



Tesis de Maestría

Programa para la Investigación Biomédica (ProInBio)

**Estudio de mecanismos moleculares asociados a la proliferación y
sobrevida del clon tumoral en la Leucemia Linfoide Crónica: hacia la
identificación de un posible blanco terapéutico.**

Angimar Uriepero, MD

Laboratorio de Investigación en Leucemia Linfoide Crónica

Orientador: Pablo Opezzo, PhD

Co- Orientador: Pablo Morande, PhD

Montevideo - Uruguay

Julio de 2020

Dedicatoria

A todos los pacientes con LLC que formaron parte de este estudio. Un médico no se puede conformar con ser empático y ofrecer el mejor tratamiento disponible, cuando lo disponible no es suficiente.

Tabla de contenido

Índice de Figuras.....	6
Lista de Abreviaturas.....	7
Resumen.....	11
Introducción.....	14
1. Leucemia Linfoide Crónica.....	15
1.1 Generalidades.....	15
1.2 Diagnóstico y Estratificación Clínica.....	16
1.3 Factores Pronósticos.....	17
1.3.1 Perfil Mutacional IgVH.....	18
1.3.2 β 2-microglobulina.....	19
1.3.3 Lipoproteína Lipasa.....	19
1.3.4 Alteraciones Cromosómicas.....	19
1.4 Tratamiento.....	21
2. Microambiente Tumoral y Proliferación.....	24
2.1 Microambiente Tumoral.....	24
2.1.1 Células ‘Nurse-like’ y células estromales mesenquimales en la LLC.....	25
2.1.2 Linfocitos T en el microambiente leucémico.....	27
2.1.3 Células endoteliales y células dendríticas foliculares en la LLC.....	27
2.2 Poblaciones Proliferantes en la LLC.....	28
2.2.1 Población Proliferante CD38 ^{POS}	29
2.2.2 Población Proliferante IgM ^{POS} /IgG ^{POS}	30
2.2.3 Población Proliferante CXCR4.....	31
2.2.4 Población Proliferante CD86 ^{POS}	32
2.3 Rol de AID en la LLC.....	32
3. Mecanismos de resistencia a la muerte celular regulada.....	33
3.1 Apoptosis.....	33
.....	35
3.1.1 Familia de proteínas BCL-2 como “switch” entre la supervivencia y muerte celular.....	35
3.1.2 Desbalance en la expresión de proteínas de la familia BCL-2 es un sello distintivo en la LLC.....	36
3.1.3 BCL-2 como blanco terapéutico.....	37

3.2 Piroptosis	38
3.2.1 La activación del inflamasoma es la base de la piroptosis	39
3.2.2 TMEM176A y TMEM176B, noveles canales iónicos reguladores del inflamasoma.....	41
3.2.3 Piroptosis, ¿un mecanismo ambiguo en cáncer?.....	42
Objetivos.....	45
Objetivo General.....	46
Objetivo Específico	46
Materiales y Métodos.....	47
1. Muestras de Pacientes.....	48
2. Extracción de Ácido Ribonucleico (RNA) y Síntesis de ADN copia (cDNA)	48
3. Determinación del Perfil Mutacional IgVH	48
4. PCR de AID, LPL y GAPDH.....	49
5. Análisis por citometría de flujo y aislamiento celular por ‘cell sorting’ de la FP IgM ^{pos} /IgG ^{pos}	50
6. Preparados para FISH.....	50
7. Purificación de células CD19 ^{pos} por separación celular activada por magnetismo (MACS)	50
8. Western Blot anti-TMEM176A.....	51
9. Western Blot anti-GSDM-D.....	51
10. Western Blot anti-GAPDH.....	52
11. Evaluación de la muerte celular espontánea en células de LLC en cultivo	52
12. Inmunofluorescencia de NLRP3 y Casp. 1 activa	53
13. Cultivo de células de LLC con (+)-BayK8644 y/o Venetoclax	53
14. Evaluación de la activación de Casp. 1 y viabilidad celular por citometría de flujo.....	54
15. Ratones E μ -TCL1	54
16. Determinación de la expresión de TMEM176A en ratones E μ -TCL1 por PCR	55
17. Cultivo celular de esplenocitos de E μ -TCL1 en presencia de (+)-BayK8644 y Venetoclax	56
18. Transferencia celular adoptiva (TCA) de ratones E μ -TCL1.....	56
19. Tratamiento con (+)-BayK8644 y Venetoclax en el modelo de transferencia celular adoptiva E μ -TCL1.	57
Resultados	59
1. Un alto porcentaje de la FP IgM ^{pos} /IgG ^{pos} en sangre periférica se asocia a una enfermedad más agresiva.....	60
1.1 Determinación del porcentaje de la FP IgM ^{pos} /IgG ^{pos} por citometría de flujo.	60
1.2 El porcentaje de la FP IgM ^{pos} /IgG ^{pos} al debut de la enfermedad se asocia al estadio Binet y puede predecir el TFT.	61

