que carecen de niveles adecuados de expresión de moléculas co-estimuladoras para inducir la activación de los linfocitos T [119].

En la actualidad, no hay dudas acerca del papel central que juegan los linfocitos T en la patogénesis de la enfermedad. En el año 2008, Roth y colaboradores reportaron que los linfocitos T de los pacientes de buen y mal pronóstico difieren en el largo de sus telómeros [120], lo cual indica una diferencia en la historia replicativa de los linfocitos T de ambos grupos de pacientes. En este estudio se observó que las células T de los pacientes ZAP-70⁺ (de mal pronóstico) presentan una historia replicativa significativamente mayor a la de los linfocitos T de los pacientes ZAP-70⁻ ya que el largo de los telómeros es menor en las células T del primer grupo de pacientes. Esto demuestra que las células T de los pacientes de mal pronóstico sufrieron más ciclos de proliferación, lo cual sugiere un posible rol para estas células 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 en esta patología empleando un modelo de transferencia adoptiva de células mononucleares de pacientes LLC en ratones [121]. En este trabajo, demuestran que para que las células leucémicas logren sobrevivir y proliferar en los ratones, es necesaria la presencia de linfocitos T autólogos (que se encuentran en las muestras de células mononucleares de los pacientes LLC que se inoculan a los ratones) activados *in vivo* por reconocer aloantígenos [121]. Incluso, en este estudio observan que la proliferación de las células leucémicas *in vivo* es precedida y acompañada por la proliferación de los linfocitos T autólogos [121].

En cuanto a la secreción de citoquinas, se ha reportado que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de los pacientes con LLC secretan mayores niveles de IFN γ , si se los compara con los linfocitos T de dadores sanos [25]. Esta citoquina ha mostrado un claro efecto anti-apoptótico sobre las células leucémicas *in vitro* y

a su vez parecería ser relevante *in vivo*, ya que se han encontrado mayores niveles de IFN γ en el suero de pacientes LLC en comparación a los dadores sanos [122-123]. Por otro lado, existen reportes que indican que los linfocitos T de los pacientes tienden a producir un perfil de citoquinas TH2, con predominio de la citoquina anti-apoptótica IL-4 [124]. En este sentido, ha sido demostrado que el agregado de IL-4 a cultivos de células LLC inhibe la apoptosis de las células leucémicas, tanto espontánea como inducida por distintos agentes citotóxicos [104, 123, 125], efecto que sería mediado a través de un incremento en los niveles de Bcl-2 en las células leucémicas [125]. A su vez, un trabajo reciente reportó que los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de los pacientes con LLC protegen de la apoptosis espontánea a las células leucémicas autólogas y no así a células B de dadores sanos [126]. Este efecto fue mayor con cantidades crecientes de linfocitos T y fue parcialmente mediado por IL-4 [126]. Asimismo, fue reportado que los pacientes con LLC presentan mayores niveles de linfocitos T de perfil “*follicular helper*” (*Tfh*) al compararlos con dadores sanos de edad similar [127]. Estos linfocitos producen interleuquina 21 (IL-21), una citoquina esencial en las respuestas de linfocitos B en el centro germinal [128], y la presencia de esta subpoblación ha sido confirmada en los órganos linfoides de los pacientes LLC donde interactuaría con el clon leucémico [127]. A pesar de que existen controversias en relación al efecto de la IL-21 en la supervivencia de las células LLC [129], no hay dudas en relación a que su combinación con IL-4, promueve una marcada proliferación de las células leucémicas en los órganos linfáticos de los pacientes [127]. Asimismo, ha sido reportado que el tratamiento *in vitro* de las células leucémicas con IL-21 en combinación con CD40L soluble incrementa el número de células leucémicas resistentes a la quimioterapia y con mayor capacidad proliferativa [127]. En su conjunto, estas evidencias demuestran el papel central que juegan los linfocitos T en la patogénesis y progresión de la LLC.

2.e.ii El efecto de las células tipo nodriza (NLC) y el CXCL12 sobre los linfocitos T de los pacientes con LLC

Desde hace más de una década nuestro grupo de trabajo se centró en el estudio del microambiente que rodea a las células leucémicas de los pacientes con LLC (Ver **sección 2.d**). En relación a los linfocitos T de los pacientes, hemos demostrado que, a pesar de poseer una capacidad migratoria disminuida si se los compara con los linfocitos T provenientes de dadores sanos, son capaces de responder a las quimiocinas CCL19, CCL21 y CXCL12, responsables de atraerlos a los tejidos linfáticos secundarios [108]. Asimismo, encontramos que, a pesar de expresar niveles similares del receptor CXCR4, los linfocitos T de los pacientes de buen pronóstico (ZAP-70⁻) migran menos en respuesta al CXCL12 que los linfocitos T de los pacientes de mal pronóstico (ZAP-70⁺), hecho que podría dificultar su acceso a los órganos linfoides favoreciendo de ese modo un curso más indolente de la enfermedad [108]. También reportamos recientemente que el CXCL12 posee un rol dual para la fisiología de los linfocitos T de los pacientes, actuando no solo como quimioattractante, sino también como un factor que incrementa su activación [130]. Así, encontramos que el CXCL12 logró incrementar la activación y proliferación de los linfocitos T inducida por el entrecruzamiento de su receptor antigénico y, más interesante aún, observamos que la mayor activación de los linfocitos T inducida por el CXCL12 repercutió en una mayor activación y proliferación del propio clon leucémico [130]. Por otra parte, tal como se muestra en la **Figura 5** demostramos que los linfocitos T, tal como ya se sabía para las células leucémicas [100], son capaces de contactar con las NLC autólogas *in vitro*, las cuales incrementan la activación y la proliferación de los linfocitos T en parte a través de la producción de CXCL12 [130].

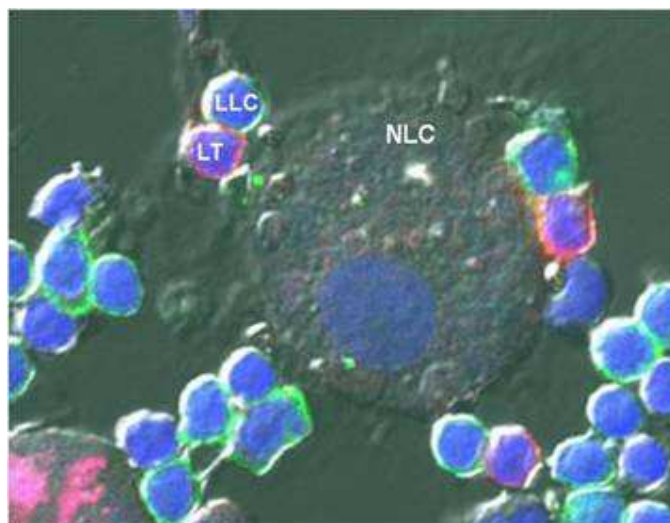


Figura 5: Las células de tipo nodriza contactan con linfocitos T CD4⁺ autólogos de pacientes con LLC. A partir del cultivo de CMT de pacientes con LLC se diferenciaron NLC tal como se detalla en Materiales y Métodos. A continuación, se cultivaron por 24 horas con CMT autólogas, luego fueron fijadas y marcadas con anticuerpos específicos para su análisis por microscopía confocal. Se utilizaron anticuerpos específicos para CD19 conjugados a FITC (verde) y para CD4 conjugado a PE (rojo), los núcleos se evidenciaron con TOPRO-3 (azul). Foto tomada de Borge M, Nannini P y col[130].

En conjunto, nuestros resultados sugieren que, una vez que los linfocitos T de los pacientes acceden a los órganos linfoides, atraídos por las quimiocinas CCL19, CCL21 y CXCL12, la presencia de CXCL12 producido por las células estromales y NLC de los tejidos optimizará su activación favoreciendo la generación de un microambiente próspero para la proliferación y supervivencia del clon leucémico. En este trabajo de Tesis estudiamos si las NLC que participan de esos nichos de supervivencia incrementan la sobrevida de los linfocitos T de los pacientes.

2.f. Tratamiento de los pacientes con LLC

2.f.i. Los principales agentes terapéuticos en LLC

Para el caso de los pacientes con LLC la conducta terapéutica más extendida es la de esperar a que el paciente progrese de un estadio más indolente a uno más comprometido para iniciar el tratamiento quimioterápico (conducta comúnmente conocida como “*watch and wait*”) [131]. Sin embargo, y a pesar de los avances en la comprensión de la biología de la LLC y de las mejoras obtenidas con las nuevas conductas terapéuticas, la LLC permanece como una enfermedad incurable aún en la actualidad ya que a corto o largo plazo, los pacientes recaen luego de la terapia.

En la década de los 50', el tratamiento estándar para esta patología lo constituyeron los agentes alquilantes, como el clorambucilo. Posteriormente, en el año 1980, comenzaron a incorporarse al tratamiento los análogos de nucleósidos, siendo en el año 1991 que la fludarabina se aprobó para su utilización clínica [132-133]. Actualmente, el tratamiento de primera línea más efectivo en la LLC es el que combina fludarabina, el agente alquilante Ciclofosfamida y el anticuerpo monoclonal anti-CD20, Rituximab (FCR), ya que logra una mayor respuesta al tratamiento y un aumento en la sobrevida total de los pacientes en comparación al tratamiento con fludarabina como monodroga y a la terapia con los agentes alquilantes como el clorambucilo [134-138]. Vale la pena mencionar, sin embargo, que para los casos de los pacientes refractarios al tratamiento con fludarabina, como por ejemplo los que presentan anormalidades citogenéticas que anulan la función del gen p53 (como la delección 17p), así como también aquellos que presentan mutaciones en este gen, el anticuerpo anti-CD52 o Alemtuzumab es el tratamiento de elección [139-141].

Los principales efectos adversos que se observan en la terapia con fludarabina son la mielosupresión e inmunosupresión los cuales predisponen a los pacientes a padecer infecciones secundarias y la necesidad de retrasar o discontinuar la terapia [136, 142]. Por otra parte, los pacientes pueden presentar o exacerbar cuadros de anemia hemolítica autoinmune y, en menor medida, púrpura trombocitopénica autoinmune, como una complicación asociada al tratamiento [142-143]. Asimismo, el tratamiento con fludarabina causa una marcada disminución de los linfocitos T en sangre periférica que puede persistir por más de un año luego de finalizado el tratamiento [144] e incrementa la incidencia de infecciones severas que padecen los pacientes [145-146]. Luego del tratamiento los pacientes suelen presentar una disminución en la relación CD4:CD8 de sangre periférica [144], lo que sugiere que los linfocitos T CD4⁺ serían más sensibles a la apoptosis inducida por fludarabina que los linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, nuestro grupo demostró en un trabajo publicado en el año 2003, que los linfocitos T CD8⁺ son más susceptibles que los linfocitos T CD4⁺ a la apoptosis inducida por fludarabina *in vitro* [147]. Nuestras observaciones sugieren que la menor relación CD4:CD8 observada post tratamiento podría deberse a que la subpoblación T CD8⁺ prolifera y se recupera más rápidamente que la subpoblación T CD4⁺. Asimismo, las diferencias podrían deberse a una redistribución de estas subpoblaciones, con una migración preferencial de los linfocitos T CD4⁺ a los tejidos linfoides luego del tratamiento con fludarabina. Como parte de este trabajo de Tesis hemos evaluado la posibilidad de que la fludarabina module la migración y/o la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de los pacientes.

2.f.ii. El impacto del microambiente tumoral de los órganos linfoides en la efectividad del tratamiento quimioterápico

Si bien la quimioterapia logra reducir o eliminar en un primer momento los linfocitos leucémicos presentes en la sangre periférica de los pacientes, el clon maligno puede sobrevivir al tratamiento dentro de los órganos linfoides haciendo que a corto o largo plazo el paciente recaiga. Tal como se mencionó anteriormente, es justamente dentro de los órganos linfoides, en íntimo contacto con las células del estroma, las NLC y con los linfocitos T activados, donde la célula LLC encuentra el nicho ideal que promueve su proliferación y sobrevida (**ver Figura 4**). En este sentido, ha sido demostrado que las NLC y las células estromales son capaces de inhibir la apoptosis inducida por el tratamiento con drogas pro-apoptóticas como la fludarabina, en parte a través de la producción de CXCL12 [148-149]. Esta quimiocina no sería la única molécula involucrada en este proceso, ya que se ha reportado que las NLC y las células estromales son capaces de proteger de la apoptosis inducida por drogas a las células LLC a través de otras moléculas como BAFF, APRIL, CD31 y VCAM-1, entre otras [150-155]. En cuanto a los linfocitos T, tal como se detalló en la **sección 2 e**, ha sido reportado que éstos secretan las citoquinas IL-4 e IFN γ que promueven la sobrevida del clon leucémico y son también capaces de proteger a las células leucémicas de la apoptosis inducidas por drogas [98, 125].

Los resultados obtenidos con muestras de ganglios, bazo y/o médula ósea de pacientes con LLC confirman que el microambiente que rodea al clon leucémico en los centros proliferantes favorece su activación [156-159]. Es por ello que las nuevas herramientas terapéuticas centran su interés en movilizar a las células leucémicas de estos nichos de supervivencia a fin de hacerlas más susceptibles al tratamiento [150, 160-161]. Así, una de las estrategias que se encuentra bajo estudio en Fase I planea hacer más susceptibles a las células LLC

a la inmunoterapia gracias al empleo de AMD3100 (también llamado Plerixaflor), un inhibidor del CXCR4 (el principal receptor de la quimiocina CXCL12) que dificultaría la interacción del clon leucémico con el CXCL12 producido por las NLC y células estromales de los órganos linfoides favoreciendo de ese modo, la salida de las células hacia la circulación [162].

Es por todo esto que los centros proliferantes constituyen el nicho de supervivencia donde las células LLC se mantienen protegidas de los efectos de la quimioterapia convencional, constituyendo un lugar propicio para la recuperación del clon leucémico luego del tratamiento y la consecuente recaída del paciente. Hasta el momento no había sido estudiado si este microambiente de los nichos de supervivencia protegía también a los linfocitos T de los pacientes de la apoptosis inducida por fludarabina.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de Tesis fue estudiar los mecanismos que podrían estar involucrados en la falla terapéutica de los pacientes con LLC, centrándonos en el efecto de la fludarabina y el microambiente tumoral en la supervivencia y funcionalidad de los linfocitos T de los pacientes.

Como **objetivos particulares** nos propusimos:

- 1- Evaluar el efecto de las células tipo nodriza (*nurse-like cells*, NLC) sobre la apoptosis espontánea e inducida por fludarabina de los linfocitos T de los pacientes con LLC.
- 2- Estudiar el efecto del tratamiento con fludarabina *in vitro* sobre la proliferación y migración de linfocitos T de los pacientes con LLC.
- 3- Empleando ratones BALB/c, estudiar la distribución de los linfocitos en los órganos linfáticos luego del tratamiento *in vitro* e *in vivo* con fludarabina.

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, Na₂HPO₄ 0,078M y KHPO₄ 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, y con 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina. Todos de GIBCO Laboratories (Grand Island, USA). El medio de cultivo empleado en el cultivo de células de ratones fue suplementado con 2-mercaptoetanol Gibco (1/1000).

d. Solución de lisis

Se empleó una solución de lisis para eliminar los glóbulos rojos de las muestras de sangre periférica de los ratones BALB/c previo a las inmunomarcaciones y análisis mediante citometría de flujo. La solución de lisis se preparó diluyendo 8,2 grs. de CINH₄, 1 gr. de KHCO₃ y 0,037grs. de EDTA₂H₂O en 1 litro de agua destilada.

e. Solución de Ficoll-Triyosom

Para la purificación de células mononucleares de sangre periférica de pacientes se utilizó una solución isotónica de Ficoll 400 de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA) y Triyosom 50 (aminotriozato sódico 50%) de Justesa Imagen Argentina S.A (Bs.As. Argentina), densidad 1,077 g/cm³. En el caso de la purificación de CMT de bazo de ratones BALB/c, la densidad fue de 1,099 g/cm³.

f. Fludarabina

Fludara[®] 50 mg (fludarabina fosfato) se obtuvo de Schering Argentina (Buenos Aires). El liofilizado se reconstituyó con agua bidestilada para obtener una solución isotónica de 25 mg/ml. La preparación se alicuotó y congeló inmediatamente a -20°C. Las alícuotas se descongelaron inmediatamente antes de su empleo y se diluyeron en medio de cultivo protegiéndose de la luz. Para el caso del tratamiento *in vivo* de los ratones BALB/c, la fludarabina empleada se reconstituyó con agua bidestilada a una concentración final de 10 mg/ml y se mantuvo a 4°C protegida de la luz.

g. Reactivos para la evaluación de apoptosis

Los colorantes bromuro de etidio, Naranja de Acridina y el compuesto 7 amino-actinomicina-D (7-AAD) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA).

h. Anticuerpos, perlas magnéticas y quimiocinas

Las quimiocinas CXCL12/SDF-1 y CCL21 empleadas fueron obtenidas de PeproTech (DF, Mexico). Los siguientes anticuerpos fueron adquiridos en BD Bioscience, Pharmigen (CA, USA): anticuerpos monoclonales (mAc) conjugados a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)-, Ficoeritrina (PE)- o Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP-Cy™5.5)-específicos para CD3 (clon SK7), CD4 (clon RPA-T4 and clone SK3), CD19 (clon SJ25C1), ZAP-70 (clon 1E7.2) y anticuerpos con especificidad irrelevante (controles de isotipo). El mAc para CD56 (clon

N901) conjugado a PE se obtuvo de Immunotech (Marseille, Francia). El Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) se obtuvo de Invitrogen Argentina Ltd (Bs. As. Argentina).

Para la purificación de linfocitos T de los pacientes se usaron mAbs 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 12.G5) fue gentilmente donado por la Dra. Ana Ceballos del Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires – CONICET, Argentina. Para la activación de linfocitos T se usaron mAb específicos para CD3 humano (clon UCHT1) donado por la Dra. Claire Hivroz del Institut Curie (Paris, Francia). El Dimetilsulfoxido (DMSO) se obtuvo de Sigma Aldrich. Para las marcación intracitoplasmática de ZAP-70, se utilizó el Kit Fix&Perm de Caltag Laboratories (Burlingame, USA).

Para las inmunomarcaciones de células de ratones se emplearon los siguientes anticuerpos de Biolegend: mAbs conjugados a PE, PerCP o FITC específicos para CD8 (clon 53-6.7), CD4 (clon GK1.5), CD19 (clon 6D5).

2. Pacientes LLC

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. En todos los casos los pacientes 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. Los pacientes incluidos en el estudio se encontraban con una enfermedad estable al momento de

extracción de las muestras y libres de tratamiento, a excepción de cuatro de ellos que habían recibido tratamiento con anterioridad al momento de la extracción de la muestra. La terapia en cada caso fue FCR (2 pacientes tratados un año antes), Clorambucilo (8 años antes) y Rituximab (9 años antes). El haber recibido tratamiento previo no modificó ninguno de los parámetros evaluados en este trabajo de tesis. En cuanto a la expresión de ZAP 70, un 27% de los pacientes fue negativo para este marcador pronóstico (línea de corte 20%) y el 73% restante expresó este marcador en sus células leucémicas. El promedio de edad de los pacientes fue de 70 años.

3. Obtención de células mononucleares y criopreservación de las muestras

Las 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 criopreservadas en 10% de DMSO en nitrógeno líquido hasta su utilización. La viabilidad de las muestras utilizadas luego de la criopreservación se evaluó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el colorante bromuro de etidio y naranja de acridina.

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

La diferenciación de NLC se realizó tal como está descrito en la literatura [100]. Brevemente, se cultivaron CMT de sangre periférica de pacientes con LLC a una concentración de 5×10^6 células /ml de medio completo en placas de 48 pocillos. Luego de 14 días de cultivo en estufa gaseada a 37°C se retiraron las células no adherentes y las NLC (células grandes, redondeadas y adherentes) se emplearon para los experimentos de co-cultivo con linfocitos T, luego de lavarlas exhaustivamente con PBS 1X. A partir de las células no adherentes se purificaron los linfocitos T para los experimentos de co-cultivo.

5. Purificación de linfocitos T

Los linfocitos T de pacientes con LLC se purificaron a partir de las CMT o a partir de las células no adherentes de los cultivos de NLC, por selección negativa utilizando anticuerpos específicos para CD19, CD14 y CD56 y perlas magnéticas como se describió anteriormente [97]. Brevemente, las células se incubaron con los anticuerpos específicos para CD14, CD56 y CD19 por 30 minutos a 4°C, luego se lavaron 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 CD4. Se trabajó con una pureza de células CD3⁺ superior al 90%.

6. Co-cultivos de NLC y linfocitos T

Tal como se describió en el apartado 4 de ésta sección, se obtuvieron las NLC por diferenciación en el cultivo de CMT de los pacientes y a partir de las células no adherentes se realizó la purificación de los linfocitos T. A continuación, los

linfocitos T puros se cultivaron en placas de 48 pocillos en medio completo en ausencia o presencia de las NLC autólogas y en ausencia o presencia de fludarabina 0.1, 1 ó 10 $\mu\text{g/ml}$. La viabilidad general del cultivo fue evaluada luego de 1, 2, 3, 6 y 9 días por tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina y microscopía de fluorescencia. Asimismo, se realizaron inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 y CD4 conjugados a PerCP y PE, respectivamente, a fin de analizar por citometría de flujo la proporción de estas poblaciones de linfocitos que presentaran el tamaño y granularidad celular característico de linfocitos viables.

a. Bloqueo del receptor CXCR4 en los linfocitos T

Para los experimentos de bloqueo del CXCR4, los linfocitos T purificados se pre-incubaron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-CXCR4 (12.G5) a 37°C por 1 hora y a continuación se cultivaron en ausencia o presencia de NLC autólogas y en ausencia o presencia de fludarabina.

7. Determinación de la apoptosis por microscopía de fluorescencia

A fin de evaluar la apoptosis por microscopía de fluorescencia se utilizaron los colorantes Naranja de Acridina (100 $\mu\text{g/ml}$) y Bromuro de Etidio (100 $\mu\text{g/ml}$), con el objeto de discriminar células viables y apoptóticas. Con esta metodología, los núcleos de células viables se tiñen de verde por la presencia del colorante naranja de acridina y muestran variaciones en su intensidad de fluorescencia, reflejando la distribución de eucromatina y heterocromatina (**Figura 6 A**). Por el contrario, los núcleos apoptóticos se caracterizan por presentar una cromatina marcadamente condensada, que se tiñe de manera uniforme con el colorante naranja de acridina (**Figura 6 B**). En la apoptosis avanzada, se pierde la integridad de la membrana permitiendo la entrada del bromuro de etidio a las células tiñendo los núcleos de

color naranja intenso (**Figura 6 C**). En el caso de las células necróticas, el bromuro de etidio puede entrar a las mismas ya que han perdido la permeabilidad selectiva de su membrana por lo que se tiñen de color naranja y presentan variaciones en la intensidad de fluorescencia ya que no han sufrido el proceso de condensación de la cromatina [163]. Para establecer los porcentajes de células apoptóticas, se examinaron al menos 200 células en cada experimento.

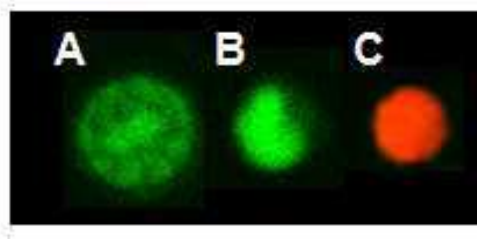


Figura 6: Determinación de viabilidad celular por la técnica de tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina. Micrografías representativas de microscopía de fluorescencia de CMT (Ver detalles en el texto) **A.** Célula viable. **B.** Célula apoptótica. **C.** Célula apoptótica tardía.

8. 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. Luego de las marcaciones, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en *Buffer Isoflow* de Becton Dickinson para ser analizadas inmediatamente en el citómetro.

