

UNIVERSIDAD DE OVIEDO



# **EFFECTO DE LA ACTIVACIÓN E INHIBICIÓN DE CÉLULAS LINFOIDES EN LA RESPUESTA ANTITUMORAL DE CÉLULAS NK**

---

**Trabajo de Fin de Máster**

11 de junio de 2014

**Seila Lorenzo Herrero**

**Tutor: Dr. Segundo González Rodríguez**

*Máster en Biomedicina y Oncología Molecular  
Universidad de Oviedo  
Curso 2013-2014*

## ***AGRADECIMIENTOS***

---

Querría expresar mi gratitud a todas aquellas personas que me han ayudado en la realización de este Trabajo de Fin de Máster.

En primer lugar, le doy las gracias a mi tutor y director, el Dr. Segundo González, por haberme ofrecido la oportunidad de trabajar en este proyecto con la convicción de que sería capaz de sacarlo adelante.

También quiero darle las gracias a Mónica Villa, que me ha tenido este curso como “esbirrilla” a la que educar en temas cinéfilos y me ha enseñado todo lo necesario para que yo pudiera valerme por mí misma en el laboratorio.

Y no me puedo olvidar de dar las gracias a Andrea y a Alejandro, que me han amenizado muchos ratos del laboratorio con sus conversaciones y han respondido a mis preguntas ayudándome siempre que podían.

Por último, agradecer a la Dra. Ana González Rodríguez y al Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Oviedo por proporcionarnos las muestras necesarias para el estudio.

## ***ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS***

---

APC: alofocianina.

BCR: receptor de células B.

CD: *cluster* de diferenciación.

CFBlue: fluorocromo *Pacific Blue*.

CFSE: carboxyfluorescein N-succinimidyl ester.

DMSO: dimetil sulfóxido.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

HEPES: ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etano-sulfónico.

HLA-I/II: antígeno leucocitario humano de clase I/II.

IGVH: región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

IgM/D: inmunoglobulina M/D.

LAMP-1: proteína de membrana asociada a lisosomas-1.

LLC: leucemia linfática crónica.

LPS: lipopolisacárido.

RPMI (medio): Roswell Park Memorial Institute (medio).

MHC-I: complejo mayor de histocompatibilidad de clase I.

NK: *natural killer*.

NKT: *natural killer T*.

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

PBS: tampón fosfato salino.

PE: ficoeritrina.

PerCP: complejo clorofila-perinidina.

PI: yoduro de propidio.

PMA: forbol 12-miristato 14-acetato.

## ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1. La respuesta inmune contra el cáncer.....	2
1.1. Teoría del Inmunomodelado del Cáncer.....	2
1.2. Células inmunes implicadas en la respuesta inmune antitumoral.....	4
2. Leucemia linfática crónica.....	7
3. Señalización del receptor de antígenos de linfocitos B.....	8
3.1. Implicación del BCR en el desarrollo de enfermedades hematológicas.....	10
<b>OBJETIVOS</b> .....	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
1. Materiales.....	13
1.1. Reactivos.....	13
1.2. Anticuerpos.....	13
2. Cultivos celulares.....	13
3. Ensayos de activación/inhibición.....	15
3.1. Activación.....	15
3.2. Inhibición.....	15
4. Citometría de flujo.....	15
4.1. Marcaje de moléculas activadoras.....	15
4.2. Ensayo de apoptosis.....	16
4.3. Ensayo de desgranulación de células NK.....	16
4.4. Ensayo de proliferación.....	17
5. Análisis de datos.....	17
<b>RESULTADOS</b> .....	18
1. Activación de linfocitos B.....	18
1.1. Presencia en membrana de moléculas de activación.....	18
1.2. Efecto directo del tratamiento sobre la supervivencia celular.....	20
1.3. Activación de células NK en respuesta a linfocitos B activados.....	21
2. Inhibición de linfocitos B.....	22
2.1. Presencia en membrana de moléculas de activación.....	23
2.2. Efecto directo del tratamiento con dasatinib sobre la supervivencia celular.....	24
2.3. Activación de células NK en respuesta a linfocitos B inhibidos.....	25

<b>DISCUSIÓN</b> .....	26
<b>CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	30

## *RESUMEN*

---

Puesto que la eliminación por el sistema inmune es un mecanismo clave en la lucha contra el crecimiento tumoral, la investigación en este campo y la localización de dianas implicadas en la evasión inmune podría suponer el posterior desarrollo de aproximaciones terapéuticas a este nivel. En el caso de los tumores que afectan a los linfocitos B, la resistencia a la eliminación por el sistema inmune, entre otras propiedades de estas células tumorales, podría estar relacionada con la señalización a través de la vía del receptor de linfocitos B, que se ha visto sobreactivada en linfocitos B neoplásicos y que juega un papel importante en el origen y patogénesis de estas enfermedades, especialmente de la leucemia linfática crónica.

En este trabajo se ha estudiado como influye la activación/inhibición de la cascada del BCR en características propias de las células neoplásicas, como son la supervivencia o la resistencia a ser eliminadas por el sistema inmune. Adicionalmente se ha determinado si la activación de las células por otras vías tiene alguna relación con esas mismas propiedades.

De forma general, se han llevado a cabo, por un lado, ensayos específicos para determinar la supervivencia de las células neoplásicas una vez tratadas con una serie de agentes, observándose un efecto variable en las distintas células utilizadas, tanto de líneas celulares como de muestras de pacientes. Por tanto, a partir de este estudio no se puede establecer una relación clara que conecte la supervivencia celular con el estado de activación de la señalización por el BCR.

Asimismo, se han realizado ensayos de activación para evaluar la estimulación de células NK en respuesta a las células tumorales, donde no se encontraron cambios asociados al tratamiento. Sin embargo, es necesario realizar ensayos complementarios que corroboren los efectos identificados con el fin de esclarecer el papel del BCR en la capacidad de evasión inmune de los linfocitos B neoplásicos.

### **1. La respuesta inmune contra el cáncer**

El sistema inmune desempeña una defensa activa frente a la aparición de cáncer, además de ejercer un papel crucial en la eliminación de patógenos. Concretamente, el sistema inmune puede actuar a distintos niveles en la prevención de tumores (Schreiber *et al.*, 2011):

- Eliminación de células infectadas por virus, previniendo la aparición de tumores de origen vírico.
- Reconocimiento y eliminación de células transformadas a tumorales que expresan antígenos específicos.
- Activación de inflamación en la zona de aparición de un tumor para atraer células inmunes, promoviendo rechazo de ese tumor y rápida resolución de la misma para evitar crear un microambiente que favorezca la tumorigénesis.

Además de estas funciones, distintos trabajos de investigación han permitido ampliar el papel del sistema inmune en el desarrollo de tumores. No sólo está relacionado con la prevención y control del crecimiento tumoral sino que, además, la respuesta inmune puede facilitar la transformación celular y modelar la inmunogenicidad del tumor (Mittal *et al.*, 2014).

#### **1.1. Teoría del Inmunomodelado del Cáncer**

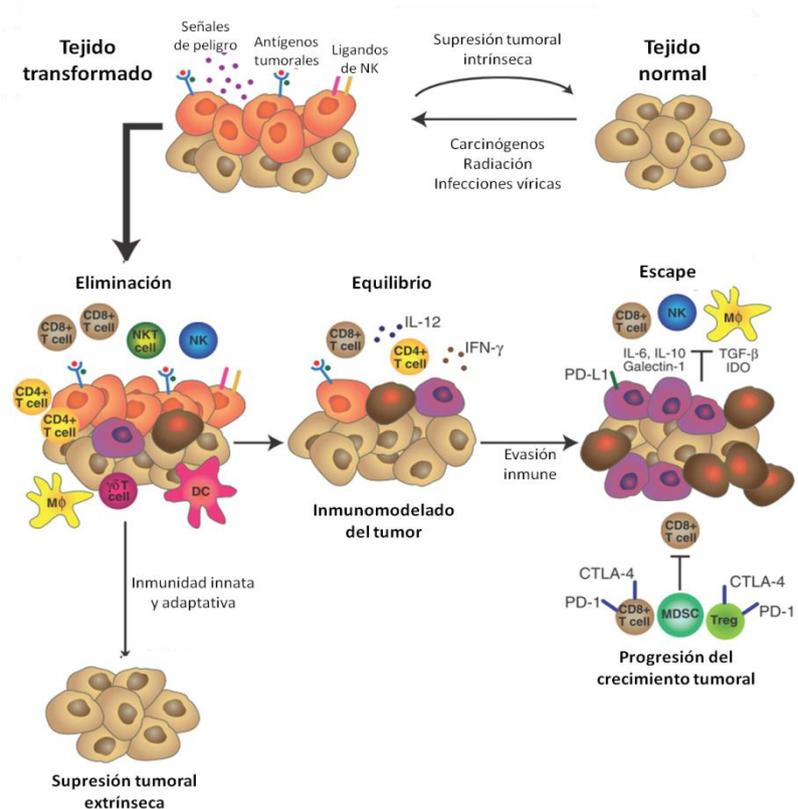
El conocimiento de la relación entre el sistema inmune y el cáncer ha ido cambiando a lo largo del tiempo. En un principio se consideraba que el sistema inmune no estaba relacionado con el desarrollo de tumores. No obstante, en 1893 se comenzó a replantear esta idea gracias a las observaciones del Dr. William Coley, que llegó a la conclusión de que la aparición de infecciones en pacientes con cáncer estaba relacionada con una remisión del tumor (McCarthy, 2006). Fue el primero en desarrollar una terapia antitumoral basada en la manipulación del sistema inmune y precursora de las estrategias de inmunoterapia actuales.

Más tarde, en 1909, Paul Erlich sugirió una posible implicación del sistema inmune en el desarrollo tumoral. Según indicaba, la baja frecuencia de aparición de tumores en organismos tan longevos como los seres humanos sugería la existencia de algún mecanismo de eliminación, por parte del sistema inmune, de las células transformadas que aparecían continuamente en el organismo (Kim, 2006).

A mediados de los años 50 del siglo XX, el descubrimiento de los antígenos específicos de tumor hizo resurgir la idea de un control inmune del crecimiento tumoral. Como consecuencia, Burnet y Thomas propusieron la teoría de la inmunovigilancia del cáncer, según la cual los linfocitos T actuaban como centinelas capaces de reconocer y eliminar células que han sufrido una transformación tumoral (Dunn *et al.*, 2004). Sin embargo, esta hipótesis se desechó debido a la aparición de resultados contradictorios en estudios relacionados con la misma.

Años más tarde, la idea de la inmunovigilancia se incluyó como parte de otro concepto más extenso y complejo denominado inmunomodelado del cáncer (Dunn *et al.*, 2002). Esta describe una relación más compleja entre inmunidad y cáncer; aunque el sistema inmune no sea capaz de eliminar el tumor, lo modela, eliminando las variantes más inmunogénicas. De esta forma permanecen aquellos linajes tumorales menos inmunogénicos y con capacidad de evasión de la respuesta inmune. Esta teoría define un proceso dinámico que está compuesto por tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Figura 1). El paso de una fase a otra se encuentra influenciado por factores externos como el deterioro del sistema inmune con la edad o situaciones de estrés (Schreiber *et al.*, 2011).