1.3 La FP IgM ^{pos} /IgG ^{pos} aumenta con la progresión de la enfermedad.....	63
2. La FP es la primera subpoblación tumoral en adquirir la del11q	64
3. El tratamiento con ibrutinib disminuye el porcentaje de las FPs y la expresión de la enzima AID....	67
4. Activación del inflamasoma en la LLC.....	69
4.1 Alta expresión de TMEM176A en pacientes progresores se correlaciona con menor clivaje de GSDM-D.	69
4.2 Células de LLC muestran marcadores de muerte celular piroptótica cuando son puesta en cultivo.	71
4.3 Activación del Inflamasoma NLRP3 en células B de LLC.	72
5. Modulación farmacológica del inflamasoma en PBMCs de LLC	73
5.1 (+)-BayK8644 estimula la activación del inflamasoma en células primarias de LLC.	73
5.2 Venetoclax promueve la activación de Casp.1 en PBMCs de LLC.	74
5.3 El fragmento p30 de la GSDM-D incrementa en respuesta al (+)-BayK8644 y al Venetoclax.....	75
5.4 (+)-BayK8644 mejora la acción del venetoclax en células primarias de LLC.	76
6. Modulación farmacológica de TMEM176A en ratones transgénicos E μ -TCL1.	77
6.1 (+)-BayK8644 en combinación con Venetoclax incrementa la muerte celular en esplenocitos aislados de ratones E μ -TCL1.	78
6.2 Efecto del (+)-BayK8644 y su combinación con el Venetoclax en el modelo de transferencia adoptiva de ratones E μ -TCL1.	79
6.2.1 Puesta a punto del modelo de transferencia adoptiva E μ -TCL1.....	79
.....	81
6.2.2 Impacto del (+)-BayK8644 y su combinación con Venetoclax en la expansión del clon tumoral.	81
Discusión y Conclusiones	85
Agradecimientos.....	97
Bibliografía.....	100
Anexos	118