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⁺ (linfocitos B, >98% células LLC) que expresan ZAP-70. El análisis de las células CD19⁺ 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 [164].

b. Determinación de la expresión de CD25 en los linfocitos T activados

Las CMT de los pacientes con LLC fueron cultivadas por 18hs en ausencia o presencia de fludarabina 1 y 5 µg/ml. Luego fueron lavadas 3 veces para eliminar la droga presente en el medio y se cultivaron en placa de 96 pocillos en ausencia o presencia de PHA 0,5 µg/ml. La expresión de CD25 sobre los linfocitos T CD3⁺ se evaluó por citometría de flujo luego de 24 y 48 horas de cultivo en presencia o ausencia de PHA. Para ello, las CMT se marcaron con anticuerpos específicos para CD25 o el correspondiente control de isotipo conjugado a PE y anticuerpos específicos para CD3 conjugado con PerCP.

c. Evaluación de la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ por citometría de flujo

Para evaluar la proliferación de las poblaciones T CD4⁺ y T CD8⁺, se utilizó el método de dilución de CFSE [165-166]. Para esto, las CMT resuspendidas en RPMI 1640 1% de SFB se marcaron con 1 µM de CFSE por 20 minutos en estufa a 37°C. A continuación, se lavaron 3 veces y fueron incubadas por 18 horas en RPMI 10% de SFB en presencia o ausencia de fudarabina (1 y 5 µg/ml). Posteriormente, se lavaron 3 veces a fin de eliminar la droga del medio de cultivo y fueron transferidas a una placa de 96 pocillos y estimuladas o no con PHA 0,25 µg/ml. Luego de 6 días de cultivo, las células se recolectaron y se marcaron con anticuerpos específicos para CD3(PerCP) y CD4 (PE) y se

adquirieron en el citómetro de flujo. El porcentaje de células que había proliferado se determinó evaluando el porcentaje de los linfocitos CD3⁺CD4⁺ (T CD4⁺) o CD3⁺CD4⁻ (T CD8⁺) con baja expresión de CFSE (respecto de la expresión de CFSE del cultivo en ausencia de PHA) dentro de la región de linfocitos viables.

d. Determinación de muerte celular por tinción con 7-actinomina D

La determinación de muerte celular de los linfocitos T de los pacientes con LLC se llevó a cabo evaluando la permeabilidad de la membrana celular al compuesto intercalante 7 AAD. En primer lugar se realizó la marcación de superficie con un anticuerpo específico para CD4 acoplado a FITC. Luego de lavarlas, las células fueron resuspendidas en PBS 0,5% BSA y se agregó el compuesto 7AAD a una concentración final de 3 µg/ml. Las células fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz e inmediatamente analizadas en citómetro de flujo.

e. Determinación del tamaño y granularidad de los linfocitos T

A fin de determinar la proporción de células viables en los cultivos de linfocitos T puros, analizamos los parámetros de tamaño y granularidad de las células por citometría de flujo. Los cambios en la morfología celular que acompañan el proceso de apoptosis pueden ser detectados a partir del análisis de la dispersión de la luz de una muestra de linfocitos por citometría de flujo, analizando el gráfico de puntos de tamaño vs. granularidad (FSC: *Forward Scatter Signal* vs. SSC: *Side Scatter Signal*) [167]. La reducción del tamaño celular producto de la deshidratación se refleja en una disminución de la dispersión de la luz del láser hacia adelante o FSC, mientras que en las etapas tempranas de la apoptosis se incrementa la dispersión de la luz láser hacia los lados o SSC (ángulo de 90°), a consecuencia de la condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo y el entrecruzamiento de proteínas citoplasmáticas. En las etapas tardías del proceso de apoptosis la dispersión de la luz en SSC se va reduciendo [168-170]. El análisis se realizó evaluando los parámetros FSC vs SSC, ambos en escala

lineal. Se estableció la región de células viables a partir del análisis de una muestra de linfocitos viables controles, excluyendo a las células de menor tamaño de esta región. Es importante destacar que esta metodología no permite distinguir células apoptóticas y células necróticas, así como también la presencia de restos celulares o núcleos aislados que pueden presentar iguales características que las células apoptóticas en cuanto a la dispersión de la luz láser por citometría de flujo. Sin embargo, en todos nuestros ensayos determinamos en paralelo la viabilidad por microscopía de fluorescencia, tal como se indicó previamente, la cual coincide con los resultados de viabilidad obtenidos por citometría de flujo [147].

Con el objetivo de determinar la proporción de linfocitos T que sufrieron transformación blástica como consecuencia de la activación con PHA, se analizó el tamaño celular por citometría de flujo evaluando el parámetro FSC en la población CD3⁺ correspondiente a la región de linfocitos viables [130, 165, 171]. Se determinó el porcentaje de células CD3⁺ grandes como la proporción del total de linfocitos CD3⁺ viables con valores de FSC superiores a 500.

9. Ensayos de migración *in vitro*

Para los ensayos de quimiotaxis se utilizaron Transwells de Corning Incorporated (NY, USA) de 96 pocillos, con membranas de policarbonato de 4,26mm de diámetro y poros de 5 μ m. En el compartimiento inferior se colocaron 200 μ l de medio RPMI 1640 (1% SFB, 100 μ g/ml estreptomina) conteniendo a la quimiocina correspondiente y en el compartimiento superior se colocaron 0,5 x 10⁶ CMT en 75 μ l del mismo medio. Como control se colocó en otro pocillo 200 μ l 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 CO₂ 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, CD4 PE y CD19 FITC. El recuento de estas células se realizó por citometría de flujo, determinando el número de células que son adquiridas en un minuto [172]. 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) [173]. Analizando los marcadores CD3, CD4 y CD19 por citometría de flujo, en cada caso se determinó el porcentaje de migración de la población T total (CD3⁺), la subpoblación CD4⁺(CD3⁺CD4⁺) y la CD8⁺(CD3⁺CD4⁻).

10. Microscopía confocal

Los CMT de los pacientes LLC fueron cultivadas durante 14 días con el objeto de obtener NLC. En ese momento, se purificaron los linfocitos T a partir de las células no adherentes presentes en el cultivo y se cultivaron en ausencia o presencia de las NLC autólogas. Luego de 6 días, se obtuvieron alícuotas de los linfocitos T en estas condiciones de cultivo se lavaron y se colocó una alícuota sobre un portaobjetos. Se agregaron 1,5 µl de los colorantes naranja de acridina y bromuro de etidio y 2 µl de *Fluoromont*. A continuación, se montaron cubreobjetos sobre los portaobjetos conteniendo las suspensiones celulares. Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) equipado de un objetivo de inmersión en aceite Plapon 603/1.42 y se analizaron las imágenes utilizando el programa de Olympus FV10-ASW.

11. Ratones BALB/c

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de 2-3 meses de edad, criados en el bioterio del Instituto de Medicina Experimental (IMEX) de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires según las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de Laboratorio, del Instituto Nacional de la Salud de los EE.UU (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

a. Obtención de suspensiones celulares de órganos linfoides murinos

Los ganglios linfáticos, bazos y médula ósea se extrajeron estérilmente, se disgregaron mecánicamente en PBS, con tijeras y a través de una malla metálica los ganglios y bazos y por pasajes a través de jeringas en el caso de la médula ósea. Para el aislamiento de células mononucleares a partir de bazo se utilizó un gradiente de ficoll hypaque (1,099 g/cm³).

b. Sensibilidad *in vitro* a fludarabina de esplenocitos de ratones BALB/c

Las CMT obtenidas de bazos de ratones se cultivaron en medio completo en una placa de 96 pocillos en ausencia o presencia de fludarabina 1, 5 y 25 µg/ml. Luego de 24 y 48hs se evaluó la viabilidad general del cultivo por microscopía de fluorescencia empleando los colorantes naranja de acridina y bromuro de etidio.

c. Ensayo de migración *in vivo*

Se purificaron las CMT a partir de bazos de ratones BALB/c como se detalló previamente. Las CMT fueron marcadas con el colorante CFSE como se describió anteriormente para las CMT humanas (*sección 8.c. Materiales y Métodos*), con una modificación en la concentración de CFSE, empleándose esta vez 1 µM para la mitad de las células y 10 µM para la otra mitad [174]. De este modo, las

células marcadas con CFSE 1 μ M fueron cultivadas en ausencia de fludarabina (células control) y aquellas marcadas con CFSE 10 μ M fueron incubadas en presencia de fludarabina 1 μ g/ml ó 5 μ g/ml durante 18 horas o 1 hora según se detalla en el texto en *Resultados*. El cultivo se realizó en placas de Petri a una concentración de 4×10^6 células/ml. Luego del tiempo de incubación con la droga, las células fueron lavadas y se evaluó su viabilidad por microscopía de fluorescencia, corroborando que el tratamiento no haya cambiado significativamente la viabilidad de las células tratadas con fludarabina respecto de las células controles. A continuación, se preparó una suspensión celular en PBS de células controles y tratadas con fludarabina 1:1 y se empleó para inocular en los ratones retro-ocularmente. En cada caso se inocularon 0,2 ml con un total de 20 millones de células por ratón. Transcurrido el tiempo determinado para la migración de las células inoculadas, se obtuvieron muestras de sangre periférica, luego los ratones fueron sacrificados y se extrajeron el bazo, los ganglios inguinales, y médula ósea a fin de evaluar por citometría de flujo la relación entre las poblaciones celulares CFSE 1 μ M : CFSE 10 μ M (control : fludarabina) en éstos órganos.

d. Tratamiento de ratones BALB/c con fludarabina *in vivo*

El esquema de tratamiento *in vivo* con fludarabina de los ratones BALB/c fue puesto a punto previamente en nuestro laboratorio y constó de 3 inoculaciones intra-peritoneales con fludarabina a 100 mg/Kg, administradas cada 48hs al grupo de ratones tratados con la droga, y paralelamente el mismo esquema fue aplicado al grupo de ratones controles inoculando PBS i.p. Luego de 48hs de la última inoculación, los ratones se sangraron a fin de obtener muestras de sangre periférica y luego fueron sacrificados. Se extrajeron los ganglios inguinales y axilares en esterilidad y fueron disgregados como se describió previamente para obtener una suspensión celular en PBS. A fin de determinar la presencia de linfopenia, las muestras de sangre entera se analizaron en un

analizador hematológico *Abacus Junior Vet* obteniéndose el porcentaje de linfocitos en la sangre de cada ratón. Por otra parte, se determinó el número de linfocitos totales presentes en los ganglios por recuento en cámara de Neubauer empleando el colorante Turk. Paralelamente las células de los ganglios y sangre periférica, previamente lisada, fueron marcadas con los anticuerpos antiCD8FITC, CD4PerCP y CD19PE a fin de determinar por citometría de flujo la proporción de las 3 subpoblaciones de linfocitos presentes.

e. Histología y Tinción Inmunohistoquímica

Luego de extraerlos, los ganglios fueron fijados en formalina buffer 10%, embebidos en parafina y cortados en secciones de 4 µm de grosor. Se empleó el protocolo estándar de tinción de hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar las características histológicas. Con el objetivo de evaluar la expresión de CD20, CD3 y Ki-67 en los ganglios inguinales de los ratones BALB/c (controles y tratados), se realizaron técnicas inmunohistoquímicas sobre los cortes de tejido fijados e incluidos en parafina. Brevemente, los especímenes se desparafinaron e hidrataron, y la actividad endógena de la enzima peroxidasa fue inhibida empleando 10% H₂O₂ en agua destilada. Las secciones fueron pre-tratadas a altas temperaturas para recaptura antigénica. Se utilizó solución bloqueante (10% SFC) antes de incubar con los anticuerpos específicos. Los anticuerpos CD20 policlonal (M-20, Lab. Santa Cruz Biotechnology), CD3 monoclonal (clon PC3/188^a, Lab. Santa Cruz Biotechnology) y Ki-67 policlonal (ab 15580, Abcam) fueron empleados en una dilución de 1/400, 1/250 y 1/300, respectivamente, e incubados durante toda la noche a 4°C. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado apropiado (*Vector Laboratories*) se utilizó el sistema de detección del complejo avidina-biotina-peroxidasa (*Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA*) y se desarrolló la reacción con el *KIT DAKO Cytomation Liquid DAB+ Substrate*

Chromogen System. A continuación, los especímenes fueron contrastados con hematoxilina, deshidratados y montados. La proporción de células Ki-67⁺ presentes en el área T fue calculada como la media observada en 10 campos con un aumento de 80X.

12. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *GraphPad Prism 5.0*. La significancia estadística se determinó utilizando las pruebas no paramétricas: *Wilcoxon signed rank test* o *Mann Whitney test* para comparar entre muestras pareadas o no pareadas respectivamente. La significancia estadística entre más de 2 grupos se analizó mediante las pruebas de ANOVA no paramétricas: *Friedman test* o *Kruskal Wallis test* para muestras pareadas o no pareadas, respectivamente. En el experimento de migración *in vivo* en ratones, la significancia de los valores CT/FLU de cada tejido con respecto al valor CT/FLU del inóculo, 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) y la Sección de Hematología de los Hospitales Bancario y Álvarez. En todos los casos los pacientes fueron informados acerca de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento por escrito. Las características generales de los pacientes incluidos en el estudio se encuentran detalladas en la sección de *Materiales y Métodos*. El proyecto contó con el aval del Comité de Ética de la Academia de Medicina de Buenos Aires. Asimismo, los experimentos realizados con los ratones en el marco del Objetivo N°3 cuentan con el aval del Comité de Ética para el Uso de Animales de Laboratorio del IMEX-CONICET-ANM.

RESULTADOS OBJETIVO N°1

1. Las células tipo nodriza (NLC) previenen la apoptosis espontánea de los linfocitos T de los pacientes con LLC.

Nuestro grupo reportó anteriormente que los linfocitos T de los pacientes con LLC son capaces de interactuar con las NLC autólogas (ver **Figura 5** de la introducción) y a consecuencia de ello incrementar su activación, en parte gracias al efecto del CXCL12 producido por las NLC que actúa sobre el CXCR4 expresado en los linfocitos T [130]. Sin embargo, no había sido estudiado hasta el momento si estas células lograban extender la supervivencia de los linfocitos T de los pacientes. Para abordar este punto, realizamos primeramente la diferenciación *in vitro* de las NLC y evaluamos luego su efecto sobre la apoptosis espontánea de los linfocitos T autólogos de los pacientes. La obtención de las NLC se realizó siguiendo el protocolo estándar [100] que consiste en cultivar a las CMT de los pacientes con LLC por 14 días, luego de lo cual se diferencian células con el fenotipo característico de las NLC: células grandes, adherentes, redondeadas, que expresan el marcador CD14 y se encuentran rodeadas de linfocitos. Posteriormente, las células no adherentes fueron retiradas y las NLC se lavaron exhaustivamente permaneciendo adheridas a la placa. A partir de las células no adherentes presentes en el cultivo se purificaron los linfocitos T por selección negativa empleando perlas magnéticas y anticuerpos específicos para CD19, CD14 y CD56, tal como lo hacemos rutinariamente [108], alcanzando en todos los casos una pureza superior al 90%. Los linfocitos T purificados fueron luego sembrados en placas de cultivo en presencia de las NLC autólogas o en ausencia de éstas. La viabilidad general del cultivo se evaluó diariamente desde ese momento (día cero de cultivo) y durante los 9 días subsiguientes por citometría de flujo evaluando el tamaño y la granularidad celular, ya que las

células apoptóticas se distinguen fácilmente de las células viables debido a que reducen su tamaño celular y aumentan la granularidad del citoplasma a consecuencia del proceso de apoptosis [175]. En el caso de los cultivos de linfocitos T solos, al considerar el porcentaje inicial de células presentes en la región de células viables como 100%, observamos que el mismo disminuyó al 75% y 50% a los 3 y 6 días de cultivo, respectivamente (**Figura 7 A**). Sin embargo, la presencia de las NLC autólogas mantuvo hasta un 95 y 90% de las células en la región de linfocitos viables a los días 3 y 6 respectivamente. Inclusive al día 9 de cultivo, la presencia de linfocitos T en la región de células viables llegó a ser inferior al 30% cuando fueron cultivados solos, mientras que mantuvo valores cercanos al 90% cuando éstos se encontraban en presencia de las NLC (**Figura 7 A**). En la **Figura 7 B** se muestran los resultados obtenidos con un paciente representativo donde se observa que al día cero de cultivo, el 74% de las células están incluidas en la región de linfocitos viables. El cultivo por seis días en ausencia de NLC presentó un 41% de linfocitos T dentro de la región de células viables, mientras que la presencia de las NLC mantuvo ese porcentaje en valores más cercanos a los del inicio del cultivo (**Figura 7 B**).

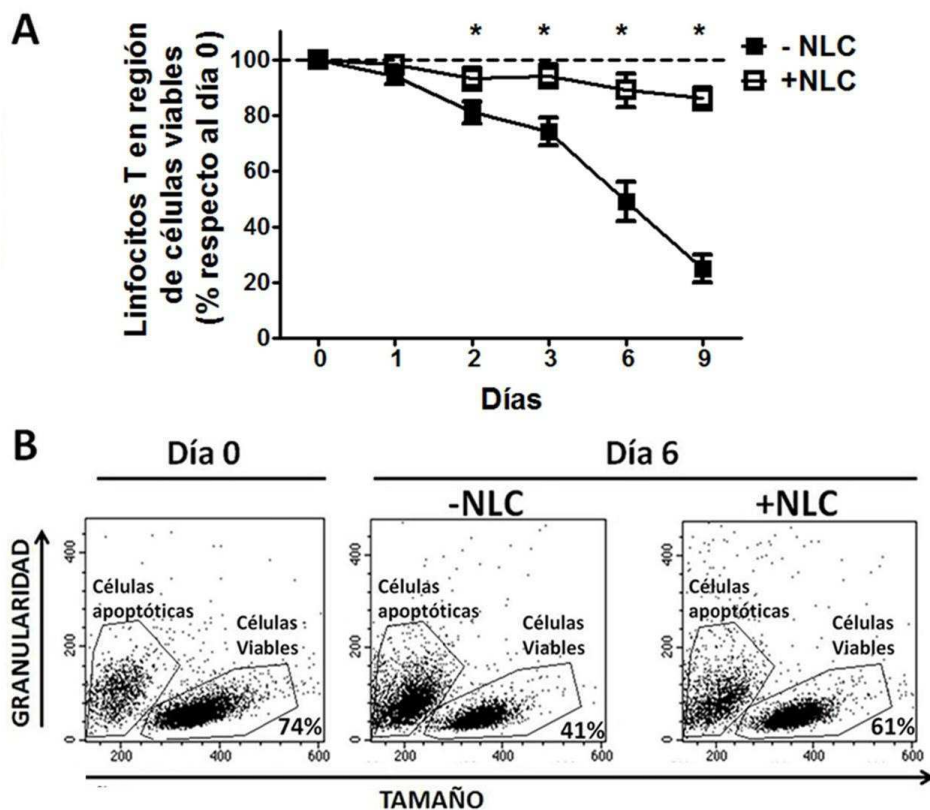


Figura 7: Las NLC autólogas previenen la apoptosis espontánea de los linfocitos T de los pacientes con LLC. Las CMT de los pacientes con LLC fueron cultivadas durante 14 días para obtener NLC. Una vez diferenciadas, las NLC fueron lavadas exhaustivamente y a partir de las células no adherentes se purificaron los linfocitos T por selección negativa, tal como se detalla en Materiales y Métodos. Los mismos fueron luego cultivados en ausencia (-NLC) o presencia (+NLC) de las NLC autólogas. **A.** Se grafica el porcentaje de linfocitos T presentes en la región de células viables relativo al día cero de cultivo en función del tiempo. ($n=15$) * $p<0,01$ Wilcoxon signed rank test (-NLC vs. +NLC a cada tiempo). **B.** Gráfico de puntos de citometría de flujo de tamaño vs. granularidad celular de los linfocitos T puros de un experimento representativo en el día de inicio del cultivo (día 0) y a los 6 días de cultivo solos o en presencia de NLC. En el margen inferior derecho se indica el porcentaje de células presentes en la región de células viables respecto al total de células del cultivo.

El efecto protector de las NLC sobre la muerte de los linfocitos T parecería ser una característica de estas células y no de cualquier otro tipo celular, ya que el cultivo con el resto de las células mononucleares que los acompañan en circulación no modificó significativamente la proporción de linfocitos T incluidos en la región de células viables (**Figura 8**).

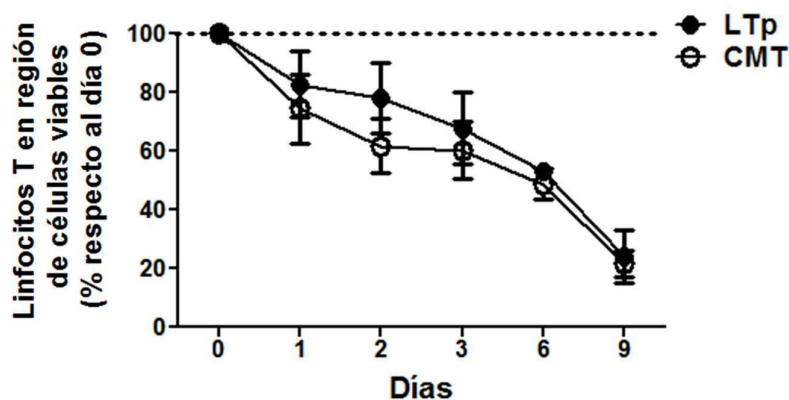


Figura 8: Las células mononucleares acompañantes de sangre periférica no protegen a los linfocitos T de los pacientes con LLC de la apoptosis espontánea. A partir de las CMT de pacientes con LLC se realizó la purificación de los linfocitos T por selección negativa. A continuación, se cultivaron los linfocitos T purificados (LTp) solos y paralelamente las CMT del mismo paciente. Mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de los linfocitos T ($CD3^+$) presentes en el cultivo incluidos en la región de células viables mediante el análisis del tamaño y la granularidad celular en el día de inicio del cultivo (día 0) y los 9 días subsiguientes. Se muestra el porcentaje de linfocitos T con estas características relativo al día 0 de cultivo en función del tiempo. ($n=5$) $p>0.05$, Wilcoxon signed rank test (LTp vs. CMT a cada tiempo).

Confirmamos estos resultados mediante microscopía de fluorescencia empleando los colorantes naranja de acridina y bromuro de etidio [163]. Con esta metodología es posible identificar a las células viables, las cuales presentan núcleos teñidos de verde con variaciones en su intensidad de fluorescencia debido a la presencia del colorante vital naranja de acridina que se intercala en el ADN, reflejando la distribución de eucromatina y heterocromatina. Por el contrario, los núcleos apoptóticos se caracterizan por presentar una cromatina marcadamente condensada, que se tiñe de manera uniforme de color verde con el colorante naranja de acridina y no presenta variaciones en su intensidad de fluorescencia. En la apoptosis avanzada, se pierde la integridad de la membrana y esto permite que el bromuro de etidio ingrese en las células y se una al ADN, tiñendo intensamente los núcleos de color naranja (Ver **Figura 6** de *Materiales y Métodos*). En la **Figura 9 A** pueden observarse los resultados que obtuvimos a partir de 15 pacientes analizados luego de 6 días de cultivo, donde la presencia

de NLC disminuyó significativamente la apoptosis espontánea de los linfocitos T. En la **Figura 9 B** se muestran los resultados obtenidos con un paciente representativo, donde puede observarse que los cultivos de linfocitos T en ausencia de NLC presentaron una mayor proporción de células apoptóticas que se tiñeron de un color verde (apoptosis temprana) o naranja uniforme (apoptosis tardía) debido a la condensación de la cromatina que acompaña al proceso de apoptosis. Tal como hemos reportado anteriormente [147], encontramos que los porcentajes de linfocitos presentes en la región de células viables que se obtienen evaluando el tamaño y granularidad celular son similares a los porcentajes obtenidos empleando la técnica de tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio.