En la fase de eliminación hay una cooperación entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa para detectar y erradicar focos tumorales. Si se produce la eliminación completa del tumor, el proceso de inmunomodelado finaliza en este punto. En caso contrario, evoluciona hacia la siguiente fase: el equilibrio, donde se produce un modelado continuo de las células tumorales. Durante esta fase tiene lugar la selección de aquellas células del tumor con menor inmunogenicidad y, por tanto, con mayor capacidad de resistencia frente a los mecanismos efectores inmunes (Dunn *et al.*, 2002; Schreiber *et al.*, 2011). Al mismo tiempo, la actuación del sistema inmune adaptativo evita el crecimiento de la masa tumoral. La siguiente fase, conocida como escape, tiene lugar cuando el tumor ha adquirido la capacidad de evadir las respuestas efectoras inmunes. En este punto hay un crecimiento descontrolado de aquellas variantes tumorales capaces de eludir el reconocimiento y destrucción por parte del sistema inmune. Como resultado, se desarrollan lesiones detectables a nivel clínico (Kim, 2006).



**Figura 1. Fases del proceso de inmunomodelado del cáncer.** Este es un mecanismo de supresión tumoral que interviene tras haber tenido lugar la transformación celular y está constituido por tres fases consecutivas. En la fase de eliminación interviene la inmunidad innata y adaptativa para destruir el foco tumoral antes de que sea visible clínicamente. Si no se consigue eliminar el tumor, se pasa a la fase de equilibrio, donde tiene lugar un modelado de la inmunogenicidad del tumor que acaba dando lugar a variantes capaces de evadir al sistema inmune. Entonces se entra en la fase de escape, en la que las variantes tumorales menos inmunogénicas proliferan descontroladamente dando lugar a un tumor detectable a nivel clínico. [Imagen obtenida y modificada de Schreiber *et al.*, 2011]

## 1.2. Células inmunes implicadas en la respuesta inmune antitumoral

Los modelos experimentales y los datos clínicos indican que en la respuesta inmune contra el cáncer intervienen células inmunes con capacidad citotóxica, principalmente linfocitos T citotóxicos y células NK (Dunn *et al.*, 2004; Kim, 2006).

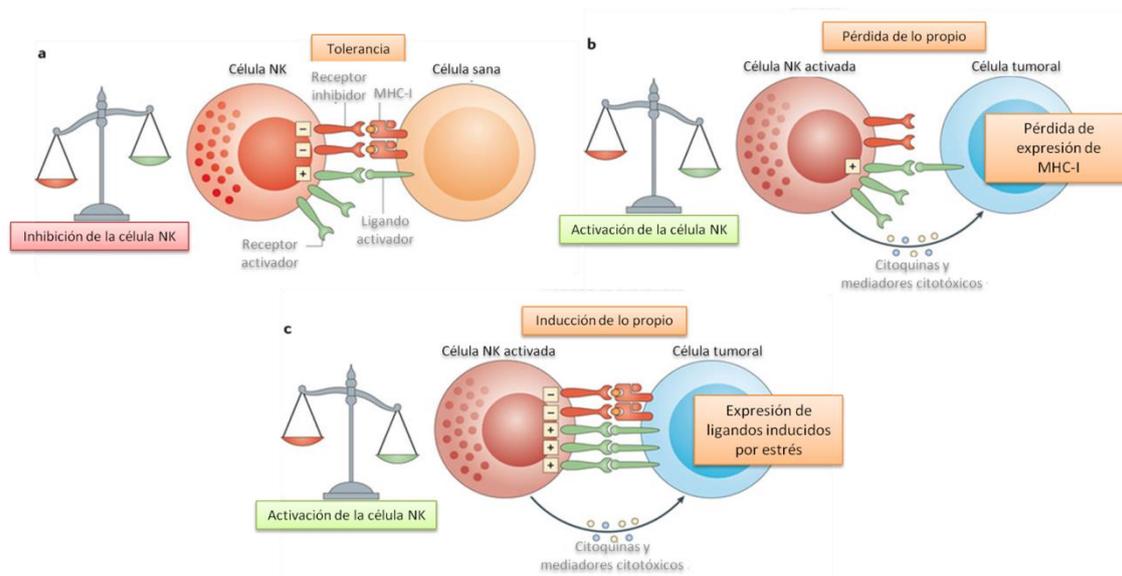
Los linfocitos T son capaces de reconocer antígenos específicos de la transformación tumoral, ya sea aquellos expresados directamente en las propias células neoplásicas (linfocitos T citotóxicos) o los presentados por células presentadoras de antígenos (linfocitos T *helper*) (Murphy, 2012). Específicamente, los T citotóxicos se encargan de eliminar las células neoplásicas de forma directa. Interaccionan con la célula diana y liberan unas proteínas, denominadas perforinas, que forman poros en la membrana plasmática, provocando un fenómeno de apoptosis (Regueiro, 2011).

Las células NK son células linfoides que se diferencian de linfocitos T y B porque carecen de los receptores de antígeno característicos, TCR y BCR. Asimismo, tampoco expresan el marcador CD3. A pesar de ello, cuentan con receptores activadores y receptores inhibidores de la activación. Además, de forma general presentan como marcadores moleculares específicos los antígenos CD56 y CD16 (Regueiro, 2011; Campbell & Hasegawa, 2013).

Estas células intervienen en la inmunidad innata y son capaces de llevar a cabo respuestas citolíticas contra células tumorales o infectadas por virus. Además, debido a su capacidad de sintetizar citocinas, cuentan con una función reguladora de procesos inflamatorios y de inmunidad adaptativa (Moretta *et al.*, 2014).

La activación de las células NK está mediada por la integración de un conjunto de señales procedentes de los receptores activadores e inhibidores que expresan en superficie (Moretta *et al.*, 2014). Basándose en esto, se han definido dos teorías que explican el mecanismo por el que se regula la función de estas células (Figura 2):

- Pérdida de lo propio (*missing self hypothesis*): describe la existencia de receptores inhibidores que se unen al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I). Dentro de estos se distinguen dos tipos, los receptores de muerte tipo inmunoglobulina (Ig) o KIR y los receptores heterodiméricos CD94/NKG2A. Los receptores KIR componen una familia de proteínas que cuenta con miembros activadores e inhibidores de las células NK (Purdy & Campbell., 2009; Ivarsson *et al.*, 2014). Un mecanismo de evasión de las células tumorales consiste en una subexpresión de los complejos MHC-I, lo que aumenta su susceptibilidad a la lisis por acción de las células NK (Figura 2B).
- Inducción de lo propio (*induced self hypothesis*): está basada en la expresión de receptores activadores en la superficie de las células NK que promueven sus funciones citotóxicas. Concretamente, estos receptores están representados por NKG2D, que se encuentra asociado a DAP10 en la membrana, y por DNAM-1 (Huergo-Zapico *et al.*, 2014; Moretta *et al.*, 2014). Los ligandos de estas moléculas son proteínas asociadas a estrés y están normalmente sobreexpresados en células infectadas por virus, sometidas a estrés o neoplásicas, promoviendo su eliminación por los mecanismos de citotoxicidad de las células NK (Figura 2C).



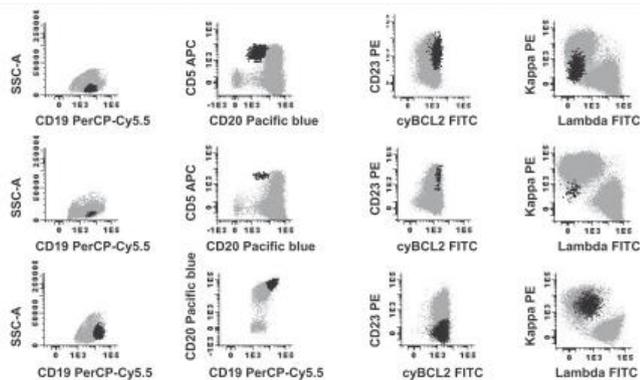
**Figura 2. Mecanismo de activación de las células NK.** A) Tolerancia, las células sanas del individuo no producen respuestas efectoras de las células NK debido a que las señales de activación son contrarrestadas por la unión de ligandos a receptores inhibidores. B) Pérdida de lo propio, las células NK se activan en respuesta a la ausencia de ligandos inhibidores en la superficie de las células tumorales. C) Inducción de lo propio, las células NK se activan por la sobreexpresión de ligandos activadores que contrarrestan las señales de inhibición. [Imagen obtenida y modificada de Vivier *et al.*, 2012]

La activación de las células NK puede producirse a través de muchas señales. Aún así, la función citotóxica de estas células está mediada, en todos los casos, por la liberación de unos gránulos que presentan en el citoplasma. Estos gránulos contienen dos clases de proteínas, perforinas y granzimas (Regueiro, 2011; Murphy, 2012). Cuando se produce el reconocimiento de la célula diana, los gránulos se fusionan con la membrana plasmática en la zona de contacto célula-célula provocando la secreción de las moléculas efectoras. Al mismo tiempo que ocurre este proceso de desgranulación, la proteína LAMP-1 (*Lysosome-Associated Membrane Protein 1*), también denominada CD107a, es transportada a la superficie de la célula NK. En consecuencia, esta proteína queda expuesta y accesible para la unión de anticuerpos, con lo que permite la identificación de aquellas células NK que han sufrido una activación por desgranulación (Aktas *et al.*, 2009). Esta proteína también es expresada, en las mismas condiciones, por otra población de linfocitos, denominada NKT, que cuenta con características intermedias entre linfocitos T y células NK.

## 2. Leucemia linfática crónica

La leucemia linfática crónica (LLC) se caracteriza por ser la leucemia más común en adultos. Concretamente constituye el 30% de todos los casos de leucemia y, en Europa, la incidencia de esta enfermedad está en torno a 3/100.000 habitantes al año (AECC). Característicamente, la LLC es una enfermedad que afecta a individuos mayores de 50 años y el riesgo a padecer dicha enfermedad se incrementa a partir de los 40 años. Además, es ligeramente más prevalente en hombres que en mujeres.

Desde el punto de vista fenotípico, esta leucemia se identifica por una expansión clonal de linfocitos B anormales que invaden el torrente sanguíneo así como la médula ósea y tejidos linfáticos. El diagnóstico de la LLC se realiza mediante el inmunofenotipado de las células del paciente por citometría de flujo y se basa en la identificación de esos clones de linfocitos B. Para ello, se utiliza la técnica de inmunofluorescencia directa con combinaciones múltiples de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a antígenos superficiales como CD19, CD20/CD4, CD5, CD23, CD45, Bcl-2, CD38 o ZAP-70 (Hallek *et al.*, 2008) (Figura 3). Algunas de ellas también proporcionan información acerca del pronóstico de la enfermedad.



**Figura 3.** Identificación inmunofenotípica de clones de linfocitos B en sangre periférica. [Imagen tomada de Nieto *et al.*, 2009]

Por otro lado, los linfocitos B anormales son resistentes a la apoptosis y más del 90% de los mismos se encuentran en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular, es decir, no se están dividiendo. Debido a estas características, se pensaba que la acumulación de linfocitos B era consecuencia de la ausencia de muerte celular en estas células. Sin embargo, estudios recientes muestran que no sólo existe una supervivencia prolongada de los linfocitos sino que, además, aparece una pequeña fracción de células en proliferación procedentes de la médula ósea o de nódulos linfáticos (Rodríguez-Vicente *et al.*, 2013). Se ha propuesto que esta proliferación es promovida por el microambiente, que induce un aumento de proteínas anti-apoptóticas y promueve la supervivencia de las células

tumorales (Ramsay & Rodríguez-Justo, 2013). Además, estos linfocitos neoplásicos son muy resistentes a la eliminación por parte del sistema inmune y, en particular, a la lisis por células NK.