Índice de Figuras

Figura 1. Terapias dirigidas en la LLC	22
Figura 2. Primera línea de tratamiento en la LLC.....	23
Figura 3. Microambiente tumoral en la LLC.....	25
Figura 4. Modelo hipotético del ciclo de vida de una célula B de LLC	32
Figura 5. Señalización de la apoptosis	34
Figura 6. Inflamasoma canónico y no canónico	40
Figura 7. Esquema de tratamiento en el modelo E μ -TCL1	58
Figura 8. Porcentaje de la FP IgM ^{pos} /IgG ^{pos} de acuerdo con el perfil IgVH	60
Figura 9. El porcentaje de la FP IgM ^{pos} /IgG ^{pos} se asocia a una enfermedad más agresiva	62
Figura 10. FP IgM ^{pos} /IgG ^{pos} durante la progresión clínica de la LLC.....	64
Figura 11. Evaluación de la del11q en la FQ y FP	65
Figura 12. Evaluación de la del17p en la FQ y FP	66
Figura 13. Translocación C-MYC/IGH en la FQ y FP	66
Figura 14. Correlación entre la expresión de TMEM176A y el clivaje de GSDM-D	70
Figura 15. Piroptosis en PBMCs de LLC durante el cultivo celular.....	72
Figura 16. Activación del inflamasoma NLRP3 en células de LLC	73
Figura 17. Curva dosis-tiempo-respuesta del (+)-BayK8644 en PBMCs de LLC	74
Figura 18. Curva dosis-tiempo-respuesta del venetoclax en PBMCs de LLC	75
Figura 19. Clivaje de GSDM-D mediada por (+)-BayK8644 y venetoclax	76
Figura 20. Efecto combinado del (+)-BayK8644 + venetoclax en PBMCs de LLC	77
Figura 21. Efecto combinado del (+)-BayK8644 + venetoclax células leucémicas de ratones E μ -TCL1	79
Figura 22. Transferencia celular adoptiva en ratones E μ -TCL1	80
Figura 23. Administración del (+)-BayK8644 y su combinación con venetoclax en el modelo de transferencia celular adoptiva E μ -TCL1	82
Figura 24. Respuesta al (+)-BayK8644 y su combinación con venetoclax posterior a 10 semanas de seguimiento en el modelo de transferencia celular adoptiva E μ -TCL1	83
Figura 25. Efecto del (+)-BayK8644 sobre el clon tumoral en el modelo de transferencia celular adoptiva E μ -TCL1	84

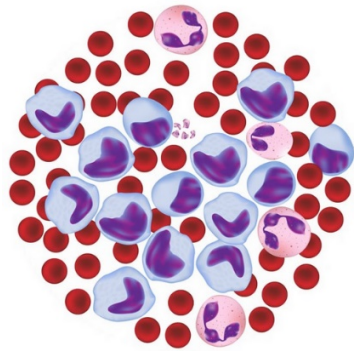
Lista de Abreviaturas

ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNsc	Ácido desoxirribonucleico de simple cadena
AF488	Alexa flúor 488
AID	Deaminasa de citidina inducida por activación
AIM2	Proteína ausente en melanoma 2
APAF-1	Proteína activadora de la apoptosis 1
APRIL	Ligando inductor de proliferación
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASC	'apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD'
ATM	Gen mutado de la Ataxia-Telangiectasia
ATP	Adenosín trifosfato
BAD	<i>'The BCL2 associated agonist of cell death'</i>
BAFF	Factor activador del linfocito B
BAK	<i>'BCL2-antagonist/killer'</i>
BAX	Proteína X asociada a BCL-2
BCA	Ácido bicinconínico
BCL2	Proteína 2 asociada a linfomas B
BCL6	Proteína 6 del linfoma de células B
BCL-XL	Proteína del linfoma B extra grande
BCR	Receptor del Linfocito B
BIRC3	'Baculoviral IAP Repeat Containing 3'
BER	Reparación por escisión de bases
BMDCs	Células dendríticas de médula ósea
BSA	Albúmina de suero bovino
BSAP	Proteína Activadora Específica de la Célula B
BTK	Tirosina quinasa de Brutón
CAD	Complejo de DNAsas activado por caspasa
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasa
Casp.1	Caspasa 1
Casp.1-A	Caspasa 1 activada
CC	Cambio de clase
CCL19	Quimiocina ligando 19
CCL21	Quimiocina ligando 21
CD40L	Ligando de CD40
CDs	Células dendríticas
Células NK	Células asesinas naturales
CEUA	Comité de ética en el uso de animales