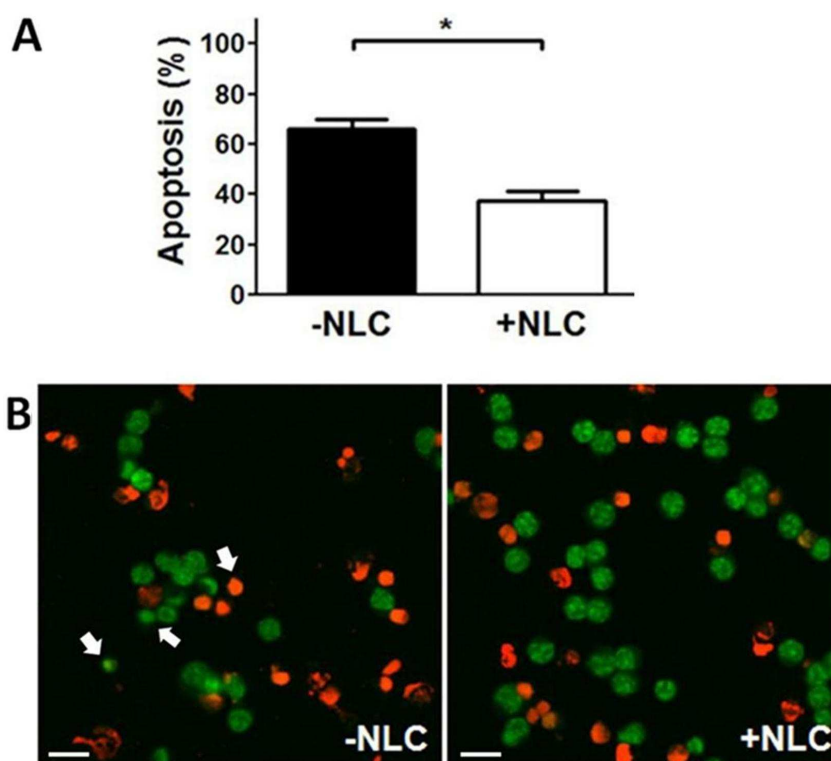


Figura 9: Evaluación de la apoptosis espontánea de los linfocitos T en ausencia y presencia de NLC empleando la tinción de naranja de acridina y bromuro de etidio. Las CMT de los pacientes con LLC fueron cultivadas durante 14 días con el objetivo de diferenciar NLC. Una vez diferenciadas, fueron lavadas exhaustivamente y a partir de

las células no adherentes se purificaron los linfocitos T por selección negativa. Los mismos fueron luego cultivados en ausencia (-NLC) o presencia (+NLC) de las NLC autólogas. Luego de 6 días de cultivo se evaluó la viabilidad de los linfocitos T por tinción con naranja de acridina/ bromuro de etidio y microscopía de fluorescencia. **A.** En la figura se muestran los porcentajes de células apoptóticas obtenidos por recuento en microscopía de fluorescencia. El recuento se realizó tal como se detalla en Materiales y Métodos. ($n=15$) * $p<0,05$ Wilcoxon signed rank test. **B.** Micrografía de microscopía confocal de un experimento representativo. Las flechas blancas señalan células apoptóticas. Barras ($10\ \mu\text{m}$).

Realizando inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 y CD4, a fin de distinguir a los linfocitos T CD4^+ ($\text{CD3}^+\text{CD4}^+$) de los linfocitos T CD8^+ ($\text{CD3}^+\text{CD4}^-$) presentes dentro de la región de células viables, observamos que ambas subpoblaciones muestran una susceptibilidad similar a morir en forma espontánea y su sobrevivencia se incrementa por la presencia de las NLC autólogas (**Figura 10 A**). En la **Figura 10 B** se muestra un ejemplo representativo de la proporción de linfocitos T CD4^+ y T CD8^+ presentes luego de 6 días en presencia o ausencia de NLC autólogas.

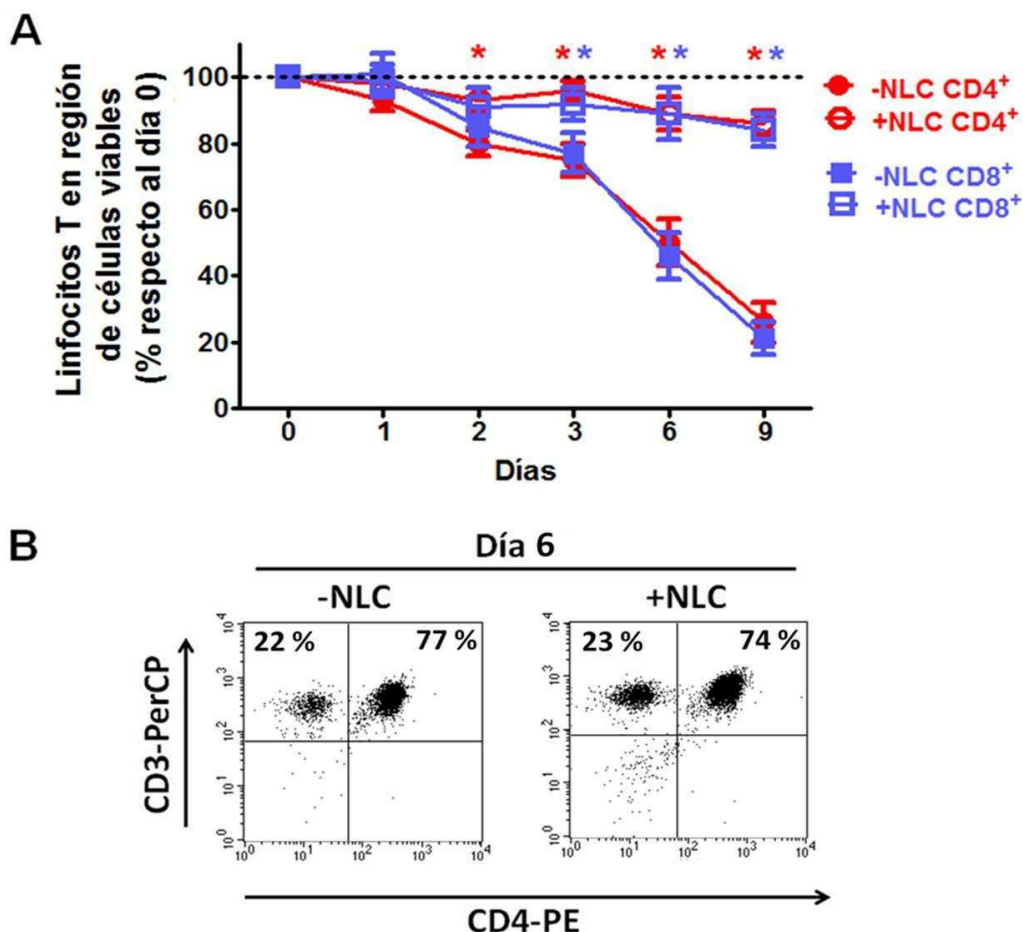


Figura 10: La presencia de NLC incrementa la sobrevivencia de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de los pacientes con LLC. A. Los linfocitos T purificados a partir de las células no adherentes presentes en el cultivo de 14 días de las CMT de pacientes con LLC, fueron cultivados en presencia (+NLC) y ausencia (-NLC) de las NLC autólogas. En el día de inicio del cultivo (día cero) y en los 9 días posteriores, se realizaron inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 y CD4 con el objetivo de evaluar la proporción de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ incluidos en la región de células viables mediante el análisis de tamaño y granularidad celular. En el gráfico se muestra el porcentaje de linfocitos T presentes en la región de células viables relativo al día cero en función del tiempo. (n=15) * p<0,05 Wilcoxon signed rank test (-NLC vs. +NLC a cada tiempo). **B.** Gráficos de puntos de citometría de flujo de un experimento representativo en el día 6 en ausencia y presencia de NLC. Se muestra el análisis de expresión de CD3 y CD4 de las células presentes en la región de linfocitos viables. En el cuadrante superior izquierdo del gráfico se indica el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ (CD3⁺CD4⁻) y en el cuadrante superior derecho se muestra el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺).

Asimismo, corroboramos estos resultados evaluando la muerte celular de los cultivos mediante citometría de flujo empleando el colorante 7-amino-

actinomicina D (7AAD) y el anticuerpo anti-CD4. El 7AAD es un compuesto químico fluorescente que se intercala en el ADN con gran afinidad por las regiones ricas en G:C y, empleado a bajas concentraciones (0,5-5 µg/ml), es útil para teñir células muertas [176]. Utilizando esta metodología determinamos la proporción de células muertas en el cultivo, constituida por células en apoptosis tardía y necróticas que incorporaron el colorante al perder la permeabilidad selectiva de su membrana plasmática. En la **Figura 11** se muestran los gráficos de puntos representativos de citometría de flujo de los linfocitos T luego de 6 días de cultivo en ausencia o presencia de NLC donde se observa que la proporción de linfocitos T CD4⁺ muertos (CD4⁺7AAD⁺) fue menor cuando los mismos son co-cultivados con NLC autólogas (79% vs 35%, +NLC vs -NLC). Dado que los cultivos fueron realizados con linfocitos T puros, fue posible analizar la muerte celular de los linfocitos T CD8⁺ que se encuentran representados en los cuadrantes inferiores de los gráficos (linfocitos T CD4⁻). En este caso, también encontramos una menor proporción de linfocitos T CD8⁺ muertos (CD4⁻7AAD⁺) en presencia de NLC (72% vs 37%, +NLC vs -NLC).

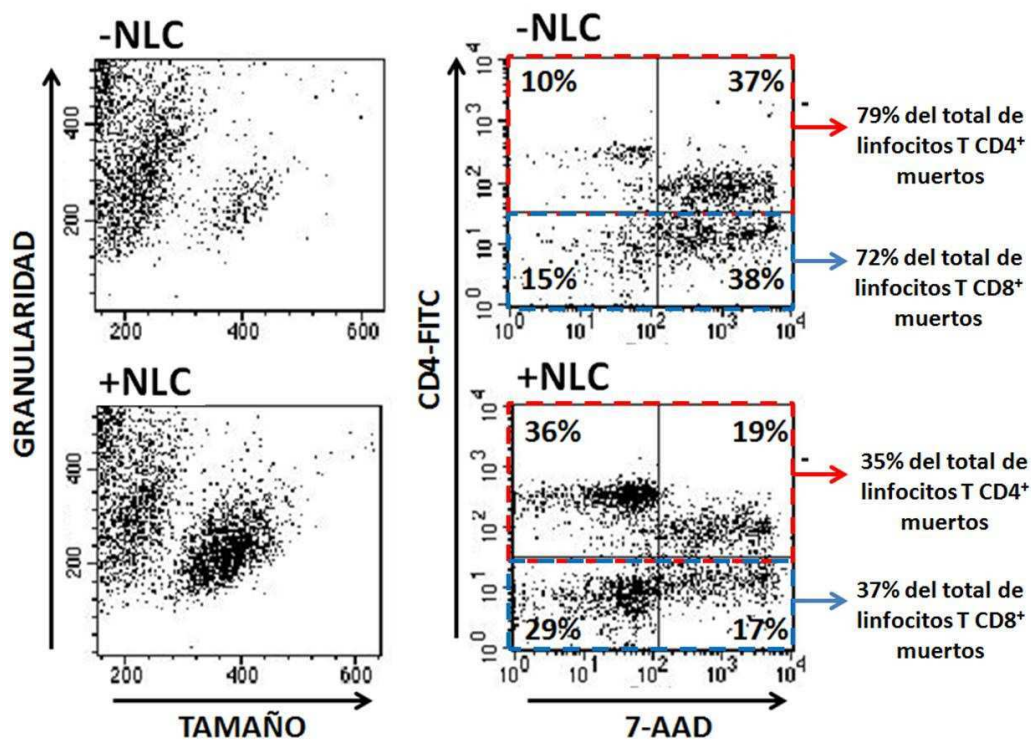


Figura 11: Evaluación de la muerte de los linfocitos CD4+ y CD8+ de los pacientes con LLC empleando la tinción con 7-AAD. Gráficos de puntos de citometría de flujo de un experimento representativo luego de 6 días de cultivo de linfocitos T solos (-NLC) o en presencia de NLC autólogas (+NLC). En los paneles de la izquierda se muestran los gráficos de puntos de tamaño vs granularidad celular, y a la derecha el análisis respectivo de la marcación de las células con el colorante 7AAD y un anticuerpo específico para CD4. En la esquina de cada cuadrante se indica el porcentaje de células respecto al total de células del cultivo. A la derecha de los gráficos se indica el porcentaje de linfocitos T muertos, respecto del total de los linfocitos T CD4⁺ (recuadro rojo) o T CD8⁺ (recuadro azul), respectivamente.

En conclusión, el conjunto de estos resultados demuestran que las NLC autólogas previenen la apoptosis espontánea de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de los pacientes con LLC.

2. Las células tipo nodriza (NLC) protegen a los linfocitos T de los pacientes con LLC de la apoptosis inducida por fludarabina.

Dado que, tal como demostramos en la sección anterior, las NLC autólogas protegen de la apoptosis espontánea a los linfocitos T de los pacientes, decidimos evaluar si a su vez eran capaces de protegerlos de la apoptosis inducida por fludarabina, una de las principales drogas empleadas para el tratamiento de esta patología. Primeramente determinamos la susceptibilidad a la droga de los linfocitos T purificados a partir de las células no adherentes realizando cultivos en presencia de distintas concentraciones de fludarabina. La proporción de células apoptóticas se determinó a las 24, 48 y 72 hs de cultivo por tinción con los colorantes naranja de acridina y bromuro de etidio, como se mencionó anteriormente. Tal como esperábamos, la droga induce la apoptosis de los linfocitos T en forma dependiente del tiempo y de la concentración de fludarabina empleada (**Figura 12 A**). Encontramos resultados similares al evaluar por citometría de flujo el tamaño y la granularidad de los cultivos (**Figura 12 B**). En la **Figura 12 C** se muestra un experimento representativo.

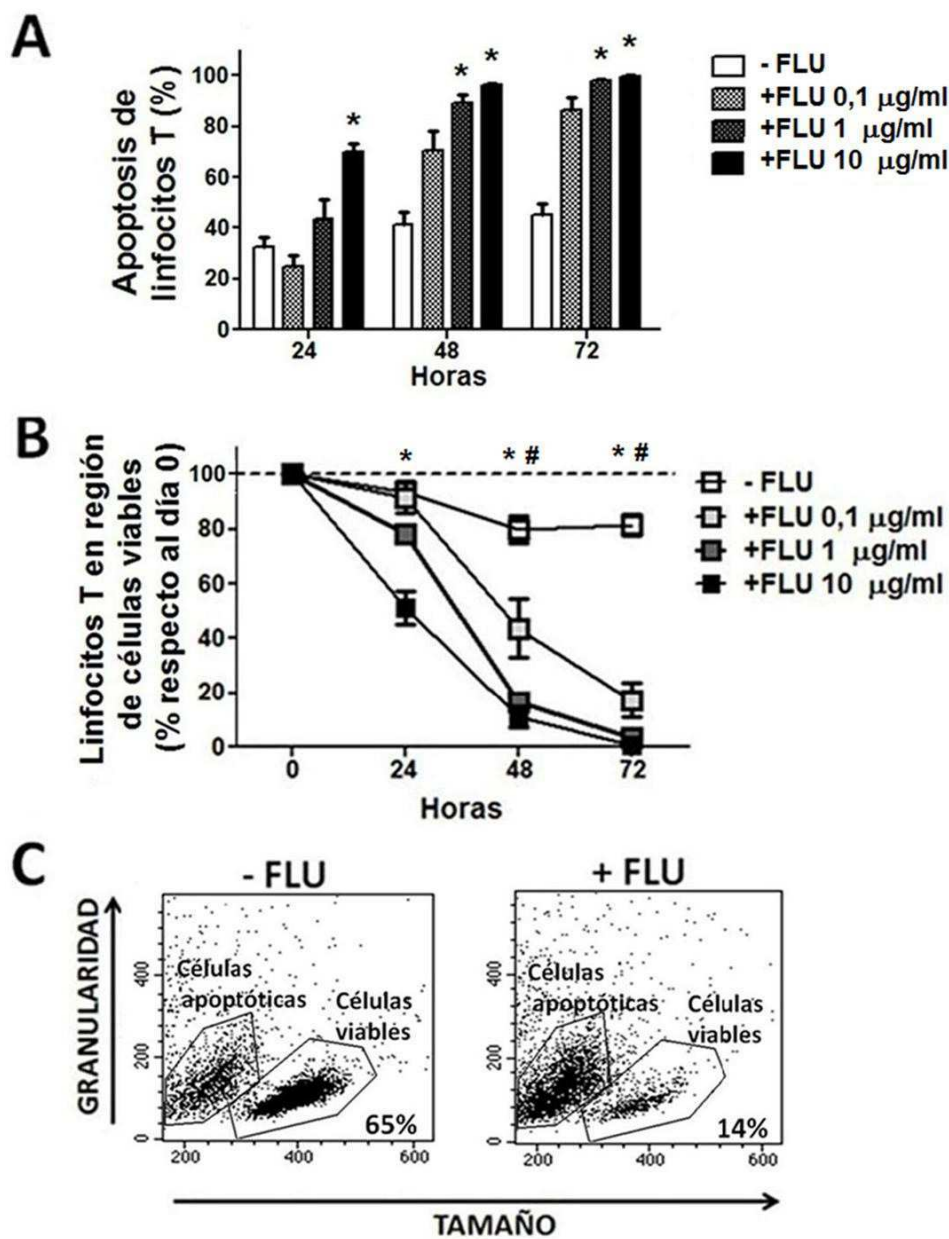


Figura 12: Inducción de apoptosis por fludarabina de los linfocitos T de pacientes con LLC. Se purificaron los linfocitos T de pacientes con LLC a partir de las células no adherentes presentes en los cultivos de las CMT luego de 14 días y fueron cultivados en ausencia (-FLU) o presencia de distintas concentraciones de fludarabina (+FLU). La viabilidad del cultivo fue evaluada luego de 24, 48 y 72 hs. **A.** La figura muestra el porcentaje de linfocitos T apoptóticos en función del tiempo evaluados por tinción con el colorante naranja de acridina/bromuro de etidio y posterior recuento por microscopía de fluorescencia, tal como se detalla en Materiales y Métodos. (n=8) * $p < 0,01$ respecto a -FLU a cada tiempo. ANOVA, Kruskal-Wallis test. **B.** Se grafica el porcentaje de linfocitos T presentes en la región de linfocitos viables definido en función del tamaño y la granulalidad celular por citometría de flujo, relativa al día de inicio del cultivo (día cero=100%) en función del tiempo. (n=8) * $p < 0,01$ (-FLU vs +FLU

10 a cada tiempo) y # $p < 0,01$ (-FLU vs +FLU 1 a cada tiempo), ANOVA, Kruskal-Wallis test. **C.** Gráficos de puntos de citometría de flujo de tamaño vs. granularidad celular de un experimento representativo, donde se cultivaron linfocitos T puros durante 48 hs solos o en presencia de fludarabina 1 $\mu\text{g/ml}$. Se muestran las regiones correspondientes a linfocitos viables y apoptóticos. En la esquina inferior derecha del gráfico se indica el porcentaje de linfocitos que se encuentran dentro de la región de células viables.

Mediante inmunomarcaciones y análisis por citometría de flujo encontramos, tal como habíamos reportado previamente [147], que los linfocitos T CD8 fueron más sensibles que los CD4 a la apoptosis inducida por fludarabina *in vitro* (**Figura 13 A**), hecho que se evidencia en un aumento progresivo de la relación CD4:CD8 en presencia de la droga (**Figura 13 B**).

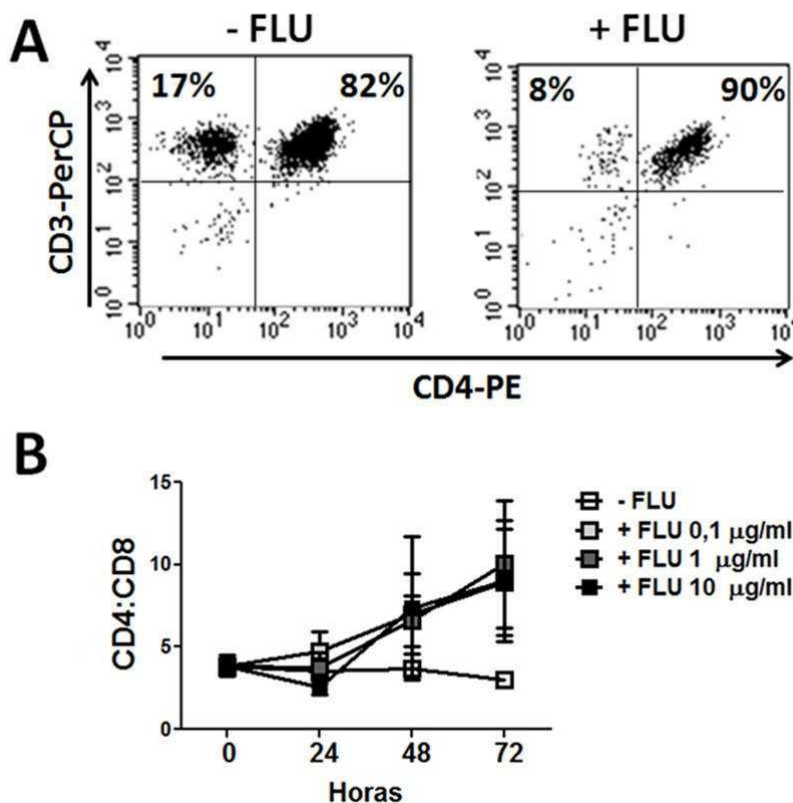


Figura 13: Los linfocitos T CD8⁺ de pacientes con LLC son más sensibles que los linfocitos T CD4⁺ a la apoptosis inducida por fludarabina *in vitro*. Los linfocitos T de los pacientes con LLC purificados a partir de las células no adherentes presentes en los cultivos de las CMT luego de 14 días, fueron cultivados en ausencia o presencia de

concentraciones crecientes de fludarabina. Luego de 24, 48 y 72 hs se realizaron inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 y CD4 con el objetivo de evaluar la proporción de estas subpoblaciones por citometría de flujo. **A.** Gráficos de puntos de citometría de flujo de un experimento representativo de linfocitos T puros cultivados durante 72 hs en ausencia (-FLU) o presencia (+FLU) de fludarabina 10 µg/ml. Se muestra el análisis de expresión de CD3 y CD4 a partir de la región de linfocitos viables. En los cuadrantes se indica el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) y CD8⁺ (CD3⁺CD4⁺) presente en cada condición. **B.** El gráfico muestra la relación entre las subpoblaciones CD4 y CD8 presentes en el cultivo (CD4:CD8) en función del tiempo para los linfocitos T puros cultivados solos o en presencia de dosis crecientes de fludarabina. (n=8), ANOVA, Kruskal-Wallis test.

Con el objeto de evaluar la capacidad de las NLC de proteger a los linfocitos T de la apoptosis inducida por fludarabina, realizamos los cultivos antes mencionados en presencia o ausencia de NLC autólogas y luego de 24, 48 y 72 hs determinamos por citometría de flujo la proporción de células presentes en la región de linfocitos viables. Tal como puede verse en la **Figura 14**, observamos que la presencia de las NLC protegió a los linfocitos T de la apoptosis inducida por fludarabina. Estos resultados fueron corroborados evaluando la apoptosis celular por tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina, mediante microscopía de fluorescencia (no mostrado). La protección de la apoptosis se hizo evidente a partir de las 48 hs de cultivo (**Figura 14**), tanto para la subpoblación T CD4⁺ como para la T CD8⁺ (**Figura 15**).