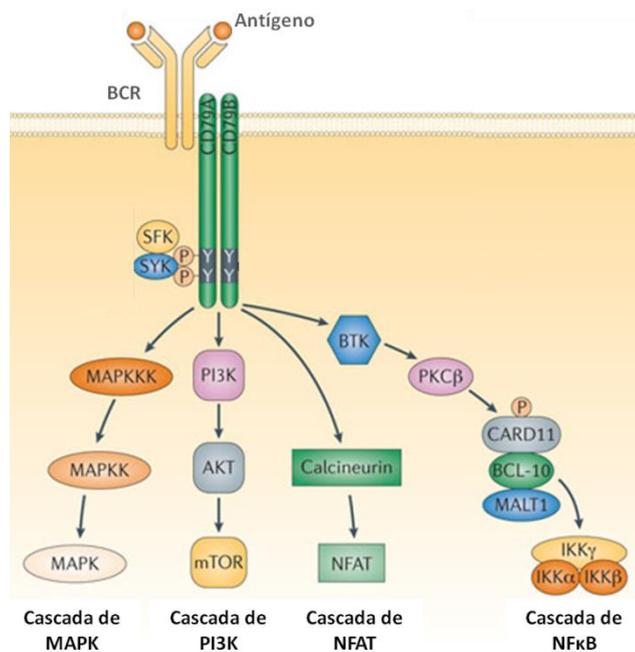
Aparte de los antígenos utilizados en el diagnóstico de la enfermedad, existe otro conjunto de marcadores que permiten predecir el curso clínico de la misma, el tratamiento y la respuesta a la terapia. En función de estos factores se establecen dos tipos de fenotipo de los pacientes con LLC: *i*) fenotipo de alto riesgo, que se corresponde con una variante más agresiva de la enfermedad y que se asocia a la ausencia de mutaciones en *IGVH* (genes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas), alta expresión de ZAP-70 y/o expresión en superficie de CD38; *ii*) fenotipo de bajo riesgo, que está relacionado con un desarrollo más pausado, donde aparecen mutaciones en *IGVH* y no hay expresión de ZAP-70 y/o CD38. Esta clasificación se ve influida también por otra serie de alteraciones citogenéticas como la trisomía del cromosoma 12 o deleciones en el 13. La expresión de todos estos marcadores puede variar en distintas etapas de la LLC, de ahí que se hagan estudios periódicos a los pacientes para controlar la evolución de la enfermedad (Burger & Chiorazzi, 2013; Rodríguez-Vicente *et al.*, 2013).

### **3. Señalización del receptor de antígenos de linfocitos B**

Una molécula importante en linfocitos B, tanto aberrantes como normales, es el receptor de antígenos o BCR, clave para la supervivencia de la célula. Adicionalmente esta molécula interviene en la diferenciación de las células B en las distintas etapas que constituyen el desarrollo de linfocitos B maduros. Este receptor es un complejo proteico formado por varios componentes. Destaca la presencia de una inmunoglobulina (Ig) de membrana, que varía de unos linfocitos a otros, siendo propias de los linfocitos B maduros las Igs de isotipos IgM e IgD (Treanor, 2012). Esta molécula es la encargada del reconocimiento antigénico pero, a pesar de que cuenta con un pequeño dominio intracelular, este no incluye motivos proteicos implicados en la transducción de señales (Regueiro, 2011). La otra parte del BCR consiste en un heterodímero formado por las proteínas transmembrana CD79 $\alpha$  y  $\beta$ , también denominadas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ . Estas son cadenas invariables que contienen motivos de activación con tirosinas (ITAMs), encargados de la señalización (Treanor, 2012). Adicionalmente, existen otras moléculas de membrana que, aunque no forman parte del BCR, colaboran con el mismo en la

activación de la célula. Entre ellas, el más importante es el correceptor del BCR, un complejo constituido por las moléculas CD21, CD81 y CD19. La activación de este correceptor potencia en gran medida la señal del BCR (Regueiro, 2011). También están relacionados con la activación celular los receptores tipo Toll (TLR), capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos. Estos receptores responden a productos bacterianos, como el TLR4 que reconoce moléculas de lipopolisacárido (LPS) (Browne, 2012).

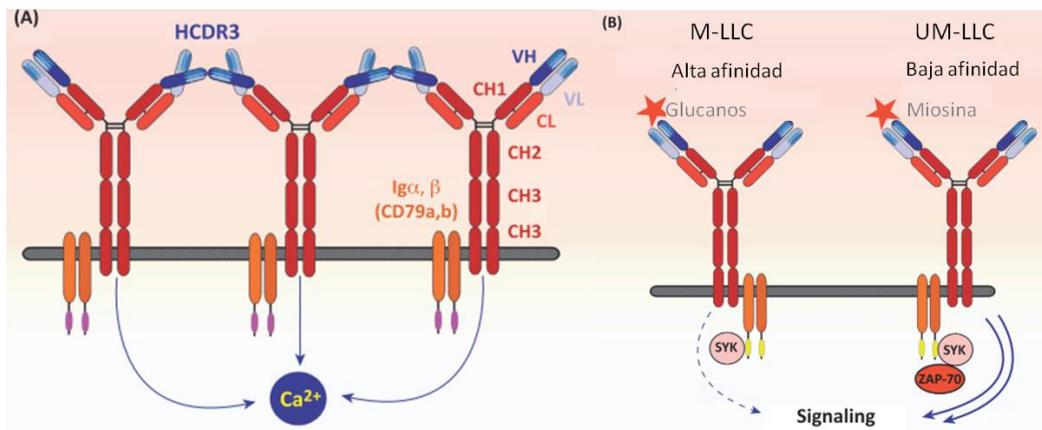
Cuando tiene lugar el reconocimiento de antígenos extracelulares por parte del BCR se activa una cascada de señalización que finaliza con activación o inhibición de la expresión génica (Figura 4). Concretamente, la interacción directa con el antígeno desencadena una señal que induce la fosforilación de los motivos ITAM del heterodímero CD79 $\alpha/\beta$ . En este proceso intervienen diversas tirosina cinasas donde la más importante es Lyn, que pertenece a la familia de las Src cinasas (SFK) y se expresa de forma predominante en linfocitos B (Packard & Cambier, 2013). Otra tirosina cinasa que cabe destacar es Syk, cuya activación tras su unión a los motivos ITAM fosforilados provoca la propagación de la señal del BCR a través de un grupo de proteínas que se asocian a la proteína adaptadora BLNK (*B-cell linker*). Dentro de las proteínas reclutadas se incluyen BTK, PI3K o la fosfolipasa C $\gamma$ 2, que continúan la cascada activando múltiples rutas de señalización y finalizando con la translocación al núcleo de factores de transcripción como NF $\kappa$ B o NFAT (Figura 4).



**Figura 4. Cascada de señalización del receptor de linfocitos B (BCR).** Este proceso se inicia por la unión del receptor a un antígeno determinado y finaliza con la actuación de factores de transcripción que promueven supervivencia, proliferación y resistencia a la apoptosis. [Imagen obtenida y modificada de Young & Staudt, 2013]

### 3.1. Implicación del BCR en el desarrollo de enfermedades hematológicas

Se considera que el BCR está involucrado en el desarrollo de la LLC, así como en el de otros trastornos hematológicos, y determina el comportamiento clínico de la enfermedad. De hecho, el estudio de los perfiles génicos de linfocitos B leucémicos ha revelado una sobreactivación de esta cascada de señalización (Herishanu *et al.*, 2011; Muzio *et al.*, 2011). A raíz de estos estudios, se han propuesto dos modelos distintos, pero no excluyentes, del origen de las alteraciones del BCR que dan lugar, específicamente, al desarrollo de la LLC. En ambos casos se describe la existencia de una estimulación crónica del receptor (Figura 5): *a*) activación independiente de antígeno, donde se produce una autoestimulación por interacción de regiones hipervariables de las cadenas pesadas (HCDR3) de distintas moléculas de BCR, es decir, el receptor reconoce epítomos propios, a los que se asocia; *b*) activación dependiente de antígeno, donde se produce una unión persistente a antígenos microbianos o del microambiente, amplificando la señal de activación (Burger & Chiorazzi, 2013).



**Figura 5. Mecanismos de activación del BCR en la leucemia linfática crónica.** A) Activación independiente de antígeno, donde el BCR reconoce epítomos internos, con lo que se asocian distintas moléculas del receptor entre sí. B) Activación dependiente de antígeno, el BCR se une a moléculas del microambiente dando lugar a una estimulación persistente del receptor. [Imagen obtenida y modificada de Burger & Chiorazzi, 2013]

Complementariamente, ciertos ensayos han descrito que la interrupción de la ruta del BCR da lugar a efectos antitumorales en enfermedades que afectan a los linfocitos B (Niemann & Wiestner, 2013). Por ejemplo, la inhibición de Syk o BTK es efectiva en LLC y en linfoma de manto. Dentro de los diversos fármacos ensayados, destacan los inhibidores de tirosina cinasas dasatinib y fostamatinib, ambos probados en el

tratamiento de pacientes con LLC demostrando un efecto terapéutico (Lu & Wang, 2012). En este trabajo se ha empleado el dasatinib, un inhibidor que actúa sobre las familias de Src y Abl tirosina cinasas. Este compuesto se desarrolló como tratamiento de segunda línea en pacientes con leucemia mieloide crónica en fase crónica o resistentes a imatinib, debido a su capacidad de actuar sobre la proteína de fusión BCR-ABL, causante de la enfermedad (Hochhaus & Kantarjian, 2013). La utilidad del dasatinib en un trastorno como la LLC radica en que es capaz de actuar sobre ciertas cinasas de la cascada de señalización del BCR, destacando Lyn y BTK. La inhibición de esta enzima permite la interrupción de la ruta del BCR al completo, puesto que es la encargada de la fosforilación de los motivos ITAM, como se ha mencionado anteriormente. Esto, a su vez, daría lugar a la supresión del estado sobreactivado de los linfocitos B neoplásicos, proceso que, como ya se ha dicho, se considera clave en la patogénesis y en la progresión de la LLC, entre otros trastornos asociados a estas células. Con este inhibidor se han llevado a cabo estudios en líneas celulares B neoplásicas (Veldurthy *et al.*, 2008; McCaig *et al.*, 2011; Bosco *et al.*, 2012) y se ha visto que, en la mayoría de los casos, provoca una disminución en la viabilidad celular vía bloqueo del ciclo celular o inducción de la apoptosis. Asimismo, Hassold *et al.* (2012) describieron en uno de sus trabajos que el tratamiento con dasatinib tenía un efecto protector en ciertas líneas B frente a la eliminación de las células por acción de células NK.

Lo expuesto anteriormente sugiere que el BCR es un factor clave en el desarrollo de tumores hematológicos donde se ven afectados los linfocitos B, especialmente de la LLC, aunque todavía no se ha conseguido elucidar el papel que juega en la supervivencia y evolución de la enfermedad. Aún así, todos estos datos llevan a pensar que existe una relación entre el estado de activación celular y la resistencia de las células a procesos como la apoptosis o la evasión inmune. Tomando esto como base, en el presente trabajo establecemos la hipótesis de que la sobreactivación de las células neoplásicas a través de la cascada del BCR conllevaría cambios en la supervivencia y proliferación celular y modificaría la capacidad de evasión de la respuesta inmune mediada por células NK. Asimismo, la inhibición de ese estado activado debería promover cambios opuestos en lo observado en células sobreactivadas.