CIT	Quimio-inmunoterapia
CLL-IPI	Índice pronóstico internacional para la LLC
CPs	Centros proliferantes
CXCL9	Quimiocina 9 con motivo C-X-C
CXCL10	Quimiocina 10 con motivo C-X-C
CXCL11	Quimiocina 11 con motivo C-X-C
CXCL12	Quimiocina 12 con motivo C-X-C
CXCL13	Quimiocina 13 con motivo C-X-C
CXCR3	Receptor de quimiocinas C-X-C tipo 3
CXCR4	Receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4
CXCR5	Receptor de quimiocinas C-X-C tipo 5
DAMPS	Patrones moleculares asociado a daño
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSBs	Ruptura de doble cadena en el ADN
ECs	Células endoteliales
FCR	Fludarabina-Ciclofosfamida-Rituximab
FDA	'U. S. Food and Drug Administration'
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FISH	Hibridación fluorescente in situ
FL	Full length
FPs	Fracciones proliferantes
FQ	Fracción quiescente
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
GSDM-D	Gasdermina D
GSDM-E	Gasdermina E
HCC	Carcinoma hepatocelular
HMS	Hipermutación somática
IAPs	Inhibidores endógenos de la apoptosis
IFI-16	Proteína 16 inducible por IFN- γ
IFN-γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IgVH	Gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina
IgVH Mut	Perfil mutado del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina
IgVH No Mut	Perfil no mutado del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina
IL-1β	Interleuquina 1 beta
IL-18	Interleuquina 18
IL-2	Interleuquina 2
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
INFγ	Interferón gamma
IP	Intraperitoneal
ITIM	Dominio de inhibición basado en tirosina

JAK	Janus quinasa
LB	Linfocito B
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLC	Leucemia Linfoide Crónica
LPL	Lipoproteína lipasa
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Linfocito T
MC	Muerte celular
MCL-1	<i>'Induced myeloid leukemia cell differentiation protein'</i>
MCR	Muerte celular regulada
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
miRNA	Micro ARN
M-MLV	<i>'Moloney Murine Leukemia Virus'</i>
MO	Médula ósea
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
MSCs	Células estromales mesenquimales
N/D	No determinado
N/T	No tratado
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NLs	Nódulos linfáticos
NLCs	Células <i>nurse-like</i>
NLR	Receptores <i>'NOD-like'</i>
NLRC4	Proteína 4 que contiene el dominio CARD de la familia NLR
NLRP1	Proteína 1 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD
NLRP3	Proteína 3 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD
NLRP6	Proteína 6 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD
NLRP7	Proteína 7 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD
NLRP12	Proteína 12 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD
NSCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
OLS	Órganos linfoides secundarios
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
PBT	PBS-BSA 3%-Triton X-100 0.1%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Proteína de muerte celular programada
PD-L1	Ligando de la proteína de muerte celular programada
PE	Ficoeritrina
PEG-400	Polietilenglicol 400
PFA	Paraformaldehído
Pi3K	Fosfatidilinositol 3 fosfato quinasa
PTEN	<i>'Phosphatase and tensin homolog'</i>

PUMA	Modulador de apoptosis sobre regulado por p53
PYD	Dominio de pirina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S/A	Sin alteraciones
SDS	Dodecilsulfato sódico
SF3B1	La subunidad 1 del factor de empalme 3B
SFB	Suero fetal bovino
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida libre de progresión
SP	Sangre Periférica
ssDNA	ADN de simple cadena
STAT	<i>'Signal Transducer and Activator of Transcription'</i>
TA	Temperatura ambiente
TBS	Buffer Tris salino
TCA	Transferencia celular adoptiva
TCL1	<i>'T-cell leukemia/lymphoma 1'</i>
TMEM176A	Proteína de transmembrana A
TMEM176B	Proteína de transmembrana B
TNF	Factor de necrosis tumoral
TP53	Gen de la proteína tumoral 53
Treg	Linfocitos T reguladores
TFT	Tiempo que transcurre desde el diagnóstico hasta el primer tratamiento
UNG	Uracilo-ADN glicosilasa
Vcx	Venetoclax
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
XIAP	inhibidor ligado al cromosoma X de la proteína de apoptosis