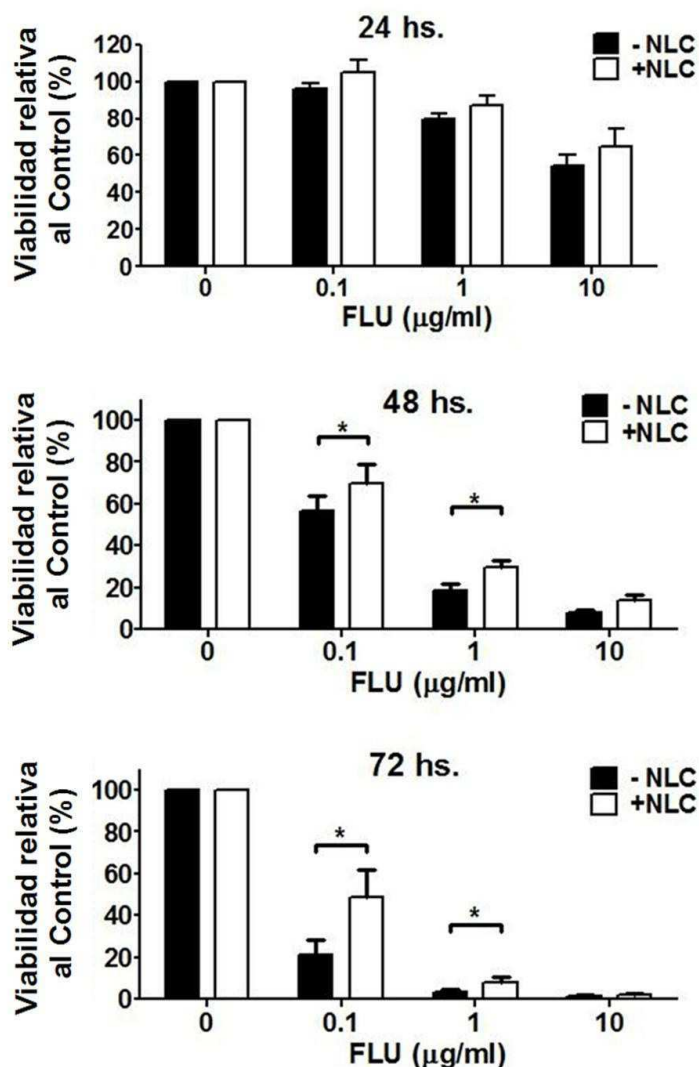


Figura 14: Las NLC autólogas protegen a los linfocitos T de los pacientes con LLC de la apoptosis inducida por fludarabina in vitro. Se realizaron cultivos de CMT de pacientes con LLC con el objetivo de diferenciar NLC. Luego de 14 días, se purificaron los linfocitos T a partir de las células no adherentes y se cultivaron solos (-NLC) o en presencia de las NLC autólogas (+NLC), y en ausencia o presencia de fludarabina a concentraciones crecientes. Luego de 24, 48 y 72 hs se determinó la proporción de células T presentes en la región de linfocitos viables según el análisis de tamaño y granularidad celular mediante citometría de flujo. Se muestra la proporción relativa de linfocitos T presentes en la región de células viables cuando son cultivados solos y en presencia de NLC, tomando como 100% la proporción de linfocitos viables en ausencia de la droga (Control). (n=10) * p<0,05, Wilcoxon signed rank test.

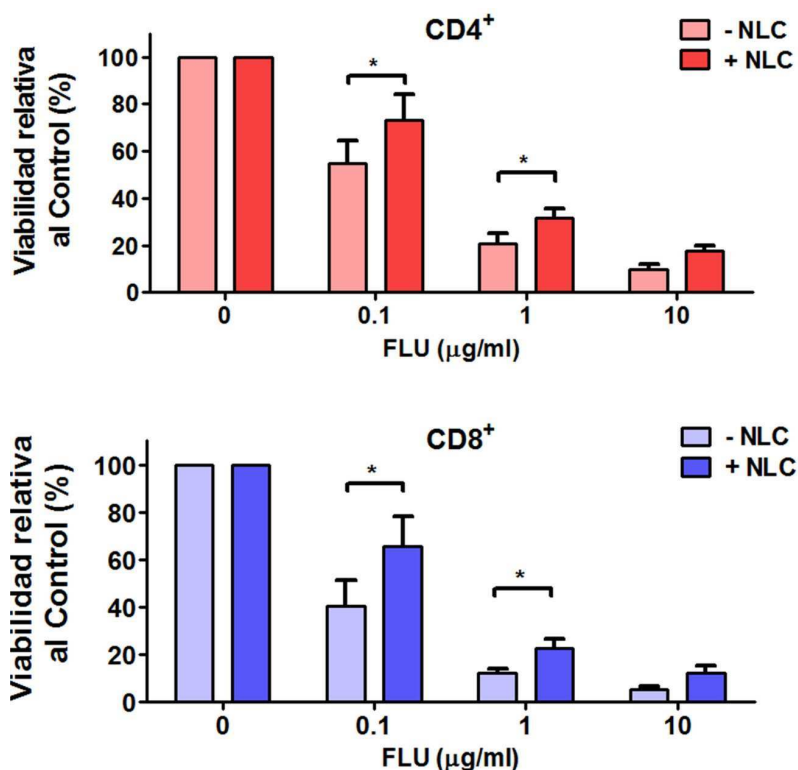


Figura 15: Las NLC autólogas protegen a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de los pacientes con LLC de la apoptosis inducida por fludarabina in vitro. Se realizaron cultivos de CMT de pacientes con LLC con el objetivo de diferenciar NLC. Luego de 14 días, se purificaron los linfocitos T a partir de las células no adherentes y se cultivaron solos (-NLC) o en presencia de las NLC autólogas (+NLC), y en ausencia o presencia de fludarabina a concentraciones crecientes. Luego de 48 hs se realizaron inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 y CD4 y se determinó la proporción de células T CD4⁺ y CD8⁺ presentes en la región de linfocitos viables según el análisis de tamaño y granularidad celular mediante citometría de flujo. Se muestra la proporción relativa de linfocitos T presentes en la región de células viables cuando son cultivados solos y en presencia de NLC tomando como 100% la proporción de linfocitos viables en ausencia de la droga (Control). (n= 10) * p<0,05, Wilcoxon signed rank test.

Considerando que las NLC logran incrementar la sobrevivencia del clon leucémico en parte gracias a la producción de CXCL12 [149] y teniendo en cuenta que nuestro grupo reportó recientemente que esta quimiocina es capaz de incrementar la activación de los linfocitos T de los pacientes [130], decidimos determinar si también estaba involucrada en la protección de la apoptosis de los linfocitos T de los pacientes por parte de las NLC. Para ello realizamos los cultivos de linfocitos T y NLC autólogas, con o sin fludarabina y en presencia de

un anticuerpo bloqueante del receptor de CXCL12 que expresan los linfocitos T, el CXCR4. Luego de 72 hs de cultivo, evaluamos la sobrevivencia de los linfocitos T por citometría de flujo tal como se explicó previamente. Al evaluar la apoptosis espontánea de los linfocitos T observamos que en presencia del anticuerpo bloqueante del CXCR4, las NLC continúan incrementando la sobrevivencia de los linfocitos T, aunque en menor medida y sin alcanzar la significancia estadística (Figura 16).

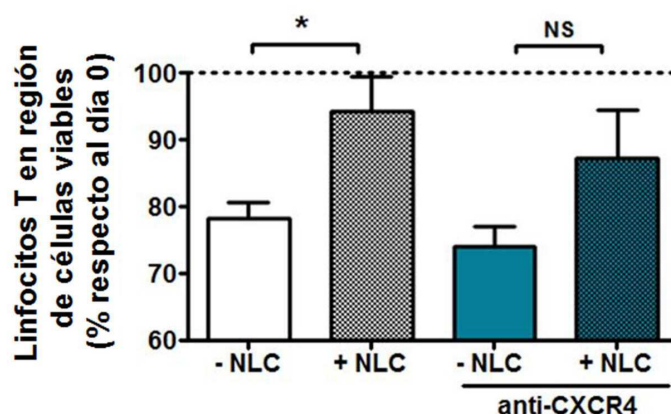


Figura 16: Rol del CXCL12 en la protección de la apoptosis espontánea de los linfocitos T por parte de las NLC autólogas. Se realizaron cultivos de CMT de pacientes con LLC con el objetivo de diferenciar NLC. Luego de 14 días, se purificaron los linfocitos T a partir de las células no adherentes. Los linfocitos T se cultivaron solos (-NLC) o en presencia de las NLC autólogas (+NLC) y en presencia o ausencia del anticuerpo bloqueante de CXCR4 (anti-CXCR4). Luego de 72 hs se determinó la proporción de células T presentes en la región de linfocitos viables según el análisis de tamaño y granularidad celular mediante citometría de flujo. Se muestra la proporción de linfocitos T viables respecto al día de inicio del cultivo (línea punteada). (n= 6) * $p < 0,05$, NS: Estadísticamente no significativo. Wilcoxon signed rank test.

Por otro lado, como puede observarse en la **Figura 17**, al evaluar la apoptosis inducida por fludarabina, el bloqueo del receptor de CXCL12 no modificó la capacidad de las NLC de proteger a los linfocitos T de la muerte

celular. Sin embargo, será necesario ampliar el número de pacientes estudiados a fin de poder concluir claramente sobre la participación del CXCL12 producido por las NLC en el proceso de protección de la apoptosis espontánea e inducida por fludarabina.

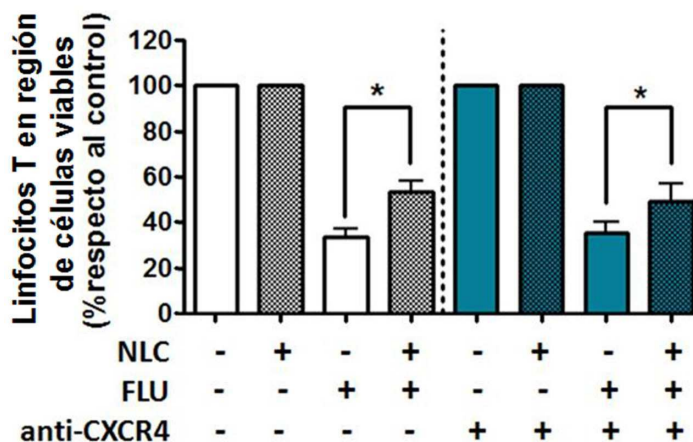


Figura 17: Rol del CXCL12 en la protección de la apoptosis inducida por fludarabina de los linfocitos T por parte de las NLC autólogas. Se realizaron cultivos de CMT de pacientes con LLC con el objetivo de diferenciar NLC. Luego de 14 días, se purificaron los linfocitos T a partir de las células no adherentes y fueron cultivados solos o en presencia de NLC, en ausencia o presencia de fludarabina 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y de anticuerpo bloqueante de CXCR4. Luego de 72 hs se determinó la proporción de células T presentes en la región de linfocitos viables según el análisis de tamaño y granularidad celular mediante citometría de flujo. Se muestra la proporción de linfocitos T CD3^+ viables relativa al control (cultivo en ausencia de la droga). (n= 6), * $p < 0,05$ Wilcoxon signed rank test.

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que las NLC autólogas previenen a los linfocitos T CD4^+ y T CD8^+ de los pacientes con LLC de la apoptosis inducida por fludarabina.

RESULTADOS OBJETIVO N°2.

1. El tratamiento *in vitro* con fludarabina aumenta la proliferación de los linfocitos T de los pacientes con LLC.

Si bien la fludarabina es ampliamente conocida como una droga citotóxica, los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo [24, 26] y por otros autores [22-23] demuestran que también es capaz de ejercer efectos inmunomodulatorios, independientes de su capacidad pro-apoptótica, en distintos tipos celulares. En este sentido, nuestro grupo demostró anteriormente que los linfocitos T que sobreviven al tratamiento *in vitro* con fludarabina incrementan la producción de la citoquina anti-apoptótica IFN- γ [26]. En este trabajo de Tesis decidimos evaluar si la fludarabina favorecía en los linfocitos T de los pacientes una mayor activación, proliferación y migración en respuesta a las quimiocinas que los atraen hacia los órganos linfoides.

El efecto de la fludarabina en la activación de los linfocitos T se estudió empleando CMT de los pacientes, las cuales fueron preincubadas por 18hs en ausencia o presencia de distintas dosis de la droga. Posteriormente las células fueron lavadas en forma exhaustiva, a fin de evitar que la fludarabina estuviera presente en el medio de cultivo durante el proceso de activación de los linfocitos T. Más tarde, las CMT fueron estimuladas por el agregado de una concentración sub-óptima de fitohemaglutinina (PHA) que induce el entrecruzamiento del receptor antigénico y luego de 24 y 48 hs se evaluó por citometría de flujo la expresión del marcador de activación CD25 en los linfocitos T (CD3⁺). Tal como esperábamos, la media de intensidad de fluorescencia (MIF) y el porcentaje de células positivas para CD25 en los linfocitos T viables se incrementó en forma dependiente del tiempo en los

cultivos activados con PHA, siendo esta tendencia más marcada en aquellos cultivos que habían sido pre-tratados con fludarabina (**Figura 18**). A las 48hs, el promedio de viabilidad de los cultivos sin estimular fue de 71% para los que no fueron pre-tratados con la droga y de 38% para los que fueron pre-incubados con 5 ug/ml de fludarabina. Como era de esperar, la inducción de apoptosis en estos ensayos fue menor a la observada en los experimentos de la sección anterior (ver **Figura 12**) debido a que en este caso la droga sólo está presente por 18 horas en el cultivo y luego se remueve exhaustivamente. La activación con PHA incrementó la viabilidad de las células a un 75% para los cultivos sin la droga y 57% para los que fueron pre-incubados con fludarabina (n=11).

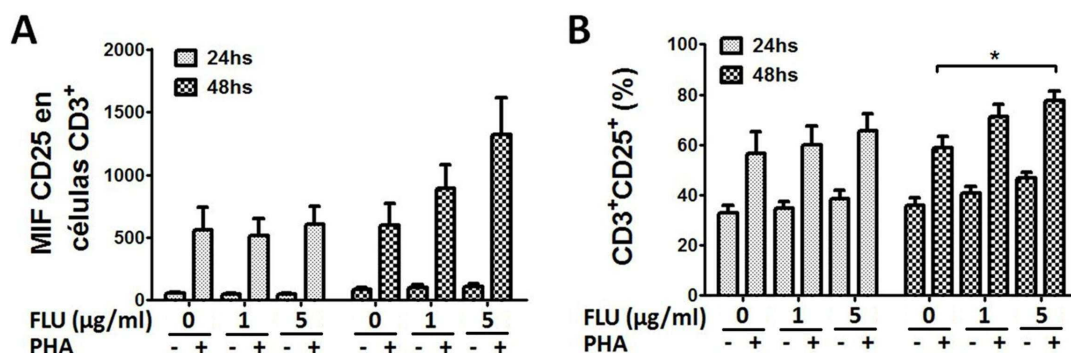


Figura 18: El tratamiento in vitro con fludarabina aumenta la expresión de CD25 en los linfocitos T de los pacientes con LLC. Las CMT de los pacientes con LLC fueron cultivadas durante 18 hs en ausencia o presencia de fludarabina 1 y 5 µg/ml. A continuación, fueron lavadas exhaustivamente y activadas o no con PHA 0,5 µg/ml. Luego de 24 y 48 hs de cultivo se realizaron inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 y CD25. **A.** MIF de CD25 en la población CD3⁺ luego de 24 y 48 hs de cultivo en ausencia o presencia de PHA. **B.** Se muestra la proporción de linfocitos T que expresan el marcador CD25 luego de 24 y 48 hs de cultivo en ausencia o presencia de PHA. (n=11). * p< 0.01, ANOVA, Friedman Test.

Con el objeto de determinar si el pretratamiento con fludarabina modulaba la capacidad proliferativa de los linfocitos T, realizamos ensayos de proliferación con PHA empleado la técnica de dilución del colorante CFSE. Para

ello, se procedió a marcar en primer lugar a las CMT de los pacientes con CFSE, el cual difunde pasivamente al interior de las células donde es sustrato de esterasas celulares. Éstas actúan dejando expuesto en el colorante un grupo éster que al reaccionar con aminos intracelulares forma conjugados. Al dividirse las células, el colorante se reparte en partes iguales en las células hijas, disminuyendo de ese modo la fluorescencia que puede ser analizada por citometría de flujo. De esa forma, pueden identificarse las células que son producto de la proliferación, por su menor intensidad de fluorescencia (CFSE^{bajo}). Luego de la tinción con CFSE se realizaron cultivos de 18 hs en ausencia o presencia de fludarabina, la cual fue lavada exhaustivamente previo al agregado de PHA, tal como mencionamos en el experimento de activación. La cuantificación de los linfocitos T que proliferaron se realizó a los 6 días de cultivo mediante inmunomarcaciones y citometría de flujo, analizando dentro de la región de células viables, el porcentaje de células que expresaban la molécula CD3 y presentaban bajos niveles de CFSE (CD3⁺CFSE^{bajo}). En la **Figura 19 A** se muestran los resultados obtenidos con un paciente representativo donde puede observarse que en aquellos cultivos no estimulados con PHA, el porcentaje de linfocitos T que proliferaron en forma espontánea no superó el 5%. Como era de esperar, la presencia de PHA indujo un aumento de la proliferación, evidenciada por un incremento en el porcentaje de linfocitos CD3⁺CFSE^{bajo}, el cual fue mayor en aquellos cultivos que habían sido previamente tratados con fludarabina (**Figura 19 A**). En la **figura 19 B** se muestran los resultados obtenidos con 11 pacientes analizados, donde se observa que el pre-tratamiento de las células con fludarabina aumentó la proliferación de los linfocitos T inducida por PHA. Encontramos resultados similares cuando el entrecruzamiento del TCR/CD3 se realizó con anticuerpos anti-CD3 inmovilizados en la placa de cultivo (resultados no mostrados).

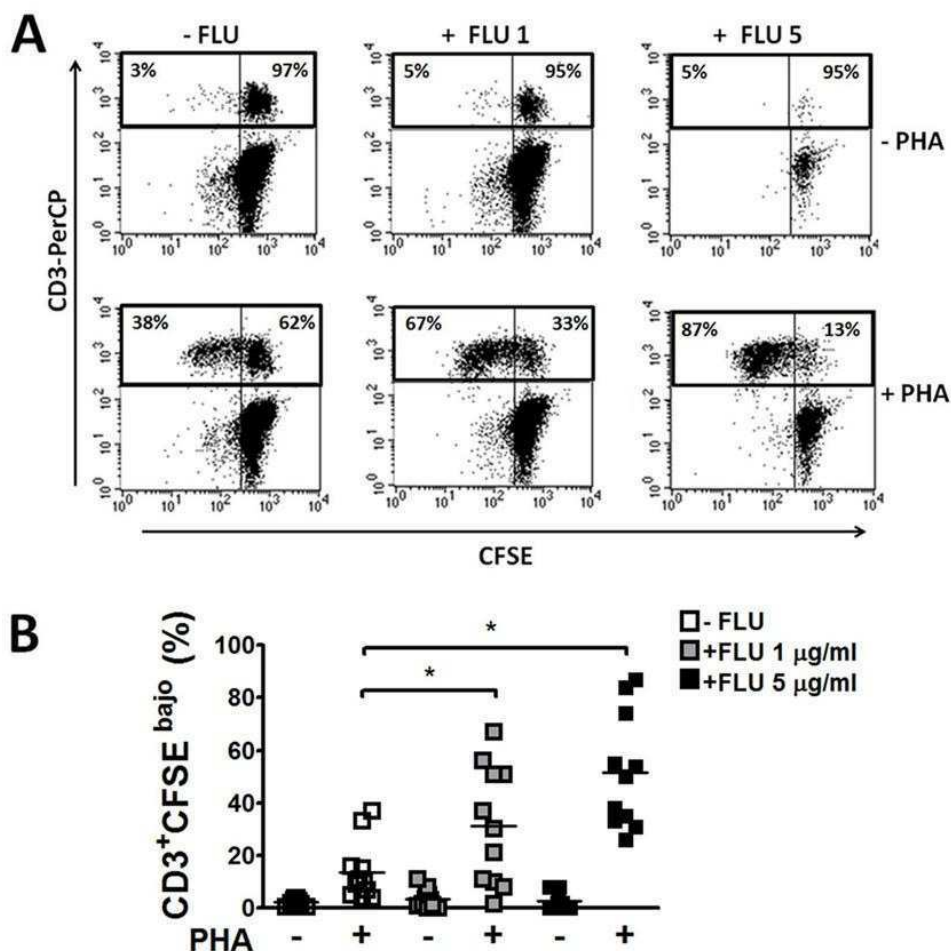


Figura 19: El tratamiento in vitro con fludarabina aumenta la proliferación de los linfocitos T de pacientes con LLC. Las CMT de los pacientes con LLC marcadas con el colorante CFSE, fueron cultivadas durante 18 hs en ausencia (-FLU) o presencia de fludarabina (+FLU). A continuación fueron lavadas y cultivadas en ausencia o presencia de PHA 0,25 $\mu\text{g/ml}$. Luego de 6 días se realizaron inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 y CD4 y se evaluó la proliferación de los linfocitos T por la técnica de dilución del colorante CFSE mediante citometría de flujo. **A.** Gráficos de puntos de citometría de flujo de un experimento donde se analiza la proliferación de los linfocitos T (CD3^+) cultivados en ausencia de PHA (paneles superiores) o en presencia de PHA (paneles inferiores). Las células T que proliferaron se encuentran representadas en el cuadrante superior izquierdo. Los porcentajes indicados en los gráficos son relativos al total de los linfocitos T (100%) representados en la región remarcada en negro en cada gráfico. **B.** El gráfico muestra el porcentaje de linfocitos T que proliferaron ($\text{CD3}^+\text{CFSE}^{\text{bajo}}$) luego de 6 días en ausencia o presencia de PHA. ($n=11$) $*p < 0,05$ ANOVA Friedman Test.

En ese momento, el porcentaje de viabilidad evaluado según el tamaño y granularidad de las células fue muy similar para los cultivos activados o no con

PHA que no estuvieron pre-incubados con fludarabina (media de sobrevivida al día 6 de cultivo: 75% vs 78%, para -PHA vs +PHA, n=11), el cual se redujo levemente a causa de la pre-incubación con fludarabina 1 µg/ml (61% vs 69%, para FLU 1 µg/ml vs FLU 1 µg/ml + PHA, n=11) y en forma más marcada por el efecto de la mayor concentración de la droga (28 % vs 39%, para FLU 5 µg/ml vs FLU 5/ml + PHA, n=11). Llamativamente, a pesar de que los linfocitos T CD8⁺ son más sensibles a los efectos citotóxicos de la fludarabina (ver **Figura 13**) aquellos que sobreviven al tratamiento muestran una mayor capacidad de proliferación en comparación a los T CD4⁺ cuando son estimulados a través del receptor antigénico (**Figura 20**).

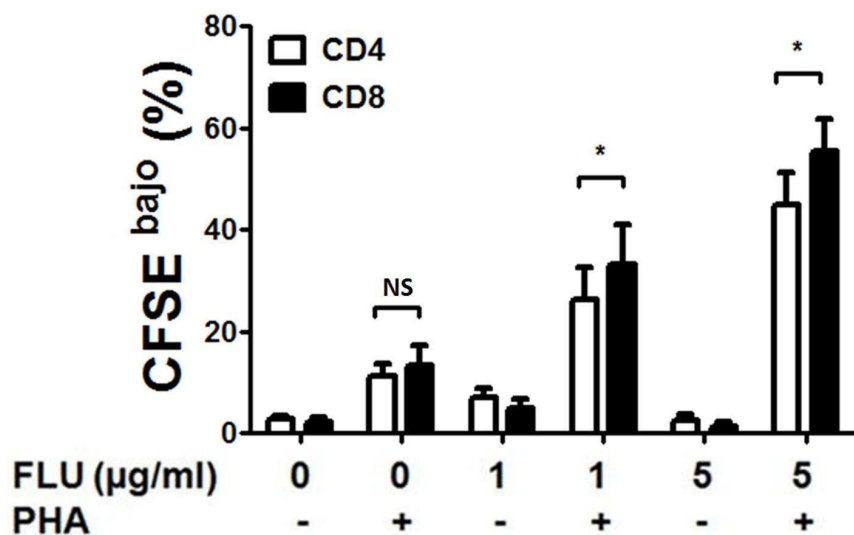


Figura 20: El tratamiento *in vitro* con fludarabina aumenta la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ en mayor medida que la de los linfocitos T CD4⁺ de pacientes con LLC. Las CMT de los pacientes con LLC marcadas con el colorante CFSE fueron cultivadas durante 18 hs en ausencia o presencia de fludarabina. A continuación fueron lavadas y cultivadas en ausencia o presencia de PHA 0,25 µg/ml. Luego de 6 días se evaluó la proliferación mediante inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 y CD4 y citometría de flujo. En el gráfico se muestra la proporción de linfocitos CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) y CD8⁺ (CD3⁺CD4⁺) que proliferaron (CFSE^{bajo}) luego de 6 días de cultivo en presencia o ausencia de PHA. (n=10) * p<0,05; NS: estadísticamente no significativo. Wilcoxon signed rank test.