## ***OBJETIVOS***

---

En base a lo expuesto anteriormente, el presente trabajo pretende ahondar en la influencia del BCR en procesos clave como la supervivencia celular de linfocitos B procedentes de diversos tumores hematológicos, como la leucemia linfática crónica. Para ello, se ha propuesto estudiar el efecto de la activación y de la inhibición de células B neoplásicas a nivel del BCR y de otras rutas de activación, con el objetivo de establecer en qué medida influyen distintas cascadas de señalización en una serie de características de las células tumorales.

Por consiguiente, se establecen los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de activadores e inhibidores de distintas rutas de activación de linfocitos B en la supervivencia de las células B neoplásicas.
2. Determinar si la respuesta citotóxica de las células NK frente a linfocitos B neoplásicos se ve influenciada por la activación/inhibición de ciertas vías de señalización de estos linfocitos.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---

### ***1. Materiales***

#### **1.1. Reactivos**

PBS 1X Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl). Dasatinib; Fostamatinib (Selleckchem, USA). Buffer de unión de anexina V 10X (0.1 M HEPES/NaOH, 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub> en agua MilliQ). Isonomicina; Monensina; PMA; LPS; DMSO; CFSE (Sigma Aldrich, USA).

#### **1.2. Anticuerpos**

El anticuerpo anti IgM humana (I0140), específico de la cadena  $\mu$ , se adquirió en Sigma Aldrich. Los anticuerpos conjugados con fluorocromos utilizados para fenotipar las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidos de Immunostep (Salamanca, España), siendo: anti CD19-APC (clon A3-B1), anti CD3-FITC (clon 33-2A3), anti CD56-APC (clon B-A19), anti CD4-PerCp (clon HP2/6) y anti CD8-CFBlue (clon 143-44) (fluorocromo basado en la 6,8-difluoro-7hidroxicoumarina). También se consiguió de Immunostep la proteína Anexina V conjugada con FITC. Adicionalmente, se emplearon otros anticuerpos para el marcaje de moléculas superficiales: anti CD69-CFBlue (clon MOPC-21) de BioLegend (UK), anti IgG murino-PE de AbD Serotec (USA), anti CD107a-PE (clon H4A3) de BD Biosciences (USA), anti HLA-II (antígeno leucocitario humano de clase II) (clon TU36) de BD Pharmingen. Por último, el anticuerpo anti HLA-I (antígeno leucocitario humano de clase I) se obtuvo del hibridoma murino W6/32 procedente de la *American Type Culture Collection* (ATCC, USA).

### ***2. Cultivos celulares***

En este trabajo se utilizaron dos líneas celulares de linfomas B obtenidas de ATCC: células Raji, procedentes de un linfoma de Burkitt positivo para el virus de Epstein-Barr (EBV), y células HT, derivadas de un linfoma difuso de célula grande. Ambas líneas se cultivaron en medio RPMI 1640 (Lonza, USA) suplementado al 10% con suero bovino fetal descomplementado mediante calor (Lonza), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Life Technologies, USA), 1 mM de piruvato sódico (Invitrogen) y 100  $\mu$ g/mL estreptomycin/100 U/mL penicilina (Sigma Aldrich, USA). Los cultivos se mantuvieron a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> y en un ambiente humidificado.

Adicionalmente, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de muestras de pacientes con LLC, facilitadas por la Dra. Ana González Rodríguez del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo), donde se hizo el diagnóstico de las mismas. Todos los donantes dieron su consentimiento informado mediante la firma del documento generado al efecto y aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Central de Asturias. Se utilizaron muestras de 10 pacientes de LLC según los criterios de diagnóstico establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Hallek *et al.*, 2008):

1. Presencia de más de  $5 \times 10^9/L$  linfocitos B en sangre periférica durante al menos tres meses.
2. Proliferación clonal de los linfocitos B demostrada mediante inmunofenotipado.
3. Los linfocitos leucémicos presentan aspecto maduro, citoplasma reducido, núcleo denso sin nucleolos evidentes y con cromatina cuarteada.
4. Cuando la linfocitosis B es inferior a  $5 \times 10^9/L$ , el diagnóstico de LLC se determina por la presencia de linfadenopatía u organomegalia, citopenias o sintomatología atribuible a la LLC.

Estas 10 muestras fueron inmunofenotipadas para determinar la distribución de las poblaciones celulares de los individuos utilizando anticuerpos fluoroconjugados contra los diferentes CDs (*clusters of differentiation*). También se recogieron otros datos como la expresión de ZAP-70, IgG, IgA, IgM o el estado mutacional de *IGVH*.

Asimismo, se emplearon un total de 10 *buffy-coats* de donantes sanos para la obtención de células NK efectoras, los cuales fueron proporcionados por el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Oviedo.

El proceso de extracción de PBMCs de las muestras tanto de pacientes como de donantes sanos se basó en la separación de los componentes celulares de la sangre mediante gradientes de densidad en Ficoll. Se siguió para tal fin el protocolo proporcionado por el fabricante, utilizando 10 mL del reactivo Histopaque®-1077 (Sigma Aldrich) por muestra. La separación en gradientes se hizo mediante centrifugación a 2200 r.p.m. durante 25 min. Una vez recogidas las PBMCs de la interfase formada entre el reactivo y el suero, se lavaron las células con PBS y se resuspendieron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 suplementado como se describió antes.

### **3. Ensayos de activación/inhibición**

En todos los tratamientos aplicados, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $10^6$  células/mL, en el caso de las líneas celulares, y de  $2 \times 10^6$  células/mL en ensayos realizados con las muestras de pacientes. En dichos tratamientos, las células se incubaron en presencia de los agentes químicos señalados en cada caso durante 48 h.

#### **3.1. Activación**

Para activar las células mediante distintas cascadas de señalización, las líneas celulares Raji y HT se trataron con 50 ng/mL de PMA, 20  $\mu$ g/mL de LPS o 10  $\mu$ g/mL de anti-IgM. Este último, se incubó en los pocillos durante 24 h a 4°C para promover su unión a la placa previo tratamiento de las células. Asimismo como control de cada ensayo se añadió a las células el mismo volumen de vehículo en el que se disolvió el compuesto: DMSO, RPMI 1640 y PBS respectivamente. Las PBMCs de pacientes con LLC únicamente se trataron con anti-IgM y su correspondiente vehículo.

#### **3.2. Inhibición**

Con el fin de estudiar el efecto del inhibidor de tirosina cinasas dasatinib se llevaron a cabo ensayos en los que tanto las líneas celulares como las PBMCs de pacientes fueron tratadas con una concentración del inhibidor de 50 nM.

### **4. Citometría de flujo**

Los ensayos realizados fueron analizados mediante un citómetro de flujo BD FACS Canto II a las longitudes de onda de excitación propias de cada fluorocromo o tinción utilizada. Los datos fueron adquiridos y analizados con el *software* BD FACSDiva tras 48 h de tratamiento. Los ensayos de proliferación se analizaron por citometría a los días 0, 2 y 7 de tratamiento.

#### **4.1. Marcaje de moléculas activadoras**

En primer lugar, se llevaron a cabo los marcajes de un conjunto de moléculas de superficie relacionadas con el estado de activación de los linfocitos B: CD69, HLA-I y HLA-II.

Para cada marcaje,  $5 \times 10^5$  células de cada condición estudiada se resuspendieron en una dilución del anticuerpo correspondiente y se incubaron según las recomendaciones del fabricante. Se utilizó una dilución 1:100 del anticuerpo anti-CD69-CFBlue. Para el marcaje de HLA, las células se incubaron primero en una dilución de anticuerpo anti-HLA-I (1:2000) o anti-HLA-II (1:10<sup>6</sup>) y, posteriormente, se marcaron con un anticuerpo secundario anti-IgG murino-PE (dilución 1:125).

Como control negativo del marcaje se hizo un isotipo, con la misma composición que el resto de muestras pero al que no se añadió anticuerpo.

Adicionalmente, los linfocitos B leucémicos se identificaron dentro del conjunto de PBMCs extraídas mediante un marcaje con anti-CD19-APC (dilución 1:10), puesto que esta población se caracteriza por ser CD19<sup>+</sup>.

#### **4.2. Ensayo de apoptosis**

Las células que sufren un proceso de apoptosis fueron identificadas mediante un marcaje con anexina V conjugada con FITC. Para ello,  $5 \times 10^5$  células de cada condición de estudio se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad en una dilución 1:20 de Annexin V-FITC en *buffer* de unión.

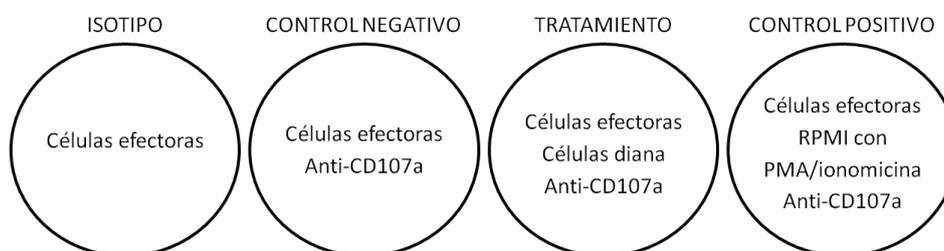
Los PBMCs de pacientes de LLC se marcaron previamente con anti-CD19 siguiendo el mismo protocolo que se ha especificado anteriormente.

#### **4.3. Ensayo de desgranulación de células NK**

La tasa de desgranulación de células NK fue evaluada mediante el marcaje con anticuerpos de la proteína CD107a o LAMP-1. En primer lugar, PBMCs de donantes sanos se co-incubaron con las células diana (Raji, HT o PBMCs de LLC) en una relación celular efectora:diana de 10:1 en placas de 96 pocillos. Además de la co-incubación, se dispusieron otra serie de pocillos como controles internos del ensayo (figura 6). En todos ellos se añadió monensina (2  $\mu$ M), que bloquea el transporte proteico del retículo endoplasmático al aparato de Golgi (Betts & Koup, 2004). Además, a excepción del isotipo, todas las condiciones se marcaron con un anticuerpo anti-CD107a-PE (dilución 1:20). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 3 h a 37°C.

Una vez pasado el tiempo de incubación, las células de las distintas condiciones se marcaron para localizar los subtipos celulares. Con este fin, se usó una mezcla de los

cuatro anticuerpos necesarios para el fenotipado celular en las siguientes diluciones: 1:20 para anti-CD3-FITC, 1:10 para anti-CD4-PerCp y anti-CD56-APC y 1:40 para anti-CD8-CFBlue. Las muestras se incubaron durante 25 min en oscuridad y a temperatura ambiente.



**Figura 6. Composición de los distintos pocillos necesarios para el ensayo de desgranulación.** A partir del isotipo se cuantificó la fluorescencia intrínseca de las células de la muestra. El control negativo permitió evaluar la desgranulación basal de las células citotóxicas. El control positivo consistió en una estimulación de las células con PMA (50 ng/mL) e ionomicina (250 ng/mL).