Resumen

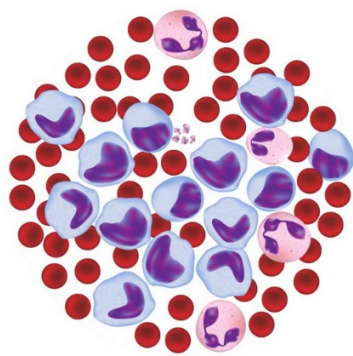
La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es una neoplasia caracterizada por la acumulación de Linfocitos B (LB) maduros en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides secundarios (OLS). Es la leucemia más frecuente en adultos de países occidentales, y afecta principalmente a individuos mayores de 50 años. Esta enfermedad presenta una evolución clínica heterogénea, donde si bien hay un grupo de pacientes que se mantienen con una LLC estable desde su diagnóstico sin requerir tratamiento, existen otros que debutan o progresan con una enfermedad más agresiva, observándose con frecuencia resistencia o recaídas posterior a la terapia. Por lo que, en la actualidad la LLC sigue considerándose una patología incurable. El estudio de los mecanismos moleculares que conllevan a la progresión de la enfermedad permite identificar nuevos blancos terapéuticos que podrían redundar en el hallazgo de un mejor tratamiento que cure definitivamente esta leucemia y/o mejore la calidad de vida de los pacientes.

El microambiente tumoral juega un rol fundamental en la fisiopatología de la LLC. La interacción de células no B con el linfocito leucémico provee señales que conlleva a la supervivencia y/o proliferación del clon tumoral. En el año 2005, Messmer y col. describieron que en la LLC existe una subpoblación celular con alta capacidad proliferativa. Acorde con esto, nuestro grupo identificó en la sangre periférica de pacientes con pronóstico desfavorable la presencia de una fracción proliferante (FP) con un activo cambio de clase y expresión de la enzima deaminasa de citidina inducida por activación (AID). Posteriormente, otras FPs expresando la enzima AID como una señal de activación linfocitaria también han sido descritas en pacientes con mala evolución clínica. Y dado a su actividad mutagénica, AID ha sido asociada a la generación de mutaciones puntuales en el ADN y translocaciones cromosómicas en linfomas de células B. La presencia de estas FP con una expresión anómala de AID en la sangre periférica de pacientes con una enfermedad progresiva nos lleva a hipotetizar que esta enzima podría estar relacionada con el origen de las aberraciones cromosómicas de mal pronóstico en la LLC.

En este trabajo demostramos que la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} se asocia al desarrollo de una enfermedad más agresiva y que esta subpoblación pareciera ser la primera en adquirir la del11q que conlleva a la pérdida del gen ATM, siendo dicha alteración cromosómica asociada a la refractariedad terapéutica en la LLC. De igual manera, nuestros resultados muestran que las FP y la expresión de AID se ven afectados por el tratamiento con Ibrutinib, un inhibidor de la enzima tirosina quinasa de Brutón que ha sido recientemente aprobado por la FDA para el tratamiento de la LLC. Además, los resultados de esta tesis proveen datos originales sobre un mecanismo alternativo al previamente descrito para esta droga sobre el clon leucémico. Demostrando así que la disminución de la enzima AID luego del tratamiento con ibrutinib estaría originada en la desactivación de la vía IL-4/JAK/STAT6.

En una segunda parte de la tesis nuestros esfuerzos fueron dirigidos al estudio del proceso inflamatorio en los pacientes progresores con LLC y como moléculas implicadas en la activación