Asimismo, el aumento en el tamaño de los linfocitos T tratados con PHA, lo cual es característico de la transformación blástica producto de la activación celular [165, 177-178], fue mayor en la células pre-tratadas con la droga, siendo este efecto estadísticamente significativo luego de 6 días de activación (**Figura 21 A**). En la **figura 21 B** se muestra un ejemplo representativo del análisis del tamaño de los linfocitos T mediante citometría de flujo donde puede observarse que los linfocitos T no estimulados presentaron menos del 10% de células de tamaño grande el cual se incrementó por el tratamiento con PHA y fue claramente mayor en aquellos cultivos pre-tratados con fludarabina.

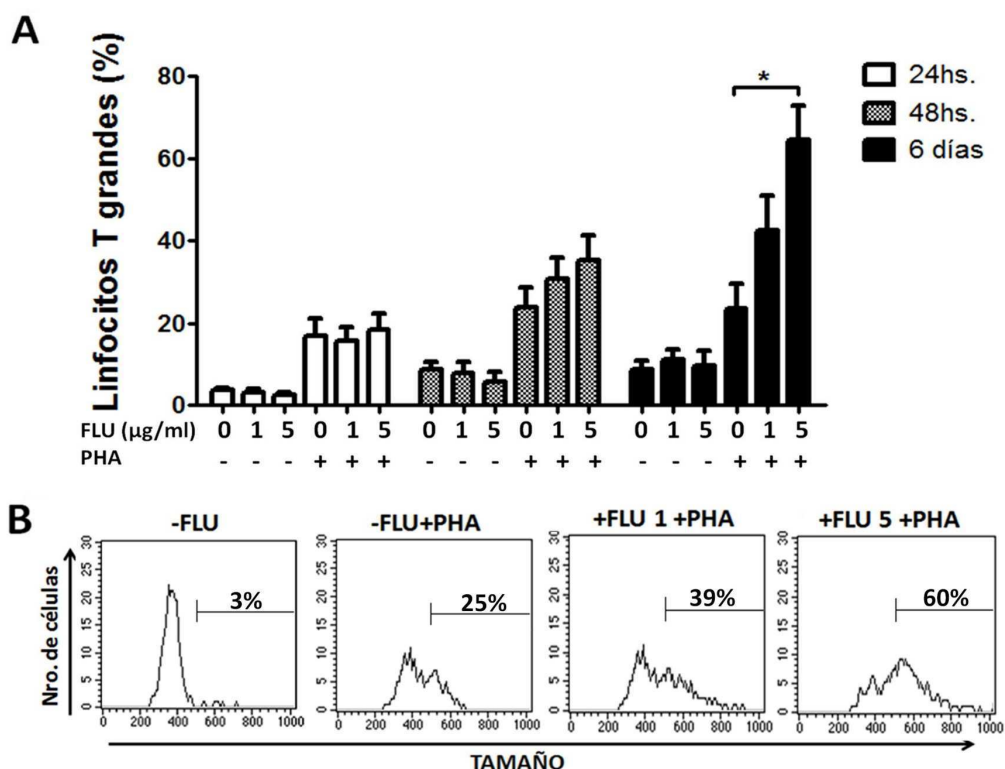


Figura 21: El tratamiento *in vitro* con fludarabina induce un aumento en el tamaño de los linfocitos T de pacientes con LLC. Las CMT de los pacientes con LLC fueron cultivadas durante 18 hs en ausencia o presencia de fludarabina. A continuación, fueron lavadas y cultivadas en ausencia o presencia de PHA 0,25 µg/ml. A las 24 hs, 48 hs y 6 días se realizaron inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 y se evaluó el tamaño celular por citometría de flujo. **A.** En la figura se muestra el porcentaje de células CD3⁺ viables que presentaron valores de Forward Scatter superiores a 500 (linfocitos T grandes). (n=8) * p < 0,05 ANOVA Friedman Test. **B.** Histogramas de citometría de flujo de un experimento representativo donde se muestra

la distribución de los linfocitos CD3⁺ en función del tamaño celular luego de 6 días de cultivo. Los porcentajes de la figura indican el porcentaje de linfocitos T grandes.

2. El tratamiento *in vitro* con fludarabina no modifica su capacidad migratoria en respuesta a las quimiocinas CXCL12 y CCL21.

Dado que nuestro grupo reportó en el año 2010 que los linfocitos T de los pacientes con LLC son capaces de migrar en respuesta a las quimiocinas CXCL12 y CCL21, las cuales podrían atraerlos desde circulación hacia los órganos linfoides [108], decidimos evaluar si la fludarabina lograba incrementar la respuesta migratoria de los linfocitos T hacia las mismas. Para ello, se realizaron cultivos de CMT de pacientes con LLC con fludarabina (1 y 5 µg/ml) por 18 hs, luego de lo cual se evaluó la capacidad migratoria de los linfocitos T mediante ensayos de migración *in vitro* hacia CXCL12 y CCL21. Tal como se detalla en la sección *Materiales y Métodos*, para estos ensayos se utilizaron placas de 96 pocillos que poseen dos compartimentos separados por una membrana de policarbonato de 4.26mm de diámetro y poros de 5 µm (*Transwells*). Las CMT de los pacientes LLC tratados o no con la droga, se sembraron en el compartimiento superior y en el compartimiento inferior se colocó el medio de cultivo solo (control) o el medio de cultivo suplementado con la quimiocina. En este sistema, las células que responden a la quimiocina migran desde el compartimiento superior hacia el compartimiento inferior, atravesando la membrana. El ensayo se detuvo luego de 2 horas de cultivo a 37°C en estufa gaseada, y las células presentes en el compartimiento inferior fueron recolectadas para su posterior recuento e inmunomarcación. El recuento se realizó por citometría de flujo, determinando el número de células adquiridas en un minuto [108, 179] y la marcación se realizó empleando anticuerpos

específicos para las proteínas CD3 y CD4. El porcentaje de migración de los linfocitos T se calculó relativizando el número de células que migraron al compartimento inferior en respuesta a la quimiocina, considerando 100% al número de células que migraron en ausencia de la misma [99]. Los resultados presentados en la **Figura 22** demuestran que el pre-tratamiento con fludarabina por 18 hs no modificó significativamente la respuesta migratoria de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ hacia CXCL12 y CCL21. Encontramos resultados similares al reducir el pre-tratamiento con la droga a 30 min, un tiempo corto pero suficiente para que la fludarabina ingrese a las células [180] (resultados no mostrados).

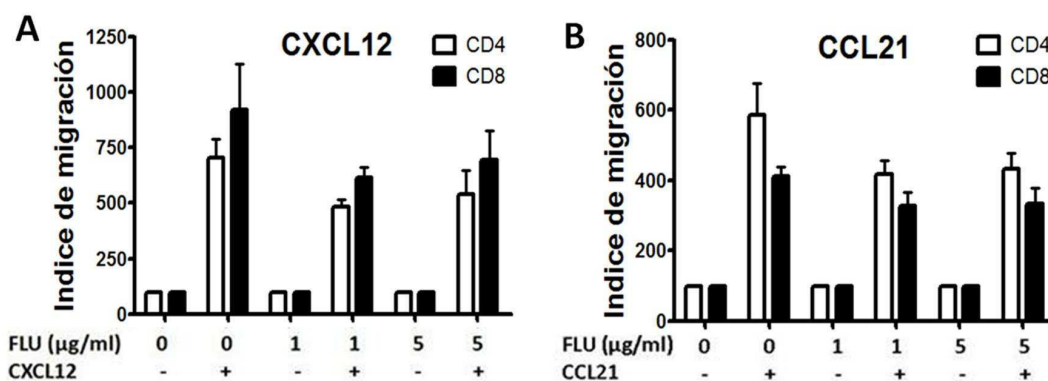


Figura 22: El tratamiento in vitro con fludarabina no modula la respuesta migratoria de los linfocitos T de los pacientes con LLC. Las CMT de los pacientes con LLC fueron cultivadas durante 18 hs en ausencia o presencia de fludarabina. A continuación fueron lavadas exhaustivamente y se realizaron ensayos de quimiotaxis en Transwells como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Las células que migraron fueron recolectadas y se realizaron inmunomarcaciones con anticuerpos específicos para CD3 y CD4. El recuento se realizó mediante citometría de flujo determinando el número de células que son adquiridas en un minuto y el índice de migración se calculó como el porcentaje de células que migraron en presencia de quimiocina con respecto al número de células que migraron espontáneamente (en ausencia de quimiocina). **A.** En la figura se muestra el Índice de migración de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ hacia 500 ng/ml de CXCL12. **B.** Índice de migración de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ hacia 1000 ng/ml de CCL21. (n=7) ANOVA, Friedman Test y Wilcoxon signed rank test para comparar CD4⁺ vs CD8⁺ en cada condición.

Por último, dado que nuestro grupo reportó previamente diferencias en la respuesta migratoria al CXCL12 de los linfocitos T de los pacientes LLC ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺ [108], decidimos evaluar si al segregar a los pacientes en base a la expresión de dicha molécula se evidenciaba algún efecto particular de la droga en los distintos grupos pronóstico. Si bien encontramos, tal como habíamos reportado previamente [108], que los linfocitos T de los pacientes ZAP-70⁻ migran menos en respuesta al CXCL12 en comparación a los linfocitos T de pacientes ZAP-70⁺, la fludarabina no modificó la capacidad migratoria de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de ninguno de los grupos pronóstico (resultados no mostrados).

En su conjunto, los resultados presentados en esta sección indican que la fludarabina no afecta la respuesta migratoria de los linfocitos T de los pacientes LLC hacia las quimiocinas CXCL12 y CCL21 pero es capaz de incrementar la activación y la proliferación de los linfocitos T, siendo más marcado el efecto en la proliferación de la subpoblación T CD8⁺ en comparación a la T CD4⁺.

RESULTADOS OBJETIVO N° 3

1. El tratamiento *in vivo* de ratones BALB/c con fludarabina induce un aumento en el número total de linfocitos T en los ganglios linfoides.

Por último, decidimos emplear un modelo que nos permitiera evaluar el efecto del tratamiento *in vivo* con fludarabina. Para ello empleamos ratones BALB/c que fueron tratados o no con la droga para posteriormente evaluar el efecto del tratamiento en la distribución de los linfocitos en los ganglios linfáticos. Hoy en día resulta imposible evaluar este punto en los pacientes LLC ya que la fludarabina no se administra como monodroga, sino combinada con otros antineoplásicos como ciclofosfamida o Rituximab y además existen complicaciones, tanto metodológicas como éticas, que dificultan el acceso a las muestras de órganos linfoides de los pacientes.

El esquema de tratamiento de los ratones con la droga se muestra en la **Figura 23** y constó de 3 ciclos de inoculaciones intra-peritoneales cada 48hs con solución de tampón fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) al grupo de ratones control y con fludarabina a una dosis de 100 mg/Kg al grupo de ratones tratados. Luego de 48hs de la última inoculación, se obtuvieron muestras de sangre periférica y a continuación los ratones fueron sacrificados y se extrajeron los ganglios inguinales y los ganglios axilares.

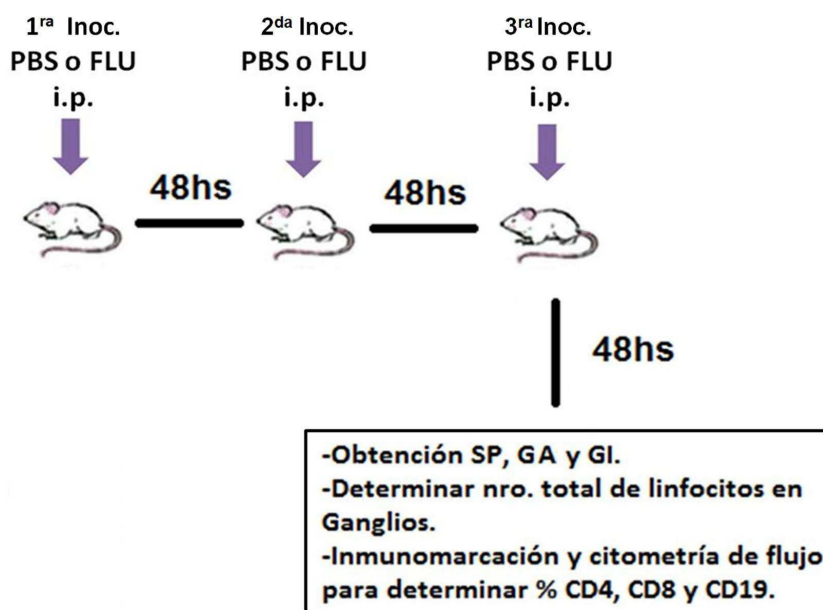


Figura 23: Esquema del tratamiento in vivo con fludarabina de ratones BALB/c. Ratones BALB/c machos de 2 meses de edad recibieron un total de 3 inoculaciones i.p. suministradas individualmente cada 48hs. El grupo control fue inoculado con PBS (CT) y el grupo tratado recibió fludarabina a 100 mg/Kg (FLU). Luego de 48 hs de la última inoculación se obtuvieron muestras de sangre periférica (SP), los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron sus ganglios inguinales (GI) y axilares (GA).

Bajo este esquema experimental, ambos grupos de animales presentaron un buen estado general (**Figura 24 A**) y no presentaron diferencias significativas en su peso (**Figura 24 B**). Sin embargo, la sangre periférica de los ratones tratados mostró la característica disminución en los linfocitos circulantes que confirma la efectividad del tratamiento con la droga (**Figura 24 C**). Al realizar inmunomarcaciones confirmamos que los linfocitos T murinos son afectados por la fludarabina aunque, a diferencia de lo que ocurre en los pacientes LLC, la relación CD4:CD8 en sangre periférica no cambió significativamente por efecto del tratamiento (no mostrado).

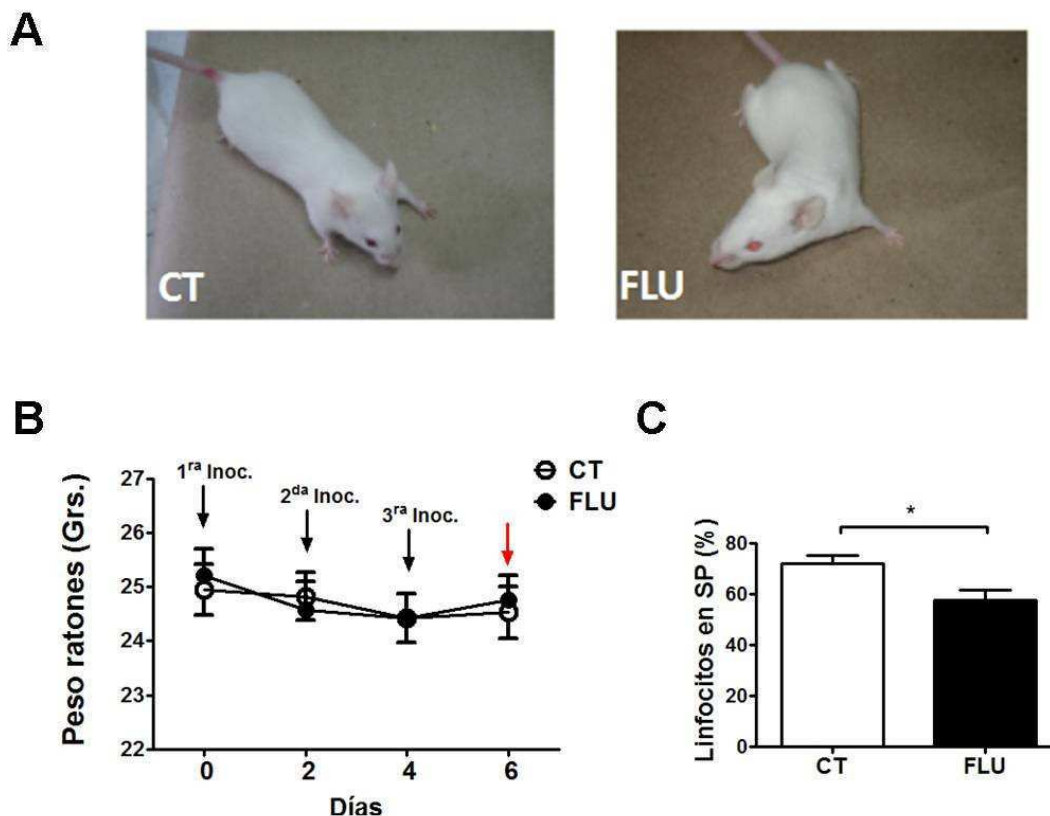


Figura 24: Tratamiento in vivo con fludarabina de ratones BALB/c. **A.** Fotografía de un ratón BALB/C control (CT) y de un ratón BALB/c tratado (FLU) luego de los 3 ciclos de inoculaciones y antes de ser sacrificados. **B.** En el gráfico se muestra el peso de los ratones del grupo CT y FLU a lo largo del tiempo del experimento. Las flechas negras señalan los días correspondientes a inoculaciones de los ratones y la flecha roja indica el día en que fueron sacrificados. (n=12) Mann Whitney test (CT vs. FLU a cada tiempo). **C.** Inmediatamente antes de ser sacrificados, se obtuvieron muestras de sangre periférica de los ratones y se evaluó en contador hematológico la proporción de linfocitos presentes. (n= 12) * p< 0,05 Mann Whitney test.

A continuación, se determinó el número total de células presentes en los ganglios encontrándose un incremento en el número total de linfocitos presentes en los ganglios inguinales y axilares de los ratones que habían sido tratados con fludarabina, siendo esta diferencia estadísticamente significativa para los ganglios inguinales (**Figura 25 A**). Al analizar la subpoblaciones de linfocitos allí presentes, encontramos que los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, pero no

los CD19⁺ (linfocitos B) fueron los que aumentaron en número en los ganglios de los ratones tratados con la droga (**Figura 25 B**).

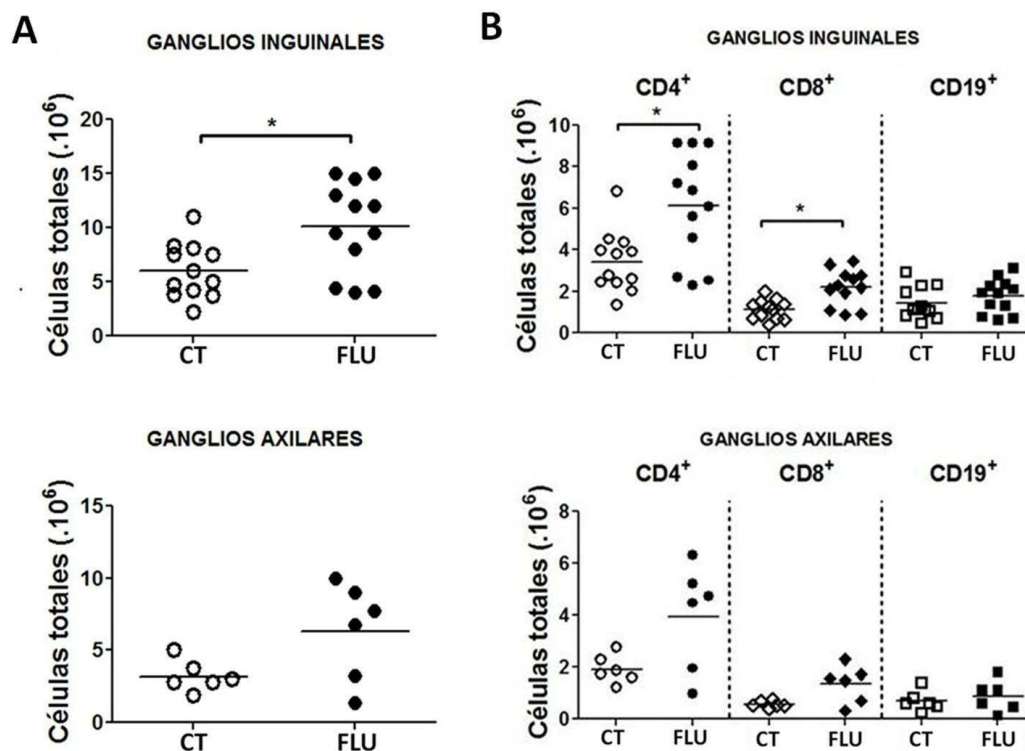


Figura 25: El tratamiento in vivo con fludarabina aumenta el número de linfocitos T en los ganglios de ratones BALB/c. Ratones BALB/c machos de 2 meses de edad fueron (FLU) o no (CT) tratados con fludarabina in vivo según el esquema de la figura 23. Dos días después de la última inoculación fueron sacrificados y se obtuvieron los ganglios inguinales (n=12) y los ganglios axilares (n=6). **A.** La figura muestra el número total de células presentes en el par de ganglios inguinales (panel superior) y en el par de ganglios axilares (panel inferior) de cada ratón BALB/c determinado por recuento en microscopio. **B.** Mediante inmunomarcaciones y citometría de flujo se determinó la proporción de linfocitos CD4, CD8 y CD19 presentes en los ganglios. Se muestra el número total de cada subpoblación de linfocitos en el par de ganglios inguinales (panel superior) y en el par de ganglios axilares (panel inferior) de los ratones CT y FLU. * $p < 0,05$ Mann Whitney test.

Este incremento en el número de linfocitos en los ganglios de los ratones tratados con fludarabina podría explicarse por una migración preferencial de los mismos hacia esos sitios o una proliferación mayor luego del tratamiento,

posibilidades que fueron evaluadas mediante los experimentos que presentamos a continuación.

2. El tratamiento *in vitro* de linfocitos murinos con fludarabina no aumenta su reclutamiento a los órganos linfáticos de ratones BALB/c.

Posteriormente decidimos evaluar si el tratamiento con fludarabina lograba incrementar la capacidad migratoria *in vivo* de los linfocitos. De esta forma, fue posible evaluar el efecto del tratamiento *in vitro* con la droga sobre la totalidad de las interacciones involucradas en el tráfico de las células hacia los órganos linfoides, que incluyen no sólo aquellas entre quimiocinas y sus receptores sino también entre moléculas de adhesión y sus ligandos.

La dosis de fludarabina a emplear se seleccionó evaluando la sensibilidad de los esplenocitos murinos al tratamiento con *in vitro* con la droga (**Figura 26**). Para estos ensayos elegimos la concentración de 1 µg/ml de fludarabina ya que no indujo cambios sustanciales en la viabilidad de las CMT luego de 24 hs de cultivo, de forma que los esplenocitos controles y tratados con fludarabina presentaron una viabilidad similar al ser inoculados en los ratones. Sin embargo, sabemos que es una concentración efectiva dado que a las 48 hs incrementó la apoptosis de las células tratadas respecto del control (**Figura 26**).

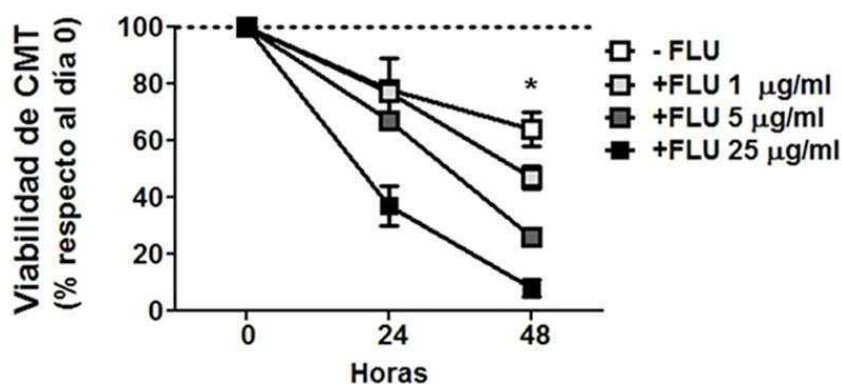


Figura 26: Sensibilidad a la apoptosis inducida por fludarabina in vitro de esplenocitos de ratones BALB/c. Las CMT de bazo de ratones BALB/c fueron cultivadas en ausencia (-FLU) y presencia de fludarabina (+FLU). **A.** El gráfico muestra la viabilidad general relativa al día de inicio del cultivo (viabilidad del día 0=100%) en función del tiempo, evaluada por tinción con el colorante naranja de acridina y bromuro de etidio y recuento en microscopio de fluorescencia. (n=3) * $p < 0,05$ (-FLU vs +FLU25 a 48hs) ANOVA, Friedman Test.