#### 4.4. Ensayo de proliferación

En este ensayo se empleó la línea celular Raji sometida a los distintos tratamientos de activación. Concretamente, se cogieron  $10^6$  células por cada condición y se marcaron con CFSE 1  $\mu$ M, durante 10 min a 37°C y en oscuridad, antes de someterlas al tratamiento correspondiente. Tras la incubación, se paró la reacción mediante la adición de 5 volúmenes de medio RPMI frío y las muestras se mantuvieron durante 5 min a 4°C. Tras eliminar el marcaje, las células se contaron y se dispusieron en pocillos a densidad  $10^6$  células/mL, añadiendo el tratamiento de activación/inhibición correspondiente.

#### 5. Análisis de datos

Los datos fueron adquiridos con el *software* BD FACSDiva, como se ha especificado anteriormente. Una vez obtenidos los valores de porcentajes o intensidad de fluorescencias según el ensayo, estos se normalizaron respecto al control negativo mediante el cálculo del número de veces de inducción o *fold induction* según la siguiente fórmula:

$$\text{Inducción} = \frac{\text{Valor obtenido en las células tratadas}}{\text{Valor obtenido en el control negativo}}$$

Por último, el análisis estadístico de la relación entre las variables se llevó a cabo mediante la prueba U de Mann Whitney para la comparación de 2 muestras independientes con el programa informático SPSS®.

## **RESULTADOS**

---

A continuación se procede a exponer los resultados más significativos obtenidos en este trabajo y relacionados con los objetivos propuestos en el mismo.

### **1. Activación de linfocitos B**

Dada la aparente implicación de la ruta de señalización del BCR en la patogénesis de enfermedades como la LLC, en esta primera parte del trabajo se ha pretendido comprobar la influencia de la activación de la célula B, tanto a través del BCR como por otras vías, en la supervivencia de las células neoplásicas y en su relación con el sistema inmune.

Las células de las líneas Raji y HT, positivas para IgM, se sometieron a tres tratamientos distintos, potencialmente activadores por su implicación en diferentes vías de señalización de linfocitos B: PMA (50 ng/mL), LPS (20 µg/mL) y anti-IgM (10 µg/mL) incubados durante 48 h. En el caso de los linfocitos B de pacientes con LLC, únicamente se llevó a cabo un tratamiento con anti-IgM. En todos los ensayos se evaluó la expresión de un conjunto de moléculas relacionadas con el estado de activación celular así como la tasa de apoptosis celular y se estudió la desgranulación de células NK sanas cuando estas se enfrentaban a los linfocitos activados. Los resultados de cada uno de ellos se visualizaron por citometría de flujo, como ya se ha mencionado, y se enumeran en los siguientes apartados.

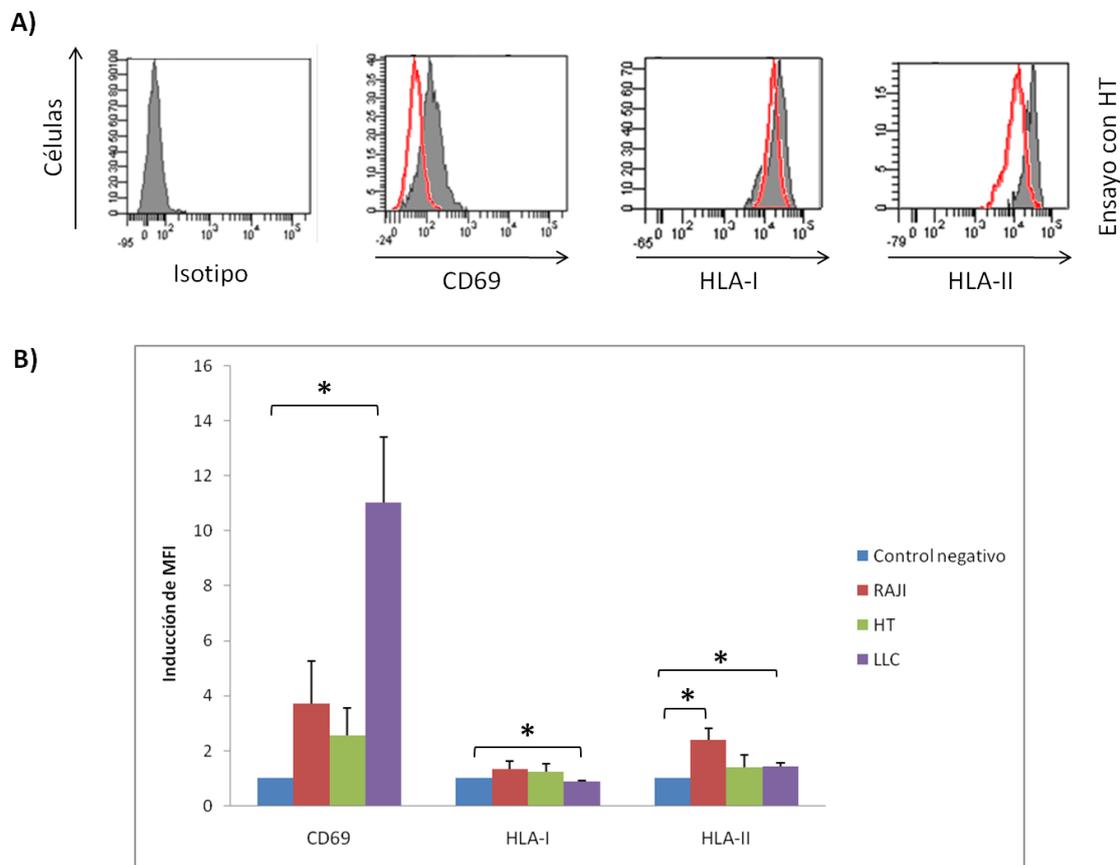
#### **1.1. Presencia en membrana de moléculas de activación**

Para determinar que realmente se había producido una activación de la célula tras cada tratamiento se estudió la expresión de tres moléculas superficiales a las 48 h de tratamiento. Se realizaron marcajes para la localización de CD69, HLA-I y HLA-II tanto en las líneas celulares como en los linfocitos B de pacientes con LLC. Estos últimos fueron definidos como CD19<sup>+</sup>. Las moléculas analizadas se han identificado como marcadores que aparecen en membrana en respuesta a la activación de linfocitos B (Sancho *et al.*, 2005; Mitchison, 2004; Kenny *et al.*, 2013).

De forma general, el tratamiento de las líneas Raji y HT tanto con LPS como con PMA produjo un aumento, no significativo, en el marcador de activación CD69. En contraposición, no se observó prácticamente ningún cambio en la presencia en membrana de las moléculas HLA-I y HLA-II (datos no mostrados).

Por su parte, las células activadas con anti-IgM experimentaron un aumento en la expresión de CD69 y HLA-II, como refleja la figura 7B, siendo significativos los siguientes resultados: CD69 y HLA-II en linfocitos B de LLC (valores medios de inducción 11,03 y 1,43; p-valor 0,014 y 0,04 respectivamente) y HLA-II en Raji (inducción media 2,39; p-valor 0,014). La expresión de HLA-I aumentó, de forma no significativa, en las líneas celulares y disminuyó en los linfocitos B de LLC significativamente (valor medio de inducción de 0,89; p-valor 0,037).

En conjunto, los distintos tratamientos indujeron un incremento en la presencia de CD69 en la membrana de las células mientras que el aumento en los niveles de HLA-II se produjo específicamente tras el tratamiento con anti-IgM.

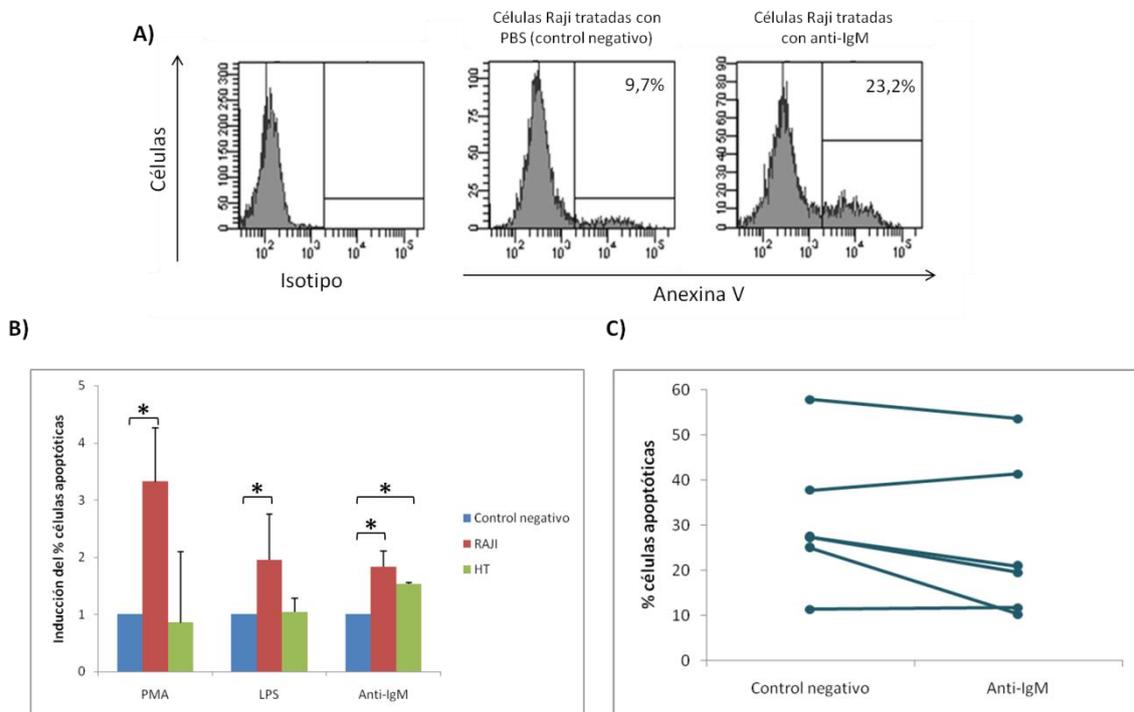


**Figura 7. Expresión de las moléculas de superficie CD69, HLA-I y HLA-II tras la activación con anti-IgM en Raji, HT y linfocitos B de LLC.** Se analizó la presencia de las tres moléculas en las diferentes células mencionadas mediante marcaje específico y análisis por citometría de flujo. A) Los histogramas muestran la intensidad media de fluorescencia (MFI, Median Fluorescence Intensity) en células HT. La línea roja representa el control negativo y la gris corresponde a las células tratadas con anti-IgM. B) Expresión de las moléculas estudiadas representada según el número de veces de inducción en células Raji, HT y linfocitos B de LLC tras el tratamiento con anti-IgM ( $n \geq 3$ ). Las diferencias, respecto al control negativo, fueron significativas en los tres casos para LLC y en el caso de HLA-II para Raji. \*( $p < 0,05$ , U de Mann Whitney).

## 1.2. Efecto directo de la activación sobre la supervivencia celular

Para determinar cómo afectan los diversos tratamientos estudiados a la supervivencia celular, se analizó el porcentaje de células apoptóticas a las 48 h de tratamiento mediante un marcaje con Annexin V-FITC (Pepper *et al.*, 1998).

El tratamiento con LPS y PMA indujo un incremento significativo en el porcentaje de apoptosis de la línea Raji, siendo el nivel medio de inducción obtenido en cada caso: 1,95 en células tratadas con LPS (p-valor 0,037) y 3,32 en células tratadas con PMA (p-valor 0,037). Sin embargo, el tratamiento con esos mismos compuestos no influyó en el porcentaje de células apoptóticas en la línea celular HT (figura 8B).