del inflamasoma podrían convertirse en nuevos blancos terapéuticos. Si bien, la presencia de un microambiente tumoral activado favorece el desarrollo de una LLC más agresiva. También ha sido descrito una paradójica regulación del sistema inmune en esta leucemia, donde una modulación negativa de la respuesta inflamatoria puede promover el crecimiento tumoral y tolerancia inmunológica. En este sentido nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de la proteína TMEM176A conlleva a menos actividad del inflamasoma y resistencia a la piroptosis en la LLC, postulando la hipótesis de que las células tumorales de pacientes con un desarrollo agresivo de LLC podrían aumentar la expresión de TMEM176A para escapar de la muerte celular programada. Finalmente, este trabajo propone que la modulación farmacológica de TMEM176A podría ser utilizada como un complemento junto con drogas como Venetoclax o Ibrutinib en la terapia para esta leucemia. Los resultados en células humanas leucémicas, así como en un modelo murino de LLC, mostrados en este trabajo de tesis proveen un aporte racional a esta hipótesis y dejan planteada una nueva perspectiva terapéutica para esta leucemia.



Introducción

1. Leucemia Linfoide Crónica

1.1 Generalidades

La Leucemia Linfoide Crónica (LLC) es una neoplasia caracterizada por la acumulación lenta y progresiva de pequeños linfocitos B (LB) maduros, clonales, CD5 positivos en sangre periférica (SP), medula ósea (MO) y órganos linfoides secundarios (OLS) (Rozman et al., 1995; Hallek, 2020). La presentación clínica de esta leucemia es sumamente heterogénea. Generalmente, un grupo de pacientes debuta con una enfermedad indolente, definida por linfocitosis que se mantiene estable al pasar de los años sin requerir tratamiento; mientras que otros presentan una LLC agresiva caracterizada por un rápido incremento de la linfocitosis y posible presencia de linfadenopatías y citopenias, por lo que deben ser tratados de inmediato; y un tercer grupo en el cual la enfermedad se mantiene estable por meses o años, para luego progresar (Dighiero, 2003). Los últimos dos grupos de paciente significan un gran desafío para los médicos, en ellos es vital contar con factores pronóstico que ayuden a identificar de forma temprana los casos de mayor riesgo, y predecir el tratamiento más adecuado. Si bien, en los últimos 10 años la inclusión de las nuevas terapias dirigidas ha revolucionado el tratamiento de la LLC, en la actualidad sigue considerándose una patología incurable dado que no existe un tratamiento que permita la completa remisión de la enfermedad en todos los casos (Kipps et al., 2017; Burger & O'Brien, 2018; Fürstenau, Hallek & Eichhorst, 2019).

La mayoría de los pacientes con LLC son asintomáticos al momento del diagnóstico, y más de $\frac{3}{4}$ son el resultado de un hallazgo incidental en un hemograma de rutina (Dighiero and Hamblin, 2008). Sin embargo, la LLC puede tener una amplia gama de presentación clínica, los síntomas más comunes incluyen fatiga, pérdida involuntaria de peso, diaforesis profusa nocturna e incremento de infecciones (Burger & O'Brien, 2018). Algunos individuos cursan con citopenias autoinmunes (por ejemplo, anemia hemolítica autoinmune o púrpura trombocitopénica idiopática) y al examen físico es frecuente hallar linfadenopatías (fácilmente palpables en 3 regiones: cervical, axilar e inguino-femoral), hepatomegalia y esplenomegalia.

En cuanto a su epidemiología, la LLC es la leucemia más frecuente en adultos de países occidentales, afectando principalmente a individuos mayores de 50 años (Dighiero and Hamblin, 2008). El riesgo de desarrollar esta neoplasia B es 2 veces mayor en hombres que en mujeres, e incrementa con la edad (Kipps et al., 2017). Acorde con datos de la Sociedad Americana contra el Cáncer (Siegel et al., 2020) para el año 2020 se estiman 21040 casos nuevos de LLC (12930 en hombres y 8110 en mujeres) en los Estados Unidos, y se generarán 4060 muertes aproximadas en dicho país a causa de esta patología. La incidencia varía según las regiones geográficas, así como la composición étnica de la población. En países occidentales oscila entre 3,5/100.000/año (Estados Unidos) y 6/100.000/año (Reino Unido). En lo que refiere a Uruguay, se observan valores

semejantes de incidencia de 5,2/100.000/año con una edad promedio de diagnóstico de 70 para hombres y 74 para mujeres (Moro et al-. 2009; Bianchi et al., 2010).