Tal como muestra la **Figura 27**, el esquema general de este experimento constó de tres etapas. En primer lugar, se realizó el tratamiento *in vitro* de los esplenocitos murinos con o sin fludarabina por 18 hs habiendo marcado previamente las células con el colorante CFSE, con el fin de poder seguir posteriormente su distribución *in vivo* (etapa I). Para ello, una parte de los esplenocitos, fue marcada con 1 μM de CFSE y cultivados por 18 hs en medio de cultivo solo (CT), mientras que otra parte de los mismos fue marcada con 10 μM de CFSE y cultivados en presencia de fludarabina (FLU). La marcación con el colorante CFSE no modificó los valores de apoptosis de los cultivos al compararlos con los cultivos de células no marcadas con CFSE (resultados no mostrados). En la segunda etapa de este esquema experimental, los esplenocitos cultivados en ausencia o presencia de fludarabina fueron lavados e inoculados en partes iguales (relación 1:1 para CT:FLU) en forma retro-ocular en ratones de la misma cepa. Por último, los ratones fueron sacrificados luego de 4 horas con el objeto de observar la distribución de los linfocitos inoculados en la sangre periférica y los órganos linfoides (etapa III) [181]. Para ello, se obtuvieron muestras de bazo, médula ósea, ganglios inguinales y sangre periférica, las cuales fueron procesadas y evaluadas por citometría de flujo para determinar la proporción de células controles y tratadas con la droga.

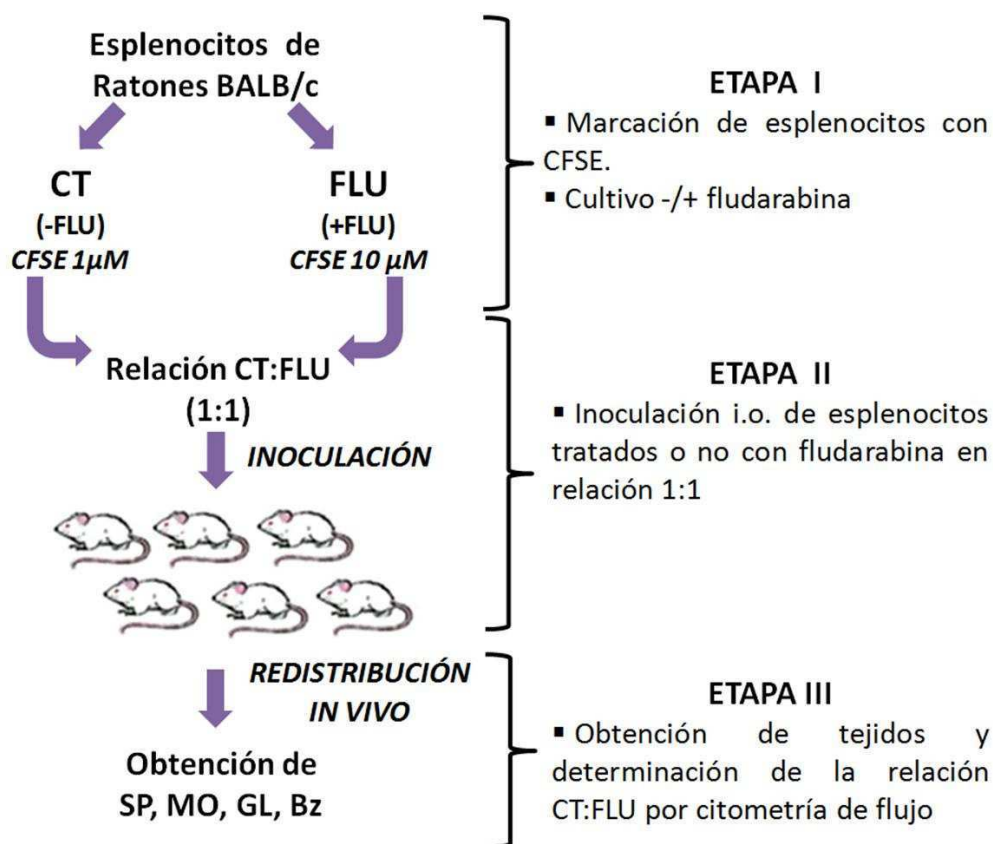


Figura 27: Esquema del protocolo experimental de migración in vivo de esplenocitos controles y tratados con fludarabina. CT: control; FLU: fludarabina; SP: Sangre periférica; MO: Médula ósea; GL: Ganglios linfáticos; Bz: Bazo.

Tal como se observa en el ejemplo representativo de la **Figura 28 A**, al analizar la emisión de fluorescencia del colorante fue posible diferenciar claramente los linfocitos no marcados (propios del ratón que recibió el inóculo) de las dos subpoblaciones de esplenocitos cultivadas en ausencia o presencia de fludarabina (marcadas con 1 y 10 μM de CFSE, respectivamente). Si el tratamiento con fludarabina incrementara la capacidad migratoria *in vivo* de las células hacia los órganos linfoides, los linfocitos que fueron tratados con la droga accederían más fácilmente a los órganos linfoides del ratón en comparación a los linfocitos no tratados, disminuyendo de ese modo la relación entre ellos (CT:FLU). Sin embargo, al analizar las células controles y tratadas con

fludarabina que se hallaban presentes en cada una de las muestras de tejido obtenidas, encontramos que la relación entre células controles y tratadas no se modificó en forma estadísticamente significativa en ninguno de los tejidos evaluados respecto a la relación 1:1 inicial del inóculo (**Figura 28 B**). Inclusive, al contrario de lo que esperábamos, las células controles tienden a acceder más fácilmente hacia la médula ósea y el bazo, aunque sin alcanzar la significancia estadística.

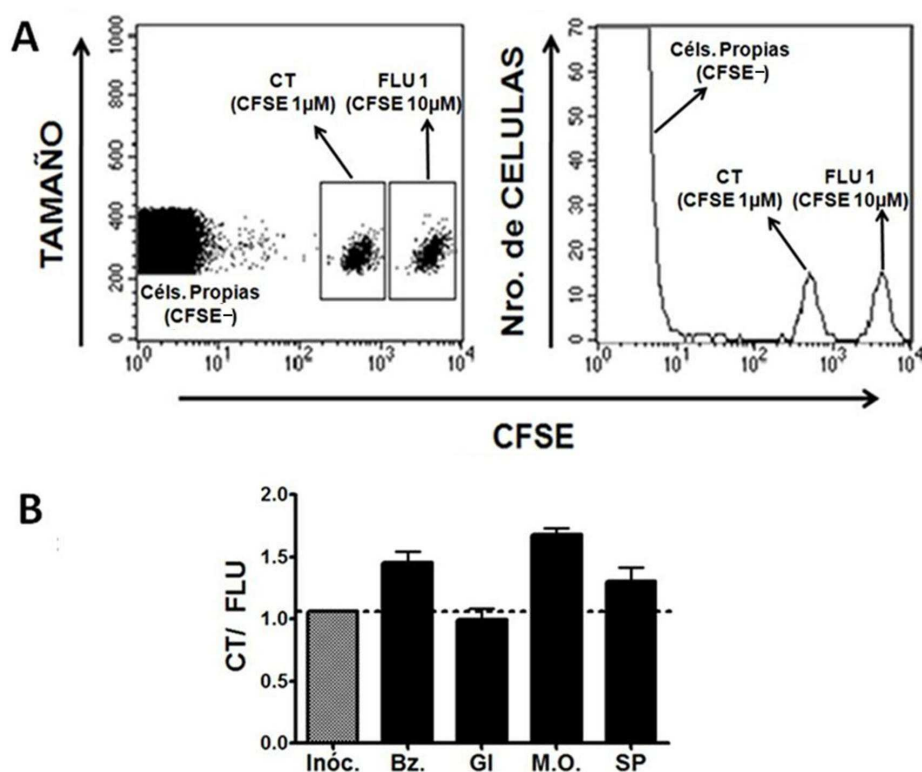


Figura 28: El tratamiento de esplenocitos con fludarabina *in vitro* no incrementa su reclutamiento en tejidos linfoides de ratones BALB/c. **A.** Gráfico de puntos (panel izquierdo) e histograma (panel derecho) de citometría de flujo de ganglios inguinales de ratones BALB/c obtenidos luego de 4 hs de la inoculación de las células CFSE⁺, de un experimento representativo. El gráfico de puntos muestra el tamaño celular en función de la intensidad de fluorescencia del colorante CFSE. CFSE⁻: células propias del ganglio del ratón que recibió el inóculo, CT= células controles CFSE⁺ (1 µM), FLU=células tratadas con fludarabina 1 µg/ml CFSE⁺ (10 µM). A la derecha, el histograma muestra la distribución de los esplenocitos en función de la intensidad de fluorescencia del colorante CFSE. **B.** Resultados obtenidos de un experimento de migración *in vivo*. Se

muestra la relación entre el porcentaje de células CT y el porcentaje de células FLU inoculadas (Inóc.) y encontradas en los distintos órganos de los ratones BALB/c luego de 4 hs de la inoculación de los esplenocitos CFSE⁺. SP: Sangre periférica; GI: ganglios inguinales, Bz: bazo; MO: médula ósea. La línea punteada indica la relación de células CT:FLU presente en el inóculo. (n=5) p>0.05, Wilcoxon Signed Rank Test.

Tampoco encontramos una mayor proporción de células tratadas con fludarabina en los órganos linfoides al extender a 18 hs el tiempo de migración *in vivo* de los esplenocitos inoculados o al reducir el tiempo de cultivo de las células con una concentración mayor de fludarabina (1 hora de cultivo con 5 µg/ml de fludarabina) (resultados no mostrados). En su conjunto, estos resultados indican que el tratamiento de los linfocitos con la droga no favorece su reclutamiento hacia los tejidos linfoides del ratón.

3. El tratamiento in vivo con fludarabina incrementa la proporción de linfocitos Ki67⁺ en el área T de los ganglios de los ratones.

Con el objeto de evaluar si el incremento en el número de linfocitos T en los ganglios de los ratones tratados con la droga se debía a un aumento en su proliferación luego del tratamiento, determinamos por inmunohistoquímica la expresión de CD3, CD20 y del marcador de proliferación Ki-67 en los cortes de tejido de los ganglios inguinales de ambos grupos de ratones. En la **Figura 29** se muestran imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina (**Figura 29 A y B**) y las inmunomarcaciones con CD20 (**Figura 29 C y D**) y CD3 (**Figura 29 E y F**) para identificar a los linfocitos B y T, respectivamente, en los cortes de los ganglios inguinales de los ratones controles y tratados con fludarabina.

En las **Figuras 30 C y D** la inmunomarcación con CD20 evidencia la presencia de linfocitos B en el área cortical de los ganglios y puede observarse una expansión del área paracortical (área T, negativa para el marcador CD20) en

el ganglio del ratón tratado con fludarabina. La expresión de CD3 se muestra en las Figuras 30 E y F, correspondiéndose con el área paracortical de ambos ganglios.

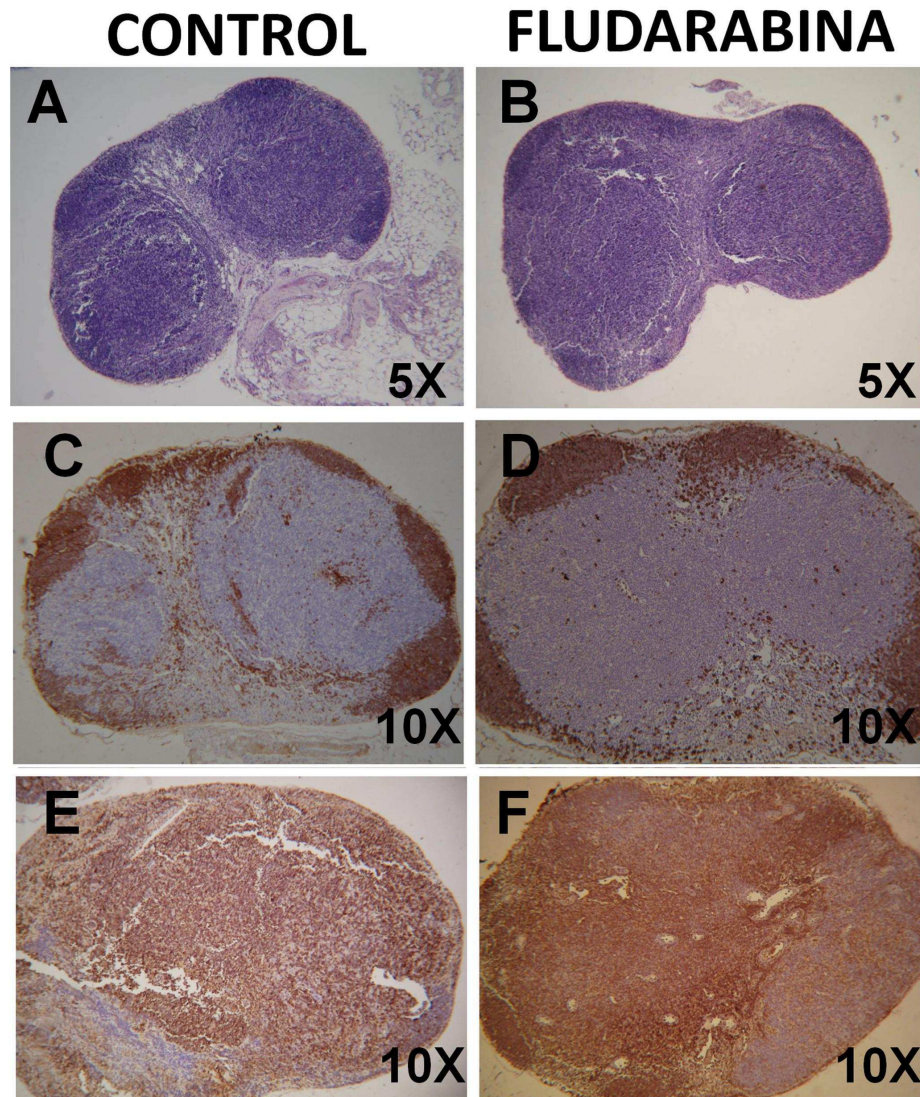


Figura 29: Histología e Inmunohistoquímica de ganglios inguinales de ratones controles y tratados con fludarabina. Imágenes representativas de cortes de ganglio inguinal de un ratón control (A,C,E) y un ratón tratado con fludarabina (B,D,F). La inmunohistoquímica se realizó tal como se detalla en Materiales y Métodos. Hematoxilina y eosina (A y B); expresión de CD20 (C y D); expresión de CD3 (F y E).

Tal como puede observarse en la **Figura 30**, al evaluar la expresión de Ki-67, encontramos que el área T de los ganglios de los ratones tratados con fludarabina presentó una mayor proporción de células Ki-67⁺ (**Figuras 30 B y D**) en comparación con los ratones controles (**Figuras 30 A y C**). En la **Figura 30 E** se muestra la cuantificación de la proporción de células Ki-67⁺ de la muestra.

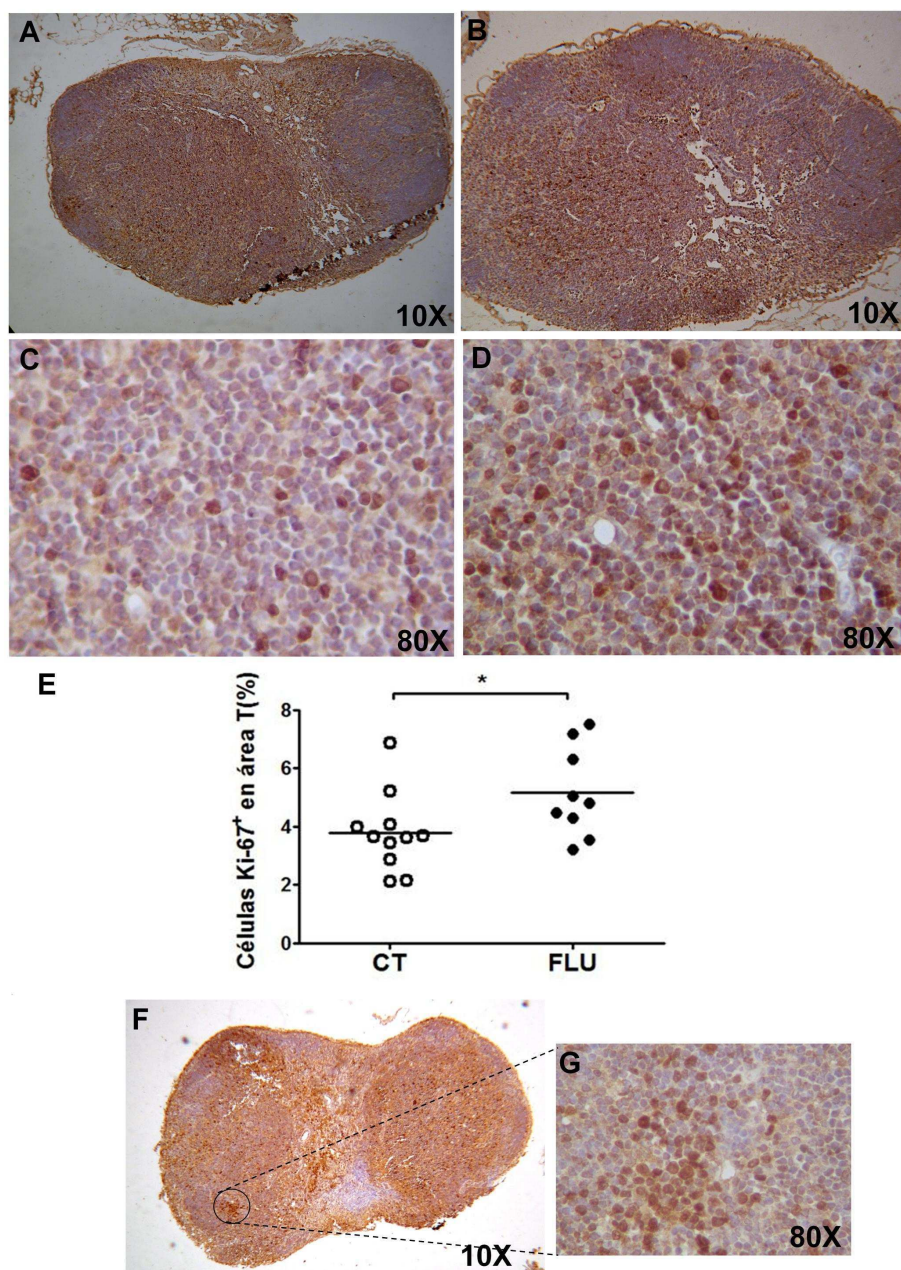


Figura 30: Expresión de Ki-67 en ganglios inguinales de ratones controles y tratados con fludarabina. Imágenes representativas de cortes de ganglio inguinal de un ratón control (A y C) y un ratón tratado con fludarabina (B y D) para evaluar la expresión de

*Ki-67. La inmunohistoquímica se realizó tal como se detalla en Materiales y Métodos. Se grafica el porcentaje de células positivas para Ki-67 cuantificadas a partir de 10 campos tomados de cortes representativos de un ganglio inguinal de un ratón control (CT) y un ganglio inguinal de un ratón tratado con fludarabina (FLU)(E). * $p < 0,05$, Mann Whitney test. Se muestra una foto panorámica de la inmunomarcación con Ki-67 de un ganglio inguinal de un ratón tratado con fludarabina, resaltando en un círculo negro las células agrupadas Ki-67⁺ (F) y una aproximación en esta zona (G).*

Dado que el patrón de expresión de Ki-67 fue en general difuso, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con fludarabina favorecería un incremento en la proliferación basal de los linfocitos del área T. Por otra parte, en uno de los ganglios de los ratones tratados con fludarabina encontramos células de topografía paracortical Ki-67⁺ agrupadas (**Figura 30 F y G**) presentando una morfología nodular característica de una respuesta clonal o antígeno específica (**Figura 30 F**), sin embargo, debemos destacar que esta fue una observación aislada.

En conjunto estos resultados demuestran que el tratamiento *in vivo* de ratones BALB/c con fludarabina incrementa el número de linfocitos T presentes en los ganglios linfáticos aparentemente por un aumento de su proliferación basal.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El análogo de adenosina fludarabina ha demostrado excelentes resultados desde que fue incorporado como parte del tratamiento estándar para los pacientes con LLC. A pesar de la indiscutible efectividad citotóxica de la droga sobre el clon leucémico, esta patología continúa siendo hasta el presente una enfermedad incurable. La falta de éxito en la terapia se debe, en parte, a que algunas células del clon leucémico pueden sobrevivir dentro de los nichos de supervivencia de los órganos linfoides haciendo que, tarde o temprano, el paciente recaiga. Los linfocitos T juegan un papel primordial en el proceso que permite la acumulación del clon leucémico ya que son protagonistas indispensables para su activación y proliferación *in vivo* [121]. Uno de los objetivos de este Trabajo de Tesis fue estudiar el impacto del microambiente tumoral presente en los nichos de supervivencia sobre la apoptosis espontánea e inducida por fludarabina de los linfocitos T de los pacientes.

A fin de recrear el escenario presente en los órganos linfoides, realizamos el ensayo de diferenciación *in vitro* de células NLC de cada paciente a partir de las CMT de sangre periférica. La utilización de esta técnica constituye una herramienta sumamente útil empleada por numerosos grupos para el estudio del microambiente en LLC [99, 107, 130, 148, 182-184]. Si bien la presencia de las NLC ha sido demostrada en los órganos linfáticos secundarios de los pacientes [101, 182], las dificultades éticas y metodológicas para acceder a las muestras de estos tejidos, hacen que el hecho de poder diferenciarlas *in vitro* a partir de las muestras de sangre periférica sea una valiosa herramienta de trabajo. Cuando evaluamos la sobrevivencia de los linfocitos T de los pacientes encontramos que el co-cultivo con las NLC autólogas protegió considerablemente de la apoptosis espontánea a las células, demostrando por primera vez que las NLC no sólo protegen a las células leucémicas de la

apoptosis sino también a los linfocitos T acompañantes. Si bien las NLC se diferencian *in vitro* a partir de los monocitos presentes en las CMT, sólo una vez diferenciadas a NLC fueron capaces de promover la supervivencia de los linfocitos T. En este sentido, demostramos que el cultivo de las CMT no modificó la supervivencia de los linfocitos T allí presentes respecto del cultivo de linfocitos T solos.

El ensayo de diferenciación de las NLC se realizó cultivando a las CMT de los pacientes por 14 días, luego de los cuales las NLC permanecen adheridas a la placa y el resto de las células no adherentes se retiran. Los linfocitos T que se cultivaron con o sin las NLC autólogas se purificaron a partir de esas células no adherentes que habían estado por 14 días en cultivo. Es por eso que el porcentaje inicial de linfocitos T viables (al día de inicio de cultivo) fue variable dependiendo de la muestra analizada y osciló entre un 93% y 60%, con una media de 75% de viabilidad inicial. Sin embargo, en todos los casos, el cultivo en presencia de las NLC autólogas incrementó significativamente la supervivencia de los linfocitos T en comparación a aquellas células que fueron cultivadas solas. Más interesante aún, encontramos que las NLC protegieron a los linfocitos T de los pacientes de la apoptosis inducida por el tratamiento *in vitro* con fludarabina, empleada a concentraciones comparables a las reportadas *in vivo* en el plasma de los pacientes tratados [185]. En este sentido, nuestras observaciones sugieren que los nichos de supervivencia podrían ser el sitio donde también los linfocitos T son protegidos del efecto citotóxico de los agentes terapéuticos.

Nuestro grupo reportó anteriormente que los linfocitos T de los pacientes con LLC contactan con las NLC autólogas *in vitro*, las cuales incrementan la activación y proliferación de los mismos en parte gracias a la producción de CXCL12 [130]. Cuando evaluamos la participación del CXCL12 en el efecto de protección de la apoptosis mediado por las NLC encontramos que el bloqueo de su receptor, el CXCR4, disminuyó su efecto sobre la apoptosis espontánea pero

no modificó la apoptosis inducida por fludarabina. Esto sugiere que el CXCL12, si bien participaría en la protección que las NLC brindan a los linfocitos T en la apoptosis espontánea, no jugaría un papel esencial frente al estímulo pro-apoptótico mediado por la droga. Sin embargo, es necesario extender la cohorte de pacientes analizados a fin de poder concluir en forma definitiva respecto a la participación de dicha quimiocina en la protección de la apoptosis brindada por las NLC.