**Figura 8. Efecto del tratamiento sobre la apoptosis en Raji, HT y linfocitos B de LLC tras la activación.** Se analizó la unión en superficie de anexina V en las diferentes células mencionadas mediante citometría de flujo. A) Histogramas de un ensayo representativo en células Raji tratadas con anti-IgM. B) Apoptosis, expresada como inducción, en células Raji y HT con los tres tratamientos (n≥3). Las diferencias, comparando con el control negativo, fueron significativas en Raji para todos los casos y en HT tratadas con anti-IgM. \*(p<0,05, U de Mann Whitney) C) Representación lineal del cambio en la tasa de apoptosis de linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) de las distintas muestras de LLC (n=6).

Por otro lado, el tratamiento con anti-IgM provocó un aumento significativo de la apoptosis en las líneas celulares (inducción media de 1,52 en Raji con p-valor 0,019 y de 1,52 en HT con p-valor 0,034), como se observa en la figura 8B. Los datos obtenidos tras el tratamiento de linfocitos B de LLC con anti-IgM fueron dispares, observándose

tanto aumentos como disminuciones en el porcentaje de células apoptóticas en función del paciente (figura 8C). En consecuencia, los datos medios no son significativos.

En resumen, la activación celular da lugar a un aumento en la apoptosis en las líneas celulares, mientras que no tiene un efecto homogéneo en LLC.

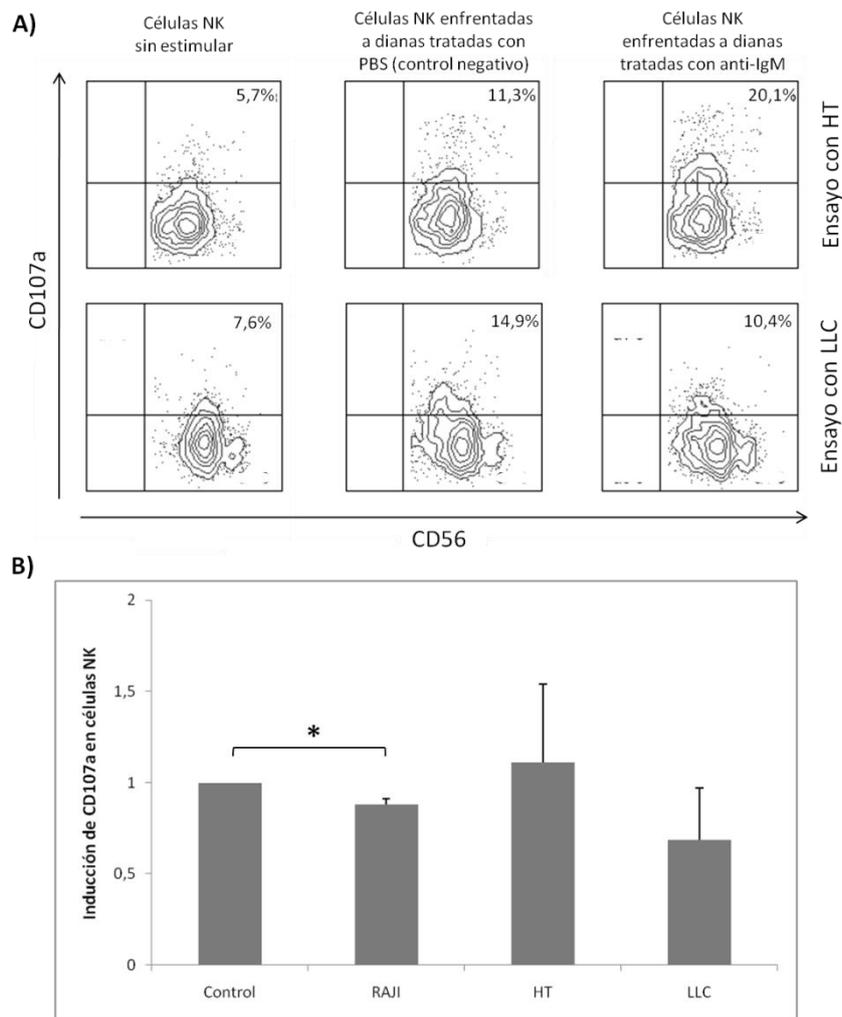
Adicionalmente, se estudió si los distintos compuestos activadores tenían algún efecto sobre la proliferación en la línea celular Raji. Las células se marcaron con CFSE antes de someterlas al tratamiento y se evaluó la respuesta a días 0, 2 y 7 de tratamiento (Asquith *et al.*, 2006). No se observó proliferación activa de las células en ningún caso (datos no mostrados).

### **1.3. Activación de células NK en respuesta a linfocitos B activados**

La proteína CD107a o LAMP-1 es un marcador del proceso de desgranulación que sufren las células NK y otras células citotóxicas (Aktas *et al.*, 2009). En este trabajo se ha pretendido medir la presencia de CD107a en la membrana de células NK sanas ( $CD3^- CD56^+$ ), así como de las poblaciones de células citotóxicas NKT ( $CD3^+ CD56^+$ ) y  $CD8^+$  ( $CD3^+ CD8^+$ ), en respuesta a la co-incubación con las células linfoides sometidas a los distintos tratamientos de activación. Para ello, se utilizaron PBMCs procedentes de donantes sanos, que se han co-incubado con las células tratadas en un ratio efectora:diana de 10:1.

La activación de las células linfoides mediante los diversos tratamientos promovía una disminución en la desgranulación de las células NK sanas, a excepción de la línea celular HT (figura 9B). En estas últimas, el tratamiento con anti-IgM dio lugar a un ligero aumento en el porcentaje de desgranulación de las células NK (valor medio de inducción de 1,11 en HT frente a los valores de 0,88 y 0,68 en Raji y linfocitos de LLC respectivamente). Únicamente fueron significativos los datos obtenidos en Raji con anti-IgM (p-valor 0,014). Las otras dos poblaciones de células citotóxicas no sufren prácticamente variaciones y, en su mayoría, los porcentajes de desgranulación no superan el 1% (datos no mostrados).

En resumen, no se observaron grandes cambios en la desgranulación de las células NK en respuesta a las células tratadas, con excepción de la línea Raji, donde el tratamiento con anti-IgM dio lugar a una bajada significativa en la desgranulación.



**Figura 9. Desgranulación de células NK de donantes sanos tras la co-incubación con células Raji, HT y linfocitos B de LLC activadas con anti-IgM.** Se analizó la presencia de CD107a en la membrana de células NK sanas mediante marcaje específico y análisis por citometría de flujo. A) Los gráficos de densidad muestran la presencia de CD107a en la membrana de células NK ( $CD3^- CD56^+$ ) de dos ensayos representativos. B) Desgranulación de células NK, representada como inducción, enfrentadas a células Raji, HT y linfocitos B de LLC tratadas con anti-IgM ( $n \geq 3$ ). Únicamente fue significativa la diferencia medida en células NK enfrentadas a Raji activadas con anti-IgM.  $*(p < 0,05, U$  de Mann Whitney)

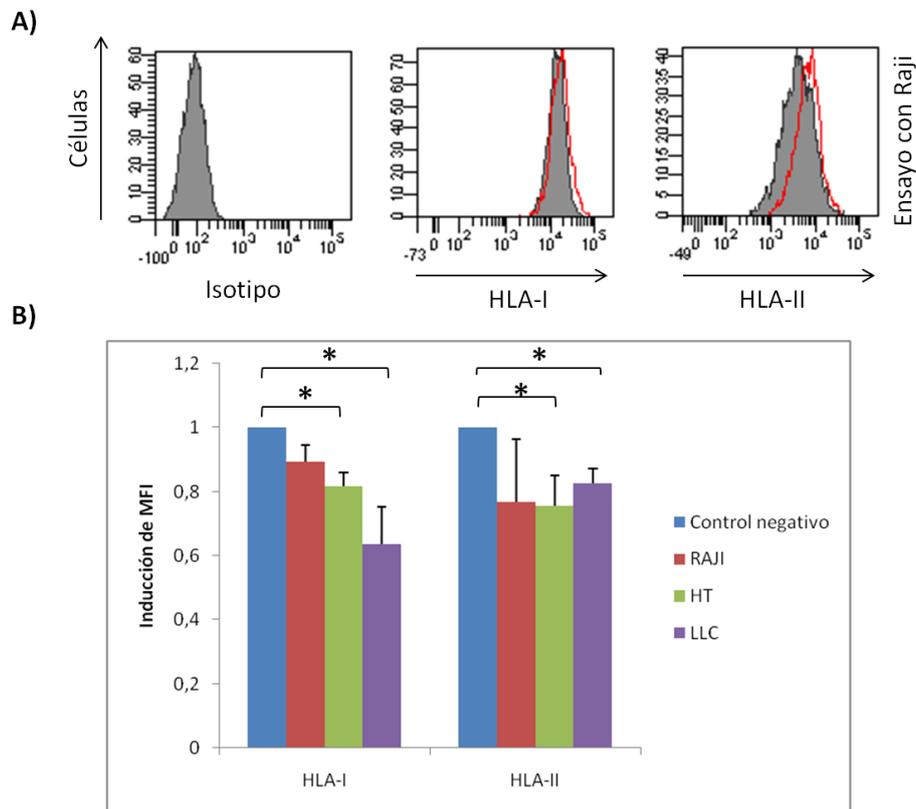
## 2. Inhibición de linfocitos B

Para complementar el estudio de la influencia del BCR en los linfocitos B neoplásicos, se utilizó un inhibidor de tirosina cinasas, denominado dasatinib, con el fin de interrumpir la cascada del BCR, que se ha visto sobreactivada en linfocitos tumorales (Herishanu *et al.*, 2011; Muzio *et al.*, 2011). Las líneas celulares de linfoma Raji y HT así como los linfocitos B de pacientes de LLC, tras el tratamiento con dasatinib (50 nM, 48 h), se sometieron a los mismos tipos de análisis que en el caso de los estudios de activación: expresión de moléculas de activación, apoptosis y desgranulación de células NK.

## 2.1. Presencia en membrana de moléculas de activación

Se comprobó si la inhibición de las células provocaba cambios a nivel de la expresión de dos de las moléculas asociadas a activación celular: HLA-I y HLA-II. CD69 no se incluyó en este caso puesto que esta proteína es un marcador que únicamente se expresa por activación celular (Sancho *et al.*, 2005).

El análisis de los ensayos reveló una disminución generalizada en la expresión tanto de HLA-I como de HLA-II al tratar con el inhibidor las líneas celulares y los linfocitos B de LLC (figura 10B). Se observó una menor expresión en HLA-II, con valores medios del número de veces de inducción: 0,77 para Raji, 0,76 en HT y 0,83 en linfocitos B de LLC. Fueron significativos los datos de HLA-I en HT y de HLA-II en HT y LLC, siendo el p-valor en todos los casos de 0,037.

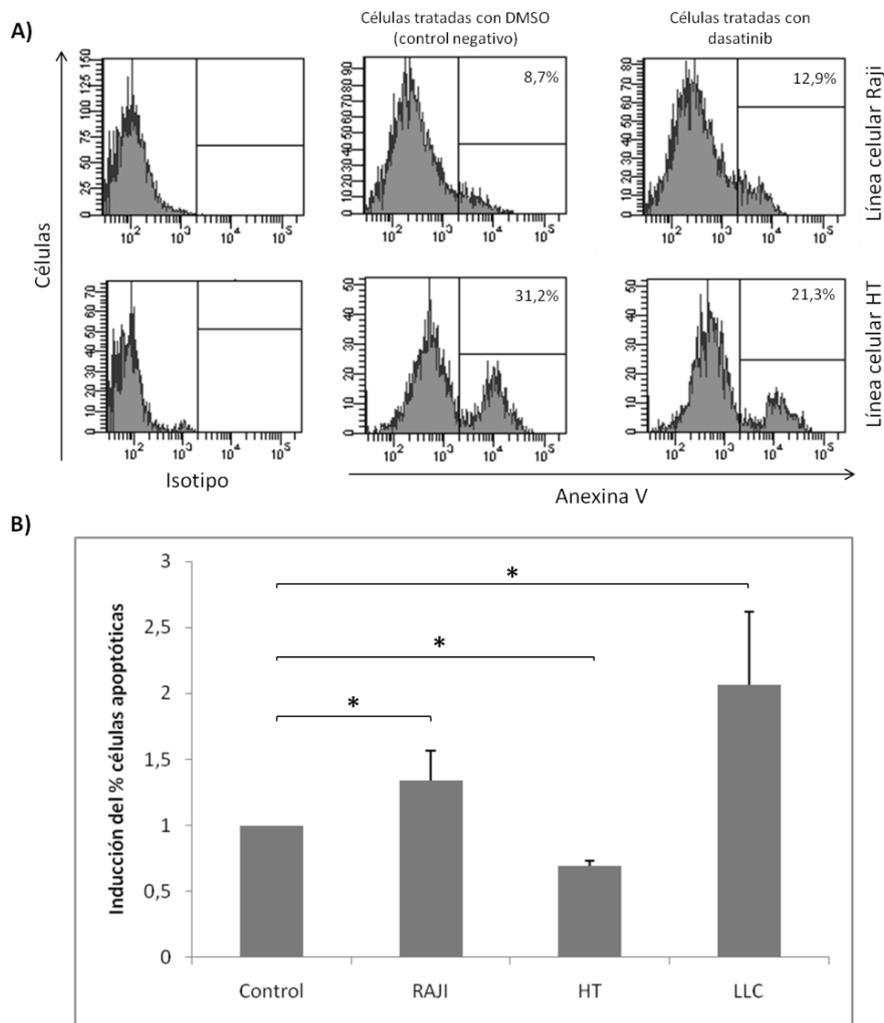


**Figura 10. Expresión de las moléculas de superficie HLA-I y HLA-II en células Raji, HT y linfocitos B de LLC tras el tratamiento con dasatinib.** Se analizó la presencia de ambas moléculas en las diferentes células mencionadas mediante marcaje específico y análisis por citometría de flujo. A) Los histogramas representan la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las moléculas mencionadas en células Raji. La línea roja representa el control negativo y la gris corresponde a las células tratadas con dasatinib. B) Expresión de las moléculas estudiadas representada según el número de veces de inducción en células Raji, HT y linfocitos B de leucemia tras el tratamiento con dasatinib (n=3). Los datos obtenidos para HLA-I en HT y para HLA-II en HT y LLC fueron significativos. \*(p<0,05, U de Mann Whitney).

## 2.2. Efecto directo de la inhibición con dasatinib sobre la supervivencia celular

Se estudió la supervivencia celular tras el tratamiento con dasatinib mediante la identificación del porcentaje de la población celular que sufría apoptosis a través de un marcaje con anexina V.

La inhibición del estado activado en la línea Raji así como en los linfocitos B de LLC supuso un aumento significativo de la apoptosis con valores medios de inducción de 1,34 (p-valor 0,037) y 2,06 (p-valor 0,037) respectivamente. Por el contrario, en HT se identificó una disminución, también significativa, en el porcentaje de apoptosis, contando con un valor medio de inducción de 0,69 (p-valor 0,037) (figura 11B).



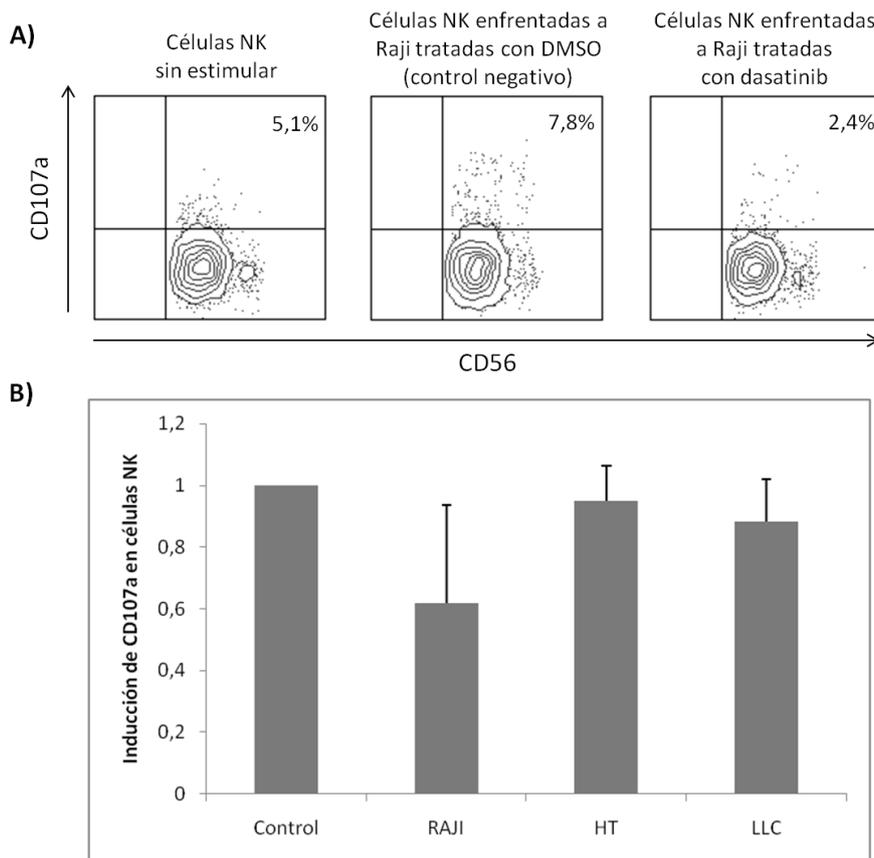
**Figura 11. Efecto del tratamiento con dasatinib sobre la apoptosis en Raji, HT y linfocitos B.** Se analizó la unión en superficie de anexina V en las diferentes células mencionadas mediante citometría de flujo. A) Histogramas de dos ensayos representativos en células Raji y en células HT. B) Apoptosis, expresada como inducción, en células Raji y HT y en linfocitos B de LLC (n=3), siendo todos significativos. \*(p<0,05, U de Mann Whitney)

### 2.3. Activación de células NK en respuesta a linfocitos B inhibidos

Se determinó la estimulación de células NK de donantes sanos mediante la determinación de la presencia de CD107a en la membrana de las mismas.

En todos los ensayos de co-incubación, tanto de líneas celulares como de linfocitos B de LLC, se ha determinado una disminución en la presencia de CD107a en membrana, con valores de inducción de 0,94 para Raji, 0,61 para HT y 0,88 para linfocitos de LLC, si bien los datos no son significativos a nivel estadístico (figura 12B). Por otro lado, las poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células NKT sufrieron ligeras variaciones en su porcentaje de desgranulación pero estas modificaciones no son significativas (datos no mostrados).

En conclusión, no se han identificado cambios significativos en la estimulación de células NK en respuesta a células inhibidas con dasatinib.



**Figura 12. Desgranulación de células NK sanas tras la co-incubación con células Raji, HT y linfocitos B de LLC tratadas con dasatinib.** Se analizó la presencia de CD107a en la membrana de células NK sanas mediante marcaje específico y análisis por citometría de flujo. A) Los gráficos de densidad muestran la presencia de CD107a en la membrana de células NK (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) de un ensayo representativo. B) Desgranulación de células NK, representada como inducción, enfrentadas a células Raji, HT y linfocitos B de LLC tratadas con dasatinib (n=3). Estos datos no fueron significativos.

## *DISCUSIÓN*

---

La señalización del BCR es clave en la supervivencia de los linfocitos B tanto normales como tumorales. A este respecto, ciertos estudios han descrito que las células B neoplásicas se caracterizan por una sobreactivación de la cascada del BCR, lo que ha llevado a relacionar este receptor con el origen de trastornos hematológicos como la LLC u otras leucemias/linfomas de células B. Tal es la importancia de la cascada del BCR que se han desarrollado estrategias terapéuticas basadas en su bloqueo como, por ejemplo, el inhibidor de tirosina cinasas dasatinib, que disminuye la viabilidad celular vía apoptosis en LLC. Por otro lado, los linfocitos B neoplásicos son capaces de evadir la eliminación por el sistema inmune, característica que también podría tener su origen en la activación del BCR, de manera que la muerte celular causada por agentes como el dasatinib estaría mediada por la actuación del sistema inmune. Tomando esto como base, el objetivo de este trabajo ha sido, de forma general, determinar si el estado de activación del BCR influye en la supervivencia de las células neoplásicas o en su resistencia a la destrucción por el sistema inmune.

Para la activación por la vía del BCR se utilizó un anticuerpo anti-IgM debido a que la gran mayoría de linfocitos B, tanto de la LLC como de líneas celulares de linfoma, presentan IgM como parte del BCR (Franke *et al.*, 2011). Adicionalmente, las células se trataron con otros dos compuestos estimuladores: PMA, que activa, a nivel intracelular, proteínas de la familia de la proteína cinasa C (PKC), y LPS, que se une al receptor de membrana TLR4, desencadenando una cascada de señalización intracelular. La inhibición del BCR se llevó a cabo por tratamiento con dasatinib, un inhibidor de tirosina cinasas que actúa sobre enzimas pertenecientes a la familia de las Src cinasas (Veldurthy *et al.*, 2008), como Lyn y BTK, miembros de la cascada de activación del BCR. Adicionalmente, dentro de este proyecto futuros ensayos incluirán la utilización de fostamatinib, un inhibidor de tirosina cinasas específico de la proteína Syk, que también interrumpe la cascada del BCR.

En primer lugar, se demostró que los tratamientos con PMA, LPS y anti-IgM inducen un estado activado en la célula, como evidencian los aumentos que se midieron en la expresión de las moléculas superficiales estudiadas. CD69 es una glicoproteína transmembrana relacionada con la transducción de señales en linfocitos y se ha visto en este trabajo que constituye el mejor marcador de activación celular general puesto que

hay un incremento en su expresión independientemente del tratamiento considerado. Por su parte, la molécula HLA-II es un marcador específico de la activación del BCR, ya que únicamente aumenta cuando se tratan las células con anti-IgM. Esto es respaldado por estudios previos que describen una relación directa entre la unión de un antígeno al BCR y la expresión de HLA-II en superficie (Mitchison, 2004; Kenny *et al.*, 2013). Asimismo, se demostró que el tratamiento con dasatinib promueve la interrupción de la cascada de señalización del BCR, como indica la disminución de la presencia en membrana de HLA-II tras la incubación con el compuesto.