Sin lugar a dudas, otros factores producidos por estas células también podrían estar incrementando la sobrevivencia de los linfocitos T. Las moléculas BAFF y APRIL producidas por las NLC pueden presentarse tanto asociadas a la membrana de las NLC como de forma soluble y podrían estar involucradas en este proceso. En este sentido, se ha descrito que la molécula BAFF es capaz de co-estimular la activación de los linfocitos T de dadores sanos [186-187] y de los linfocitos T murinos induciendo un aumento en la expresión del factor de sobrevivencia Bcl-2 [188]. Por otra parte, los linfocitos T murinos que sobreexpresan APRIL, presentan un incremento en su sobrevivencia tanto *in vitro* como *in vivo* [189]. Estas evidencias sugieren que las moléculas BAFF y APRIL podrían ser otros factores producidos por las NLC que son capaces de incrementar la sobrevivencia de los linfocitos T. En nuestros ensayos, no hemos encontrado diferencias al comparar la protección que brinda el sobrenadante de cultivo de las NLC con la protección mediada por el contacto con estas células (resultados no mostrados) confirmando la importancia de los factores solubles que secretan las NLC en este proceso.

El estroma de los órganos linfoides también podría modular la sobrevivencia de los linfocitos T de los pacientes ya que ha demostrado ser capaz de proteger al clon leucémico de la apoptosis espontánea e inducida por drogas [102, 148, 151]. En este sentido, es conocido que la interacción de los linfocitos T con las células estromales de la médula ósea es responsable del mantenimiento a largo plazo del conjunto de células T de memoria [190-193]. Asimismo, se ha

reportado que las citoquinas IL-15 e IL-7, que pueden ser producidas por el estroma [194-195], tienen un rol fundamental en la supervivencia y proliferación de los linfocitos T en este microambiente [192, 196]. En particular, el contacto de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con células productoras de IL-15, induciría la activación de los linfocitos T y el incremento de la proteína anti-apoptótica Bcl-x_L [197-198]. En base a estas evidencias es factible que el estroma de los órganos linfoides tenga la capacidad de inhibir la apoptosis espontánea e inducida por fludarabina de los linfocitos T de los pacientes con LLC, sin embargo, restan realizar experimentos a fin de testear esta hipótesis.

Al analizar las poblaciones de linfocitos T mediante inmunomarcaciones encontramos que las NLC protegieron tanto a los linfocitos T CD4⁺ como a los T CD8⁺ de la apoptosis inducida por fludarabina, a pesar de que los linfocitos T CD8⁺ son más sensibles a los efectos pro-apoptóticos inducidos por el tratamiento *in vitro* con la droga [147]. La incrementada susceptibilidad de los linfocitos T CD8⁺ en comparación a los T CD4⁺ a morir por efecto de la fludarabina *in vitro*, se contrapone con lo que se observa *in vivo* en los pacientes tratados, los cuales muestran una reducción más marcada en la población T CD4⁺ [146, 199-200]. Asumiendo que la mayor susceptibilidad de los T CD8⁺ a la fludarabina *in vitro* también ocurre *in vivo*, una explicación sencilla para entender la marcada linfopenia T CD4⁺ que padecen los pacientes tratados con la droga podría involucrar una recuperación más rápida de la subpoblación T CD8⁺. De hecho, se ha reportado un tiempo de duplicación menor para los T CD8⁺ luego de regímenes de quimioterapia intensa, donde los valores de linfocitos T CD8⁺ se recuperan a los tres meses de haber finalizado el tratamiento, mientras que los linfocitos T CD4⁺ continúan bajos aún doce meses luego de finalizada la terapia [201-203]. Por otro lado, los cambios en la relación CD4:CD8 que se observa en los pacientes tratados con fludarabina podrían ser consecuencia de una redistribución diferencial de las subpoblaciones T entre la circulación y los órganos linfoides, tal como se observa luego del tratamiento

con esteroides, donde se han reportado alteraciones en los linfocitos T a consecuencia de un reclutamiento diferencial de las subpoblaciones T CD4⁺ y T CD8⁺ [204].

Al evaluar, mediante ensayos de quimiotaxis *in vitro*, si la fludarabina incrementaba la respuesta migratoria de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de los pacientes a las quimiocinas CXCL12 y CCL21 (que podrían atraerlos a los órganos linfoides [108]) no encontramos diferencias entre las células controles o tratadas con la droga para ninguna de las subpoblaciones T estudiadas. Por el contrario, observamos que la fludarabina fue capaz de incrementar la activación y proliferación de los linfocitos T. Encontramos que este incremento fue mayor para de los linfocitos T CD8⁺ en comparación a la de los T CD4⁺, lo cual podría explicar, al menos en parte, el motivo por el cual los pacientes presentan una inversión en la relación CD4:CD8 luego del tratamiento con la droga.

En concordancia con nuestros resultados, en el año 2011 Gassner y colaboradores, reportaron que las células T de pacientes con LLC que sobreviven al tratamiento *in vitro* con fludarabina, presentan un fenotipo de memoria y proliferan más en respuesta a un cultivo mixto linfocitario o al entrecruzamiento del TCR con anti-CD3 y anti-CD28, en comparación a las células que no fueron pre-tratadas con la droga [205]. Asimismo, los autores demuestran que luego del tratamiento *in vitro* con fludarabina, los linfocitos T aumentan la producción de IFN- γ e IL-2 [205] corroborando los resultados obtenidos por nuestro grupo en el año 2006 [26]. Del mismo modo, otros autores han demostrado que el tratamiento *in vitro* de las células mononucleares totales de pacientes LLC con fludarabina u otros análogos de purina como la cladribina induce un aumento en la expresión de la molécula CD40L en los linfocitos T [206]. Llamativamente, los pacientes que *in vitro* respondieron de esta forma, resultaron ser refractarios al tratamiento *in vivo* con la droga [206]. El conjunto de estas evidencias sugieren que aquellos linfocitos T que sobreviven al tratamiento con fludarabina podrán ser capaces de activarse, proliferar y producir más

citoquinas anti-apoptóticas, generando de esta forma un escenario que favorece la acumulación del clon leucémico y por lo tanto, la recaída del paciente.

Como mencionamos anteriormente, nuestros resultados muestran que los linfocitos T CD8⁺ proliferan en mayor medida que los T CD4⁺ luego del tratamiento con fludarabina. Si bien varios trabajos adjudican a los linfocitos T CD4⁺ el principal rol en promover la sobrevida del clon leucémico, recientemente fue reportado que los linfocitos T CD8⁺ autólogos, en mayor medida que los linfocitos T CD4⁺, inhiben la apoptosis de las células leucémicas *in vitro* [126]. Este efecto sería mediado principalmente por el contacto entre células, aunque ciertos factores solubles, como la interleuquina 4 estarían también involucrados [126]. Asimismo, como se detalló en la introducción, es importante destacar que la capacidad de ejercer mecanismos de citotoxicidad y montar una adecuada respuesta anti-tumoral, se encuentran alterados en los linfocitos T CD8⁺ de los pacientes con LLC y que muchos de estos defectos en su funcionalidad son inducidos por el contacto con las células leucémicas. En este sentido, un trabajo publicado este año demostró que los linfocitos T CD8⁺ de los pacientes con LLC comparten muchas de las características que presentan los linfocitos T con agotamiento funcional, como por ejemplo, la disminución de la capacidad citotóxica y proliferativa, pero se diferencian de ese fenotipo por su capacidad de producir altos niveles de IFN- γ y TNF- α , citoquinas que favorecen la sobrevida del clon leucémico [207]. En conjunto, estas evidencias resaltan el rol de los linfocitos T CD8⁺ como promotores activos de la sobrevida de las células leucémicas más que como clásicos linfocitos T citotóxicos con capacidad de reconocerlas e eliminarlas.

Si bien no conocemos a través de qué mecanismo la fludarabina logra incrementar la proliferación de los linfocitos T, sabemos que no involucra un aumento de la expresión del TCR/CD3 en la superficie de los linfocitos T, ya que

las medias de intensidad de fluorescencia de dichas moléculas no se modificaron por el tratamiento *in vitro* con la droga (resultados no mostrados). La fludarabina podría actuar de modo directo sobre la activación de los linfocitos T, disminuyendo el umbral de señalización requerido para la entrada de las células en división o potenciando la señal impartida a través del TCR. En este sentido, nuestro grupo ha reportado que la fludarabina induce la activación de células monocíticas y que este efecto es mediado a través de la activación de ERK [24], una quinasa que también participa en la señalización a través del TCR [208-209]. Por otro lado, ha sido demostrado que la fludarabina inhibe la funcionalidad de las células T regulatorias y que ésta población es especialmente sensible a los efectos pro-apoptóticos de la droga [210]. Dado que los linfocitos T regulatorios pueden inhibir la proliferación de los linfocitos T acompañantes [211], no podemos descartar que el incremento en la proliferación de los linfocitos T sea consecuencia del efecto de la fludarabina sobre la población regulatoria.

Por otro lado, con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento *in vivo* con fludarabina en la distribución de los linfocitos, empleamos ratones BALB/c, dado que como mencionamos previamente, en la actualidad es muy difícil evaluar este punto en los pacientes con LLC ya que la fludarabina no se administra como monodroga, sino combinada con otros antineoplásicos y además existen complicaciones, tanto metodológicas como éticas, que dificultan el acceso a las muestras de órganos linfoides de los pacientes. El protocolo de inoculaciones que recibieron los ratones fue puesto a punto en nuestro laboratorio previamente, basándonos en la aparición de signos de linfopenia. Bajo estas condiciones experimentales, encontramos que el tratamiento *in vivo* con fludarabina incrementó el número de linfocitos T presentes en los ganglios inguinales y axilares de los ratones BALB/c, pero no modificó el número de linfocitos B.

Posteriormente, quisimos determinar si el incremento en el número de linfocitos T que observamos en los ganglios de los ratones tratados era debido a que la droga favorecía la migración hacia dichos sitios. Para ello realizamos un tratamiento *in vitro* de los esplenocitos con la droga y los inoculamos en ratones de la misma cepa, observando una distribución similar de las células controles y tratadas en los órganos linfoides de los animales. Si bien estas observaciones sugieren que el tratamiento *in vitro* con fludarabina no afecta el reclutamiento de los linfocitos hacia los órganos linfoides, no podemos descartar que el tratamiento *in vivo* con la droga pueda modular la producción de quimiocinas por parte del estroma de los tejidos linfoides y/o las moléculas de adhesión expresadas en el endotelio de modo de incrementar el reclutamiento de linfocitos T en los ganglios linfáticos.

Otra explicación posible a este fenómeno es que la fludarabina estuviera favoreciendo la proliferación de los linfocitos T. En este sentido, al analizar los cortes histológicos de los ganglios encontramos una mayor expresión del marcador de proliferación Ki-67 en el área paracortical (área T) de los ratones tratados con fludarabina, en comparación con los ganglios de los ratones controles. El patrón de expresión de este marcador fue difuso, sugiriendo que la droga indujo un incremento en la proliferación homeostática de los ganglios de los ratones tratados. En este sentido, existen reportes que sugieren que la proliferación homeostática de los linfocitos T puede inducirse como un mecanismo compensatorio ante la depleción de linfocitos [212-214]. En este contexto, la proliferación T en los órganos linfáticos secundarios, sería posible en respuesta a la interacción de baja afinidad del TCR con péptidos propios presentados en las moléculas del CMH, en ausencia de señales co-estimuladoras y de forma dependiente de IL-7 e IL-15 [213-214], cuyos niveles plasmáticos pueden incrementarse por el tratamiento *in vivo* con fludarabina [215]. Si bien el tratamiento de los pacientes con LLC con fludarabina suele reducir el tamaño de las linfadenopatías [216], esto no excluye la posibilidad de que una vez

finalizado el tratamiento, los linfocitos T sobrevivientes incrementen su proliferación homeostática en los ganglios linfáticos.

En nuestro caso, el aumento en el número de linfocitos T en los ganglios de los ratones tratados con fludarabina se encontró siempre asociado a una reducción de los linfocitos circulantes. En este sentido, cuando se redujo el número de inoculaciones de la droga a fin de no observar signos de linfopenia, no encontramos un aumento en el número de células T de los ganglios (resultados no mostrados). En conjunto, estas observaciones sugieren que, tal como está reportado [212, 214], la linfopenia inducida por la droga favorecería la proliferación homeostática de las células T a fin de recuperar los niveles de linfocitos circulantes. Sin embargo, existe la posibilidad de que la fludarabina esté además ejerciendo un efecto inmunomodulador, incrementando esta proliferación basal.

Como conclusión general, los resultados presentados en este trabajo de Tesis demuestran que los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de los pacientes con LLC incrementan su supervivencia gracias al cultivo con las NLC, las cuales también los protegen de la apoptosis inducida por el tratamiento con fludarabina. Asimismo, demostramos que luego del tratamiento con fludarabina, los linfocitos T incrementan su activación y proliferación siendo este efecto más marcado para la subpoblación T CD8⁺. En el modelo que proponemos en la **Figura 31** se observa que el tratamiento con fludarabina ejerce efectos citotóxicos tanto sobre el clon leucémico como sobre los linfocitos T, pero el microambiente de los centros proliferantes favorece la supervivencia de ambos tipos celulares en los órganos linfoides (**Figura 31 A**). Más aún, aquellos linfocitos T que sobrevivan al tratamiento y logren activarse expresarán mayores niveles de CD40L [206], incrementarán su capacidad de proliferación y de producción de citoquinas anti-apoptóticas como el IFN γ [26] (**Figura 31 B**), generando un microambiente propicio para la supervivencia y expansión de las células del clon leucémico presentes en ese nicho (**Figura 31 C**).

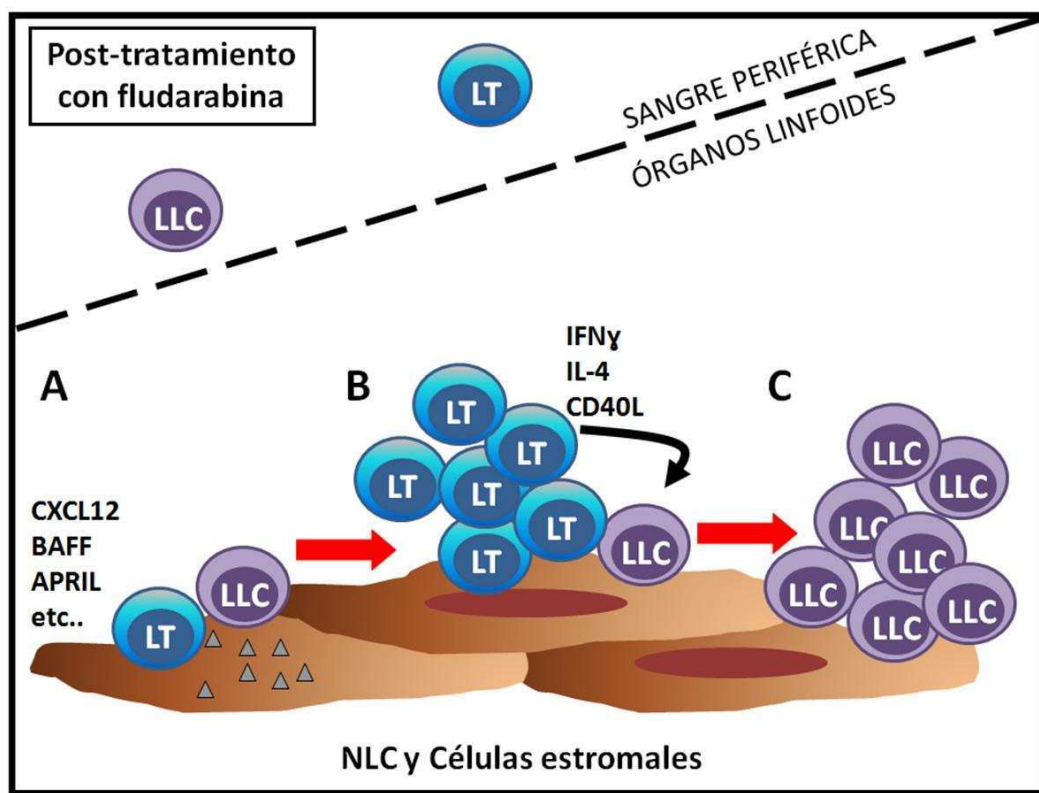


Figura 31: Modelo propuesto de la acción de la fludarabina sobre la supervivencia y funcionalidad de los linfocitos T de los pacientes con LLC y sus posibles implicancias en la falla terapéutica. **A.** Luego del tratamiento, la fludarabina induce la apoptosis de los LT y las células LLC circulantes. En los centros proliferantes (CP) presentes en los órganos linfoides, algunos LT y células LLC logran sobrevivir por la presencia de las NLC y las células estromales en presencia de factores de supervivencia como CXCL12, BAFF, APRIL, entre otros. **B.** Los LT que sobreviven presentarán mayor capacidad de activarse y proliferar, expresarán mayores niveles de interferon γ (IFN γ) y de la molécula CD40L. **C.** Eventualmente, el clon leucémico recibirá estas señales de supervivencia que le permitirán sobrevivir y expandirse en los CP y recuperarse de los efectos de la quimioterapia.

Debido a que la presencia de células leucémicas que sobreviven al tratamiento en los órganos linfoides hace que tarde o temprano el paciente recaiga, el objetivo de las nuevas estrategias terapéuticas es bloquear la interacción de las células LLC con el microambiente de estos nichos a fin de hacerlas más susceptibles al tratamiento [148, 150, 154, 217]. En este sentido,

se han reportado resultados muy alentadores al tratar a los pacientes LLC con inhibidores de proteínas quinasas, entre la que se encuentra Syk, los cuales bloquean las señales de proliferación y supervivencia inducidas a través del BCR [218-219]. Llamativamente, durante las primeras semanas de tratamiento los pacientes reducen significativamente sus linfadenopatías e incrementan la linfocitosis periférica debido a que las células emigran hacia circulación, donde son más susceptibles al tratamiento quimioterápico [219]. Hasta el momento no se han estudiado los efectos de estas novedosas herramientas terapéuticas en la fisiología de los linfocitos T de los pacientes. Nuestras investigaciones actuales están encaminadas en este sentido.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Sirotnak, F.M. and J.R. Barrueco, *Membrane transport and the antineoplastic action of nucleoside analogues*. *Cancer Metastasis Rev*, 1987. **6**(4): p. 459-80.
2. Galmarini, C.M., J.R. Mackey, and C. Dumontet, *Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment*. *Lancet Oncol*, 2002. **3**(7): p. 415-24.
3. Johnson, S.A., *Nucleoside analogues in the treatment of haematological malignancies*. *Expert Opin Pharmacother*, 2001. **2**(6): p. 929-43.
4. Lenz, G., W. Hiddemann, and M. Dreyling, *The role of fludarabine in the treatment of follicular and mantle cell lymphoma*. *Cancer*, 2004. **101**(5): p. 883-93.
5. Keating, M.J., et al., *Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1989. **74**(1): p. 19-25.
6. Platzbecker, U., et al., *Reduced-intensity conditioning followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation in myeloid diseases*. *Ann Hematol*, 2003. **82**(8): p. 463-8.
7. Plunkett, W., et al., *Comparison of the toxicity and metabolism of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and 9-beta-D-arabinofuranosyladenine in human lymphoblastoid cells*. *Cancer Res*, 1980. **40**(7): p. 2349-55.
8. Brockman, R.W., F.M. Schabel, Jr., and J.A. Montgomery, *Biologic activity of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine, a metabolically stable analog of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine*. *Biochem Pharmacol*, 1977. **26**(22): p. 2193-6.
9. Thompson, L.F., et al., *Distribution of ecto-5'-nucleotidase on subsets of human T and B lymphocytes as detected by indirect immunofluorescence using goat antibodies*. *J Immunol*, 1987. **139**(12): p. 4042-8.
10. Damaraju, V.L., et al., *Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy*. *Oncogene*, 2003. **22**(47): p. 7524-36.
11. Cano-Soldado, P. and M. Pastor-Anglada, *Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition*. *Med Res Rev*, 2012. **32**(2): p. 428-57.
12. Hapke, D.M., A.P. Stegmann, and B.S. Mitchell, *Retroviral transfer of deoxycytidine kinase into tumor cell lines enhances nucleoside toxicity*. *Cancer Res*, 1996. **56**(10): p. 2343-7.
13. Galmarini, C.M., J.R. Mackey, and C. Dumontet, *Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies*. *Leukemia*, 2001. **15**(6): p. 875-90.
14. Huang, P., S. Chubb, and W. Plunkett, *Termination of DNA synthesis by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. A mechanism for cytotoxicity*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(27): p. 16617-25.
15. Tseng, W.C., et al., *In vitro biological activity of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and the biochemical actions of its triphosphate on DNA polymerases and ribonucleotide reductase from HeLa cells*. *Mol Pharmacol*, 1982. **21**(2): p. 474-7.
16. White, E.L., et al., *Comparison of the actions of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and 9-beta-D-arabinofuranosyladenine on target enzymes from mouse tumor cells*. *Cancer Res*, 1982. **42**(6): p. 2260-4.

17. Pettitt, A.R., P.D. Sherrington, and J.C. Cawley, *Role of poly(ADP-ribosyl)ation in the killing of chronic lymphocytic leukemia cells by purine analogues*. *Cancer Res*, 2000. **60**(15): p. 4187-93.
18. Parker, W.B., et al., *Interaction of 2-halogenated dATP analogs (F, Cl, and Br) with human DNA polymerases, DNA primase, and ribonucleotide reductase*. *Mol Pharmacol*, 1988. **34**(4): p. 485-91.
19. Huang, P., et al., *Inhibition of RNA transcription: a biochemical mechanism of action against chronic lymphocytic leukemia cells by fludarabine*. *Leukemia*, 2000. **14**(8): p. 1405-13.
20. Huang, P. and W. Plunkett, *Action of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine on RNA metabolism*. *Mol Pharmacol*, 1991. **39**(4): p. 449-55.
21. Genini, D., et al., *Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria*. *Blood*, 2000. **96**(10): p. 3537-43.
22. Vrana, J.A., et al., *Induction of apoptosis and differentiation by fludarabine in human leukemia cells (U937): interactions with the macrocyclic lactone bryostatin I*. *Leukemia*, 1999. **13**(7): p. 1046-55.
23. Eissner, G., et al., *Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide*. *Blood*, 2002. **100**(1): p. 334-40.
24. Fernandez-Calotti, P., et al., *Fludarabine induces pro-inflammatory activation of human monocytic cells through a MAPK/ERK pathway*. *Int Immunopharmacol*, 2006. **6**(5): p. 715-23.
25. Scrivener, S., et al., *Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. *Leuk Lymphoma*, 2003. **44**(3): p. 383-9.
26. Gamberale, R., et al., *The effect of fludarabine on interferon-gamma production by lymphoid cells from healthy donors and patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Haematologica*, 2006. **91**(4): p. 574-6.
27. Chiorazzi, N., K.R. Rai, and M. Ferrarini, *Chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(8): p. 804-15.
28. Redaelli, A., et al., *The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia*. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 2004. **13**(3): p. 279-87.
29. Hallek, M., *Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment*. *Am J Hematol*, 2013.
30. Pritsch, O., K. Maloum, and G. Dighiero, *Basic biology of autoimmune phenomena in chronic lymphocytic leukemia*. *Semin Oncol*, 1998. **25**(1): p. 34-41.
31. Diehl, L.F. and L.H. Ketchum, *Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia*. *Semin Oncol*, 1998. **25**(1): p. 80-97.
32. Hamblin, T., *Is chronic lymphocytic leukemia a response to infectious agents?* *Leuk Res*, 2006. **30**(9): p. 1063-4.
33. D'Arena, G., et al., *Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia*. *Clin Dev Immunol*, 2013. **2013**: p. 730131.
34. Hamblin, T.J., D.G. Oscier, and B.J. Young, *Autoimmunity in chronic lymphocytic leukaemia*. *J Clin Pathol*, 1986. **39**(7): p. 713-6.
35. Hamblin, T.J., *Chronic lymphocytic leukaemia*. *Baillieres Clin Haematol*, 1987. **1**(2): p. 449-91.
36. Morrison, V.A., *The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia*. *Semin Oncol*, 1998. **25**(1): p. 98-106.

37. Dighiero, G., *An attempt to explain disordered immunity and hypogammaglobulinemia in B-CLL*. *Nouv Rev Fr Hematol*, 1988. **30**(5-6): p. 283-8.
38. Wadhwa, P.D. and V.A. Morrison, *Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia*. *Semin Oncol*, 2006. **33**(2): p. 240-9.
39. Hamblin, A.D. and T.J. Hamblin, *The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukaemia*. *Br Med Bull*, 2008. **87**: p. 49-62.
40. Hamblin, T.J. and D.G. Oscier, *Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell*. *Blood Rev*, 1997. **11**(3): p. 119-28.
41. Hamblin, T.J., *Chronic lymphocytic leukaemia: clinical translations of biological features*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. **294**: p. 165-85.
42. Caligaris-Cappio, F. and T.J. Hamblin, *B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(1): p. 399-408.
43. Catovsky, D. and R.L. Murphy, *Key issues in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia (CLL)*. *Eur J Cancer*, 1995. **31A**(13-14): p. 2146-54.
44. Schroeder, H.W., Jr. and G. Dighiero, *The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire*. *Immunol Today*, 1994. **15**(6): p. 288-94.
45. Damle, R.N., et al., *B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes*. *Blood*, 2002. **99**(11): p. 4087-93.
46. Sarfati, M., *CD23 and chronic lymphocytic leukemia*. *Blood Cells*, 1993. **19**(3): p. 591-6; discussion 597-9.
47. Widhopf, G.F., 2nd, et al., *Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins*. *Blood*, 2004. **104**(8): p. 2499-504.
48. Messmer, B.T., et al., *Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia*. *J Exp Med*, 2004. **200**(4): p. 519-25.
49. Ghiotto, F., et al., *Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(7): p. 1008-16.
50. Ghia, P. and F. Caligaris-Cappio, *The origin of B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Semin Oncol*, 2006. **33**(2): p. 150-6.
51. Dighiero, G. and T.J. Hamblin, *Chronic lymphocytic leukaemia*. *Lancet*, 2008. **371**(9617): p. 1017-29.
52. Gribben, J.G., *How I treat CLL up front*. *Blood*, 2010. **115**(2): p. 187-97.
53. Rai, K.R. and A. Sawitsky, *A review of the prognostic role of cytogenetic, phenotypic, morphologic, and immune function characteristics in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood Cells*, 1987. **12**(2): p. 327-38.
54. Binet, J.L., *[The lymphocytes of chronic lymphoid leukemia. Diagnostic, physiologic and prognostic significance]*. *Bull Acad Natl Med*, 1989. **173**(1): p. 73-6; discussion 77.
55. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 1848-54.
56. Wiestner, A., 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**(12): p. 4944-51.

57. Durig, J., et al., *ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia*, 2003. **17**(12): p. 2426-34.
58. Rassenti, L.Z., 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**(9): p. 893-901.
59. Orchard, J.A., et al., *ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia*. *Lancet*, 2004. **363**(9403): p. 105-11.
60. Hamblin, T.J., 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**(3): p. 1023-9.
61. Hamblin, T.J., et al., *Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL*. *Blood*, 2000. **95**(7): p. 2455-7.
62. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 1840-7.
63. Ghia, P., 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**(4): p. 1262-9.
64. Durig, J., et al., *CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia*. *Leukemia*, 2002. **16**(1): p. 30-5.
65. Ibrahim, S., et al., *CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2001. **98**(1): p. 181-6.
66. Gentile, M., 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**(4): p. 549-57.
67. Mehta, K., U. Shahid, and F. Malavasi, *Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions*. *Faseb J*, 1996. **10**(12): p. 1408-17.
68. Deaglio, S., et al., *Human CD38 ligand. A 120-KDA protein predominantly expressed on endothelial cells*. *J Immunol*, 1996. **156**(2): p. 727-34.
69. Morra, M., et al., *CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells*. *Faseb J*, 1998. **12**(7): p. 581-92.
70. Deaglio, S., et al., *Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells*. *Blood*, 2002. **99**(7): p. 2490-8.
71. Lund, F.E., et al., *Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression*. *J Immunol*, 1996. **157**(4): p. 1455-67.
72. Deaglio, S., et al., *CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. *Blood*, 2003. **102**(6): p. 2146-55.
73. D'Arena, G., et al., *Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia*. *Am J Hematol*, 2007. **82**(9): p. 787-91.
74. Del Giudice, I., 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**(10): p. 2124-32.
75. Schroers, R., 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**(5): p. 750-8.
76. Hus, I., et al., *The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. *Ann Oncol*, 2006. **17**(4): p. 683-90.

77. Cerretini, R., et al., *Structural aberrations of chromosomes 17 and 12 in chronic B-cell disorders*. Eur J Haematol, 2003. **71**(6): p. 433-8.
78. Dewald, G.W., 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**(2): p. 287-95.
79. Chen, L., et al., *Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4609-14.
80. Lanham, S., et al., *Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2003. **101**(3): p. 1087-93.
81. Stevenson, F.K. and F. Caligaris-Cappio, *Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4389-95.
82. Nedellec, S., et al., *B cell response to surface IgM cross-linking identifies different prognostic groups of B-chronic lymphocytic leukemia patients*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3749-56.
83. Richardson, S.J., 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**(9): p. 3584-92.
84. Deaglio, S., et al., *CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential*. Blood, 2007.
85. Kipps, T.J., *Signal transduction pathways and mechanisms of apoptosis in CLL B-lymphocytes: their role in CLL pathogenesis*. Hematol Cell Ther, 1997. **39 Suppl 1**: p. S17-27.
86. Robertson, L.E. and W. Plunkett, *Apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 1993. **11 Suppl 2**: p. 71-4.
87. Kitada, S., et al., *Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3379-89.
88. Dameshek, W., *Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes*. Blood, 1967. **29**(4): p. Suppl:566-84.
89. Rosenwald, A., et al., *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1639-47.
90. Damle, R.N., 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**(2): p. 375-82.
91. Ghia, P., et al., *Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **294**: p. 135-45.
92. Caligaris-Cappio, F., *Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2003. **123**(3): p. 380-8.
93. Messmer, B.T., et al., *In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 755-64.
94. Till, K.J., et al., *The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2977-84.

95. Lopez-Giral, S., 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**(2): p. 462-71.
96. Burger, J.A., M. Burger, and T.J. Kipps, *Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells*. *Blood*, 1999. **94**(11): p. 3658-67.
97. Gamberale, R., et al., *Non-malignant leukocytes delay spontaneous B-CLL cell apoptosis*. *Leukemia*, 2001. **15**(12): p. 1860-7.
98. Gamberale, R., et al., *Immune complexes inhibit apoptosis of chronic lymphocytic leukaemia B cells*. *Br J Haematol*, 1999. **107**(4): p. 870-6.
99. Nishio, M., 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**(3): p. 1012-20.
100. Burger, J.A., et al., *Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1*. *Blood*, 2000. **96**(8): p. 2655-63.
101. Burkle, A., et al., *Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2007. **110**(9): p. 3316-25.
102. Burger, J.A. and T.J. Kipps, *Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Leuk Lymphoma*, 2002. **43**(3): p. 461-6.
103. Poggi, A., et al., *Engagement of CD31 delivers an activating signal that contributes to the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells*. *Br J Haematol*, 2010. **151**(3): p. 252-64.
104. Crawford, D.H. and D. Catovsky, *In vitro activation of leukaemic B cells by interleukin-4 and antibodies to CD40*. *Immunology*, 1993. **80**(1): p. 40-4.
105. Kitada, S., et al., *Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. *Br J Haematol*, 1999. **106**(4): p. 995-1004.
106. Granziero, L., et al., *Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2001. **97**(9): p. 2777-83.
107. Burger, J.A., et al., *High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation*. *Blood*, 2009. **113**(13): p. 3050-8.
108. Borge, M., et al., *CXCL12-induced chemotaxis is impaired in T cells from patients with ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukemia*. *Haematologica*, 2010. **95**(5): p. 768-75.
109. Frolova, E.A., et al., *Immunophenotypic and DNA genotypic analysis of T-cell and NK-cell subpopulations in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL)*. *Leuk Lymphoma*, 1995. **16**(3-4): p. 307-18.
110. Rezvany, M.R., et al., *Oligoclonal TCRBV gene usage in B-cell chronic lymphocytic leukemia: major perturbations are preferentially seen within the CD4 T-cell subset*. *Blood*, 1999. **94**(3): p. 1063-9.
111. Rezvany, M.R., et al., *Leukemia-associated monoclonal and oligoclonal TCR-BV use in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2003. **101**(3): p. 1063-70.

112. Foa, R., et al., *Reduced T-colony forming capacity in B-chronic lymphocytic leukaemia.--II. Correlation with clinical stage and findings in B-prolymphocytic leukaemia.* Leuk Res, 1982. **6**(3): p. 329-33.
113. Zaknoen, S.L. and N.E. Kay, *Immunoregulatory cell dysfunction in chronic B-cell leukemias.* Blood Rev, 1990. **4**(3): p. 165-74.
114. Ramsay, A.G., et al., *Chronic lymphocytic leukemia cells induce defective LFA-1-directed T-cell motility by altering Rho GTPase signaling that is reversible with lenalidomide.* Blood, 2013. **121**(14): p. 2704-14.
115. Gorgun, G., et al., *Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells.* J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1797-805.
116. Ramsay, A.G., 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**(7): p. 2427-37.
117. Serrano, D., et al., *Clonal expansion within the CD4+CD57+ and CD8+CD57+ T cell subsets in chronic lymphocytic leukemia.* J Immunol, 1997. **158**(3): p. 1482-9.
118. Farace, F., et al., *T cell repertoire in patients with B chronic lymphocytic leukemia. Evidence for multiple in vivo T cell clonal expansions.* J Immunol, 1994. **153**(9): p. 4281-90.
119. Dazzi, F., et al., *Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens.* Clin Immunol Immunopathol, 1995. **75**(1): p. 26-32.
120. Roth, A., et al., *Significantly shorter telomeres in T-cells of patients with ZAP-70+/CD38+ chronic lymphocytic leukaemia.* Br J Haematol, 2008. **143**(3): p. 383-6.
121. Bagnara, D., et al., *A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease.* Blood, 2011. **117**(20): p. 5463-72.
122. Buschle, M., et al., *Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia.* J Exp Med, 1993. **177**(1): p. 213-8.
123. Mainou-Fowler, T. and A.G. Prentice, *Modulation of apoptosis with cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukaemia.* Leuk Lymphoma, 1996. **21**(5-6): p. 369-77.
124. de Toter, D., 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**(3): p. 589-99.
125. Dancescu, M., et al., *Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression.* J Exp Med, 1992. **176**(5): p. 1319-26.
126. Kiaii, S., 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, 2013. **62**(1): p. 51-63.
127. Ahearne, M.J., et al., *Enhancement of CD154/IL4 proliferation by the T follicular helper (Tfh) cytokine, IL21 and increased numbers of circulating cells resembling Tfh cells in chronic lymphocytic leukaemia.* Br J Haematol, 2013. **162**(3): p. 360-70.
128. Bauquet, A.T., et al., *The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells.* Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 167-75.

129. Ghalamfarsa, G., et al., *Differential regulation of B-cell proliferation by IL21 in different subsets of chronic lymphocytic leukemia*. Cytokine, 2013. **62**(3): p. 439-45.
130. Borge, M., et al., *CXCL12 is a costimulator for CD4+ T cell activation and proliferation in chronic lymphocytic leukemia patients*. Cancer Immunol Immunother, 2013. **62**(1): p. 113-24.
131. Tam, C.S. and M.J. Keating, *Chemoimmunotherapy of chronic lymphocytic leukemia*. Best Pract Res Clin Haematol, 2007. **20**(3): p. 479-98.
132. Elter, T., M. Hallek, and A. Engert, *Fludarabine in chronic lymphocytic leukaemia*. Expert Opin Pharmacother, 2006. **7**(12): p. 1641-51.
133. Lobetti-Bodoni, C., et al., *The changing paradigm of CLL management*. Eur J Intern Med, 2013.
134. Eichhorst, B.F., et al., *Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2006. **107**(3): p. 885-91.
135. Flinn, I.W., et al., *Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997*. J Clin Oncol, 2007. **25**(7): p. 793-8.
136. Keating, M.J., et al., *Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Oncol, 2005. **23**(18): p. 4079-88.
137. Tam, C.S., et al., *Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2008. **112**(4): p. 975-80.
138. Rai, K.R., et al., *Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2000. **343**(24): p. 1750-7.
139. Hillmen, P., et al., *Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Oncol, 2007. **25**(35): p. 5616-23.
140. Hillmen, P., *Using the biology of chronic lymphocytic leukemia to choose treatment*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. **2011**: p. 104-9.
141. Stilgenbauer, S. and H. Dohner, *Campath-1H-induced complete remission of chronic lymphocytic leukemia despite p53 gene mutation and resistance to chemotherapy*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 452-3.
142. Lukenbill, J. and M. Kalaycio, *Fludarabine: A review of the clear benefits and potential harms*. Leuk Res, 2013.
143. Kowal, M., et al., *Efficacy and safety of fludarabine and cyclophosphamide combined therapy in patients with refractory/recurrent B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL)-Polish multicentre study*. Leuk Lymphoma, 2004. **45**(6): p. 1159-65.
144. Keating, M.J., et al., *Long-Term Follow-Up of Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Receiving Fludarabine Regimens as Initial Therapy*. Blood, 1998. **92**(4): p. 1165-1171.
145. Sanders, C., E.A. Perez, and H.J. Lawrence, *Opportunistic infections in patients with chronic lymphocytic leukemia following treatment with fludarabine*. Am J Hematol, 1992. **39**(4): p. 314-5.
146. Wijermans, P.W., W.B. Gerrits, and H.L. Haak, *Severe immunodeficiency in patients treated with fludarabine monophosphate*. Eur J Haematol, 1993. **50**(5): p. 292-6.

147. Gamberale, R., et al., *In vitro susceptibility of CD4+ and CD8+ T cell subsets to fludarabine*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(11): p. 2185-91.
148. Stamatopoulos, B., et al., *AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments*. *Haematologica*, 2012. **97**(4): p. 608-615.
149. Burger, 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**(5): p. 1824-30.
150. Hoellenriegel, J., 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**(13): p. 3603-12.
151. Kurtova, A.V., et al., *Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance*. *Blood*, 2009. **114**(20): p. 4441-50.
152. Kay, N.E., et al., *Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch"*. *Leukemia Research*, 2007. **31**(7): p. 899-906.
153. Zucchetto, A., et al., *CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival*. *Cancer Res*, 2009. **69**(9): p. 4001-9.
154. Buchner, M., et al., *Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2010. **115**(22): p. 4497-506.
155. Endo, T., et al., *BAFF And APRIL Support Chronic Lymphocytic Leukemia B Cell Survival Through Activation Of The Canonical NF- κ B Pathway*. *Blood*, 2006.
156. Jaksic, O., et al., *CD38 on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells has higher expression in lymph nodes than in peripheral blood or bone marrow*. *Blood*, 2004. **103**(5): p. 1968-a-1969.
157. Herishanu, Y., et al., *The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2011. **117**(2): p. 563-74.
158. Boelens, J., J. Philippe, and F. Offner, *B-CLL cells from lymph nodes express higher ZAP-70 levels than B-CLL cells from peripheral blood*. *Leuk Res*, 2007. **31**(5): p. 719-20.
159. Cutrona, G., et al., *B lymphocytes in humans express ZAP-70 when activated in vivo*. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(3): p. 558-69.
160. Rooij, M.F.M.d., et al., *The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*.
161. Stamatopoulos, B., 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.
162. Andritsos L, B.J., Hewes B, Kipps T, Johns D, Burger J. , *Preliminary results from a phase I dose escalation study to determine the maximum tolerated dose*

- of Plerixafor in combination with rituximab in patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia.* . Haematologica, 2010. **95**[suppl.2]:**321**, abs. **0772**.
163. Duke, R.C. and J.J. Cohen, *Morphological and biochemical assays of apoptosis.* JE Coligan, and AM Kriusbeek, and DH Margulis, and EM Shevach, and W. Strober, eds. Current Protocols in Immunology, Unit, 1992. **3**.
 164. Crespo, M., et al., *ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia.* N Engl J Med, 2003. **348**(18): p. 1764-75.
 165. Fulcher, D. and S. Wong, *Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory.* Immunol Cell Biol, 1999. **77**(6): p. 559-64.
 166. Muul, L.M., et al., *Measurement of proliferative responses of cultured lymphocytes.* Curr Protoc Immunol, 2011. **Chapter 7**: p. Unit7 10.
 167. Swat, W., L. Ignatowicz, and P. Kisielow, *Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry.* J Immunol Methods, 1991. **137**(1): p. 79-87.
 168. Wlodkowic, D., J. Skommer, and Z. Darzynkiewicz, *Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances.* Exp Oncol, 2012. **34**(3): p. 255-62.
 169. Williams, O., *Flow cytometry-based methods for apoptosis detection in lymphoid cells.* Methods Mol Biol, 2004. **282**: p. 31-42.
 170. Wlodkowic, D., et al., *Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death.* Methods Cell Biol, 2011. **103**: p. 55-98.
 171. Arase, N., et al., *Mitogenic effect of HIV-infected human T cell lines on mouse B cells mediated by surface immunoglobulin.* Clin Exp Immunol, 1996. **103**(1): p. 24-9.
 172. Okabe, S., et al., *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**(2): p. 308-14.
 173. Patrussi, L., et al., *p52Shc is required for CXCR4-dependent signaling and chemotaxis in T cells.* Blood, 2007. **110**(6): p. 1730-8.
 174. Wang, X.Q., et al., *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling.* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005. **37**(6): p. 379-85.
 175. Darzynkiewicz, Z., et al., *Features of apoptotic cells measured by flow cytometry.* Cytometry, 1992. **13**(8): p. 795-808.
 176. Zembruski, N.C.L., et al., *7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry.* Analytical Biochemistry, 2012. **429**(1): p. 79-81.
 177. Resch K, F.E., *Structure and Function*, in *The Lymphocyte*, J.J. Marchalonis, ed., Editor. 1987, Marcel Decker: New York. p. pp. 171-221.
 178. Nowell, P.C., *Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes.* Cancer Res, 1960. **20**: p. 462-6.
 179. Kiaii, S., 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.
 180. Molina-Arcas, M., et al., *Fludarabine uptake mechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2003. **101**(6): p. 2328-34.
 181. Weston, S.A. and C.R. Parish, *New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy.* J Immunol Methods, 1990. **133**(1): p. 87-97.

182. Tsukada, N., et al., *Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2002. **99**(3): p. 1030-7.
183. Burger, J.A., *Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011. **2011**: p. 96-103.
184. Crocci, D., et al., *Nurse like cells promote differentiation of CLL cells via Galectin-1 dependent mechanisms*. *Haematologica*, 2009. **94**(s3).
185. Bellosillo, B., et al., *In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1999. **94**(8): p. 2836-43.
186. Huard, B., et al., *T cell costimulation by the TNF ligand BAFF*. *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6225-31.
187. Huard, B., et al., *BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation*. *Int Immunol*, 2004. **16**(3): p. 467-75.
188. Ng, L.G., et al., *B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(2): p. 807-17.
189. Stein, J.V., et al., *APRIL modulates B and T cell immunity*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(12): p. 1587-98.
190. Hanazawa, A., et al., *CD49b-dependent establishment of T helper cell memory*. *Immunol Cell Biol*, 2013. **91**(8): p. 524-31.
191. Letsch, A., et al., *CMV-specific central memory T cells reside in bone marrow*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(11): p. 3063-8.
192. Tokoyoda, K., et al., *Professional memory CD4+ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow*. *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 721-30.
193. Byrne, S.M., et al., *Cathepsin B controls the persistence of memory CD8+ T lymphocytes*. *J Immunol*, 2012. **189**(3): p. 1133-43.
194. Mrozek, E., P. Anderson, and M.A. Caligiuri, *Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells*. *Blood*, 1996. **87**(7): p. 2632-40.
195. Tokoyoda, K., et al., *Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development*. *Immunity*, 2004. **20**(6): p. 707-18.
196. Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory and effector memory CD4+ T cells*. *Pathol Biol (Paris)*, 2003. **51**(2): p. 64-6.
197. Oh, S., et al., *IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(13): p. 5201-6.
198. Berard, M., et al., *IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells*. *J Immunol*, 2003. **170**(10): p. 5018-26.
199. Morrison, V.A., *Infectious complications of chronic lymphocytic leukaemia: pathogenesis, spectrum of infection, preventive approaches*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2010. **23**(1): p. 145-53.
200. Boldt, D.H., et al., *Effects on human peripheral lymphocytes of in vivo administration of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine-5'-monophosphate (NSC 312887), a new purine antimetabolite*. *Cancer Res*, 1984. **44**(10): p. 4661-6.
201. Honda, K., et al., *Thymus-independent expansion of T lymphocytes in children after allogeneic bone marrow transplantation*. *Bone Marrow Transplant*, 2000. **25**(6): p. 647-52.

202. Mackall, C.L., et al., *Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3700-7.
203. Mackall, C.L. and R.E. Gress, *Thymic aging and T-cell regeneration*. Immunol Rev, 1997. **160**: p. 91-102.
204. ten Berge, R.J., et al., *Administration of prednisolone in vivo affects the ratio of OKT4/OKT8 and the LDH-isoenzyme pattern of human T lymphocytes*. Clin Immunol Immunopathol, 1984. **30**(1): p. 91-103.
205. Gassner, F.J., et al., *Fludarabine modulates composition and function of the T cell pool in patients with chronic lymphocytic leukaemia*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(1): p. 75-85.
206. Citores, M.J., et al., *CD154 expression triggered by purine analogues in vitro: Correlation with treatment response and autoimmune events in chronic lymphocytic leukemia*. Exp Hematol, 2010. **38**(3): p. 165-73.
207. Riches, J.C., et al., *T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production*. Blood, 2013. **121**(9): p. 1612-21.
208. Shui, J.W., et al., *Hematopoietic progenitor kinase 1 negatively regulates T cell receptor signaling and T cell-mediated immune responses*. Nat Immunol, 2007. **8**(1): p. 84-91.
209. Zhang, Y. and A. Rundell, *Comparative study of parameter sensitivity analyses of the TCR-activated Erk-MAPK signalling pathway*. Syst Biol (Stevenage), 2006. **153**(4): p. 201-11.
210. Beyer, M., et al., *Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine*. Blood, 2005. **106**(6): p. 2018-25.
211. Buckner, J.H., *Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 849-59.
212. Tchao, N.K. and L.A. Turka, *Lymphodepletion and homeostatic proliferation: implications for transplantation*. Am J Transplant, 2012. **12**(5): p. 1079-90.
213. Datta, S. and N. Sarvetnick, *Lymphocyte proliferation in immune-mediated diseases*. Trends Immunol, 2009. **30**(9): p. 430-8.
214. Williams, K.M., F.T. Hakim, and R.E. Gress, *T cell immune reconstitution following lymphodepletion*. Semin Immunol, 2007. **19**(5): p. 318-30.
215. Wallen, H., et al., *Fludarabine modulates immune response and extends in vivo survival of adoptively transferred CD8 T cells in patients with metastatic melanoma*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4749.
216. Keating, M.J., et al., *Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy*. Blood, 1998. **92**(4): p. 1165-71.
217. Burger, J.A., *Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape*. Curr Opin Oncol, 2012. **24**(6): p. 643-9.
218. Spurgeon, S.E., et al., *The selective SYK inhibitor P505-15 (PRT062607) inhibits B cell signaling and function in vitro and in vivo and augments the activity of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. **344**(2): p. 378-87.
219. Robak, T. and P. Robak, *BCR signaling in chronic lymphocytic leukemia and related inhibitors currently in clinical studies*. Int Rev Immunol, 2013. **32**(4): p. 358-76.