Los estudios de apoptosis revelaron, por una parte, un aumento en el porcentaje de apoptosis, en las líneas celulares, asociado a la activación celular. En el caso de la activación con anti-IgM, gran cantidad de estudios han identificado un aumento de la muerte celular en linfomas tras la incubación con este anticuerpo y mediada por un mecanismo independiente de Fas (Carey & Scott, 2001; Takada *et al.*, 2001; Kondo *et al.*, 2003), fenómeno que podría estar ocurriendo en los modelos utilizados. No obstante, cabe decir que Kaptein *et al.* (1996) describieron una ausencia de cambios en la apoptosis en Raji cuando estas eran sometidas a activación por anti-IgM, lo que contradice los resultados obtenidos en este trabajo. Esta variación puede deberse a las condiciones experimentales dispuestas en ambos casos. En cuanto a los linfocitos B de la LLC, se registró una respuesta heterogénea en función del paciente, datos que concuerdan con investigaciones previas donde se establece una diferencia clara en la respuesta a anti-IgM correlacionada con marcadores propios de la enfermedad como la expresión de CD38, ZAP-70 o el estado mutacional de *IGVH* (Lanham *et al.*, 2003; Guarini *et al.*, 2008; Pede *et al.*, 2013). En consecuencia, no es posible elucidar un efecto claro del tratamiento con anti-IgM en la apoptosis de células B de LLC.

Por su parte, el tratamiento con dasatinib indujo un aumento en el porcentaje de apoptosis en Raji y en linfocitos B de LLC. Estudios previos han descrito este mismo efecto en células de LLC, donde el tratamiento con dasatinib disminuye la viabilidad celular mediada por el BCR (McCaig *et al.*, 2011), si bien esta respuesta se puede ver influenciada por marcadores de la enfermedad (Veldurthy *et al.*, 2008). En la línea celular HT se observó una disminución de la apoptosis, que podría ser consecuencia de la actuación inespecífica del inhibidor sobre alguna tirosina cinasa de la familia de las Src relacionada con la regulación de la apoptosis. Este efecto diferencial respecto a la línea Raji podría deberse a que un alto porcentaje de linfomas difusos de célula grande

expresan activamente cinasas de la familia de las Src en comparación con otros linfomas (Hollman *et al.*, 2010).

Los resultados de los ensayos de estimulación de células NK reflejaron, de forma general, una disminución de la desgranulación en respuesta a la co-incubación tanto con células activadas como con células tratadas con dasatinib. Sin embargo, los intervalos de disminución identificados respecto a la condición control no indican que se produzca un fenómeno de supresión de las células NK tal que resultara en una evasión eficaz de la destrucción inmune por parte de las células B neoplásicas. En relación a esto, Hassold *et al.* (2012) describieron en uno de sus trabajos que el tratamiento de líneas celulares de leucemias B con dasatinib podía tener un efecto protector frente a la eliminación de las células por acción de células NK. Por ello, se debería completar el estudio, tanto de la activación como de la inhibición, realizando ensayos de citotoxicidad de células NK, donde se mide la capacidad de las células NK de lisar las células diana. Estos estudios permitirían establecer si realmente la activación/inhibición de los linfocitos B está ligada a cambios en la capacidad de lisis de las células neoplásicas por el sistema inmune, ya que existen otras vías de eliminación independientes de desgranulación de células NK, que no se evalúan en este trabajo. Adicionalmente, sería interesante complementar el estudio con la evaluación de la muerte celular mediada por la interacción Fas-Fas ligando. Este proceso podría estar relacionado con la supervivencia de las células tumorales a la destrucción por el sistema inmune, puesto que ciertos estudios han descrito que la activación del BCR protege a los linfocitos B frente a la apoptosis dependiente de Fas (Rothstein *et al.*, 1995; Hinshaw *et al.*, 2003)

Teniendo en consideración todos los resultados obtenidos en este trabajo no podemos afirmar que exista una relación directa entre el BCR y la supervivencia de las células B tumorales ya que esta cascada de señalización parece tener distinta relevancia en función de la enfermedad estudiada e, incluso, en función de las alteraciones citogenéticas con las que cuentan las células. Aun así, futuros experimentos en esta misma línea de investigación podrían esclarecer el papel del receptor en la progresión tumoral. Dentro de estos se incluiría la realización de ensayos de citotoxicidad de células NK, el estudio del proceso de muerte celular dependiente de Fas o, incluso, el tratamiento de los linfocitos B con inhibidores más específicos, como el fostamatinib.

## ***CONCLUSIONES***

---

De los resultados obtenidos en este trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

1. El tratamiento con PMA, LPS y anti-IgM induce la expresión de moléculas asociadas a activación en células de LLC y de las líneas Raji y HT. Asimismo, el dasatinib promueve una disminución en la expresión de estas moléculas en las mismas células.
2. La activación con PMA, LPS y anti-IgM y la inhibición con dasatinib de la línea celular Raji disminuye la supervivencia celular vía aumento en la apoptosis de estas células.
3. El tratamiento de la línea HT con anti-IgM promueve un aumento en la apoptosis mientras que la inhibición con dasatinib tiene el efecto contrario, una disminución de este fenómeno.
4. La activación con anti-IgM de linfocitos B procedentes de LLC tiene un efecto variable sobre la apoptosis. La inhibición con dasatinib aumenta la apoptosis en estas células.
5. La activación con PMA, LPS y anti-IgM así como la inhibición con dasatinib de células de LLC y de las líneas Raji y HT no produce cambios significativos en el reconocimiento y activación de células NK sanas.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

---

- AECC.es [homepage on the Internet]. Madrid: Asociación Española Contra el Cáncer; [updated 2014 April 9; cited 2014 April 22]. Available from: <http://www.aecc.es/>
- Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, et al. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol.* 2009;254:149-154.
- Asquith B, Debaq C, Florins A, et al. Quantifying lymphocyte kinetics in vivo using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE). *Proc R Soc B.* 2006;273:1165-1171.
- Betts MR, Koup RA. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol.* 2004;75:497-512.
- Bosco R, Rabusin M, Voltan R, et al. Anti-leukemic activity of dasatinib in both p53<sup>wild-type</sup> and p53<sup>mutated</sup> B malignant cells. *Invest New Drugs.* 2012;30(1):417-422.
- Browne EP. Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology.* 2012;136(4):370-379.
- Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol.* 2013;34(12):592-601.
- Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(3):536-544.
- Carey GB, Scott DW. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in anti-IgM and anti-IgD-induced apoptosis in B cell lymphomas. *J Immunol.* 2001;166(3):1618-1626.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11):991-998.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21:137-148.
- Franke A, Niederfellner GJ, Klein G, Burtscher H. Antibodies against CD20 or B-cell receptor induce similar transcription patterns in human lymphoma cell lines. *Plos One.* 2011;6(2):e16596.

- Guarini A, Chiaretti S, Tavoraro S, et al. BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgVH unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood*. 2008;112:782-792.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop of Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute – Working group 1996 Guidelines. *Blood*. 2008;111:5446-5456.
- Hassold N, Seystahl K, Kempf K, et al. Enhancement of natural killer cell effector functions against selected lymphoma and leukemia cell lines by dasatinib. *Int J Cancer*. 2012;131(6):916-927.
- Herishanu Y, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NKkappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563-574.
- Hinshaw JA, Mueller CM, Scott DW, Williams MS. B cell receptor signaling mediates immediate protection from Fas-induced apoptosis upstream of caspase activation through an atypical protein kinase C isozyme and de novo protein synthesis. *Eur J Immunol*. 2003;33(9):2490-2500.
- Hochhaus A, Kantarjian H. The development of dasatinib as a treatment for chronic myeloid leukemia (CML): from initial studies to application in newly diagnosed patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139:1971-1984.
- Hollman CA, Tzankov A, Martínez-Marignac VL, et al. Therapeutic implications of Src independent calcium mobilization in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res*. 2010;34(5):585-593.
- Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, López-Soto A, et al. Molecular bases for the regulation of NKG2D ligands in cancer. *Front Immunol*. 2014;21:106.
- Ivarsson MA, Michaëlsson J, Fauriat C. Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Front Immunol*. 2014;5:184.
- Kapteijn JS, Lin CE, Wang L, et al. Anti-IgM-mediated regulation of c-myc and its possible relationship to apoptosis. *J Biol Chem*. 1996;271:18875-18884.

- Kenny EF, Quinn SR, Doyle SL, et al. Bruton's tyrosine kinase mediates the synergistic signaling between TLR9 and the B cell receptor by regulating calcium and calmodulin. *Plos One*. 2013;8(8):e74103.
- Kim, R. Cancer immunoediting: from immune surveillance to immune escape. In G.C. Prendergast & E. M. Jaffee (Eds.), *Cancer immunotherapy: immune suppression and tumor growth* (pp. 9-27). 2007. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
- Kondo E, Harashima A, Takabatake T, et al. NF-ATc2 induces apoptosis in Burkitt's lymphoma cells through signaling via the B cell antigen receptor. *Eur J Immunol*. 2003;33(1):1-11.
- Lanham S, Hamblin T, Oscier D, 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):1087-1093.
- Lu K, Wang X. Therapeutic advancement of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol*. 2012;5:e55.
- McCaig AM, Cosimo E, Leach MT, Michie AM. Dasatinib inhibits B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia but novel combination approaches are required to overcome additional pro-survival microenvironmental signals. *Br J Haematol*. 2011;153(2):199-211.
- McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J*. 2006;26:154-158.
- Mitchison MA. T-cell-B-cell cooperation. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(4):308-312.
- Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases – elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:16-25.
- Moretta L, Pietra G, Montaldo E, et al. Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors. *Front Immunol*. 2014;5:e87.
- Murphy K. Janeway's immunobiology. 2012. New York, USA: Taylor & Francis.

- Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, et al. Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*. 2008;112:188-195.
- Niemann CU, Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(6):410-421.
- Nieto WG, Almeida J, Romero A, et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood*. 2009;114:33-37.
- Packard TA, Cambier JC. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification and regulation. *F1000Primer Rep*. 2013;5:e40.
- Pede V, Rombout A, Vermeire J, et al. CLL cells respond to B-cell receptor stimulation with a microRNA/mRNA signature associated with MYC activation and cell cycle progression. *Plos One*. 2013;8(4):e60275.
- Pepper C, Thomas A, Tucker H, et al. Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis. *Leuk Res*. 1998;22(5):439-444.
- Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biol Ther*. 2009;8(23):13-22.
- Ramsay AD, Rodríguez-Justo M. Chronic lymphocytic leukaemia – the role of the microenvironment pathogenesis and therapy. *Brit J Immunol*. 2013;162:15-24.
- Regueiro JR. Inmunología: biología y patología del sistema inmunitario. 2010. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Rodríguez-Vicente AE, González M, Hernández-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease. *Cancer Genet*. 2013;206(3):49-62.
- Rothstein TL, Wang JK, Panka DJ, et al. Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature*. 1995;374(6518):163-165.

- Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005;26(3):136-140.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011;331(6024):1565-1570.
- Takada E, Toyota H, Suzuki J, Mizuguchi J. Prevention of anti-IgM-induced apoptosis accompanying G1 arrest in B lymphoma cells overexpressing dominant-negative mutant form of c-Jun N-terminal kinase 1. *J Immunol.* 2001;166(3):1641-1649.
- Treanor B. B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology.* 2012;136:21-27.
- Veldurthy A, Patz M, Hagist S, et al. The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro with preference for a subgroup of patients with unmutated IgVH genes. *Blood.* 2008;112:1443-1452.
- Vivier E, Ugolini S, Blaise D, et al. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:239-252.
- Young MR, Staudt LM. Two forms of pathological B cell receptor signaling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:229-243.