1.2 Diagnóstico y Estratificación Clínica

En la mayoría de los casos el diagnóstico de LLC es establecido a través de:

- Hemograma: linfocitosis $\geq 5 \times 10^9/L$ de LB mantenida al menos por 3 meses.
- Frotis de sangre periférica: Linfocitos maduros con escaso citoplasma, denso núcleo, dificultad para discernir nucleolos y agregados de cromatina.
- Inmunofenotipo: La clonalidad de los linfocitos debe ser confirmada mediante citometría de flujo. Típicamente las células de LLC co-expresan el antígeno CD5, característico de la superficie de células T, junto a los antígenos de linfocitos B CD19, CD20 y CD23. En la LLC los niveles de inmunoglobulina (Ig) de superficie, de CD20 y de CD79 son más bajo que aquellos encontrados en una célula B normal. Las células tumorales expresan restrictivamente una sola cadena liviana de Ig. Recientemente se ha llegado al consenso que un panel constituido por CD19, CD5, CD20, CD23, κ , y λ son suficientes para establecer el diagnóstico. Y en aquellos casos en los cuales el diagnóstico no sea claro es recomendable agregar los marcadores CD43, CD79b, CD81, CD200, CD10, o ROR1 (Rawstron et al., 2018).
- Biopsia de MO: Aunque no es requerido para establecer el diagnóstico de LLC, en algunos casos se realiza biopsia de MO, la cual usualmente muestra hiperplasia dado a un incremento de linfocitos de apariencia madura. Cuatro tipos de patrones han sido descritos: nodular, intersticial, mixto (nodular e intersticial) y difuso. Siendo este último asociado con un estado avanzado de la enfermedad. Además, la MO usualmente presenta disminución de células de origen mieloide y eritroide.

A mediados de los años 70 Rai y col. propusieron una clasificación anatómico-clínica de pacientes con LLC con 5 niveles (0, I, II, III y IV) (Rai et al., 1975), que luego fue modificada para reducir el número de estadios de 5 a 3 (Rai et al., 1987). La clasificación modificada de Rai permite definir a los pacientes de bajo riesgo, (estadio 0 de Rai), pacientes con riesgo intermedio (estadio I o II de Rai) y enfermedad de alto riesgo (estadio III o IV de Rai). Años más tarde Binet y col. realizaron otra clasificación que permitió subdividirlos en tres grupos pronóstico: bueno (estadio A), intermedio (estadio B) y severo (estadio C) (Binet et al. 1977). Ambas clasificaciones se basan en la evaluación de la linfocitosis, tamaño de los nódulos linfáticos, detección de organomegalia y presencia o ausencia de anemia o trombocitopenia. La clasificación de Binet y Rai están directamente relacionadas con la supervivencia de los pacientes, siendo aquellos con estadio Binet

A o Rai 0 los que presentan una sobrevida media de más de 10 años. Los pacientes con estadio Binet B o Rai I/II presentan una sobrevida media de entre 5 a 7 años, mientras aquellos que presentan una menor sobrevida, de aproximadamente 3 años son los de estadio Binet C o Rai III/IV (Hamblin, 2007). En la actualidad, ambas clasificaciones son usadas indistintamente y las dos procuran un sistema sumamente simple, que requiere test de laboratorios sencillos y que permiten tanto el diseño de estudios clínicos como de estrategias terapéuticas.

1.3 Factores Pronósticos

Si bien las clasificaciones de Rai y de Binet ayudan a estratificar los pacientes de acuerdo con el riesgo de la enfermedad, ante la gran diversidad de nuevas terapias, estos sistemas de estratificación se han vuelto insuficiente para identificar subgrupos de pacientes que se podrían beneficiar de un tratamiento en particular. Por tal motivo, se han generado nuevos factores pronósticos basados en características genéticas, moleculares y bioquímicas de la LLC que proveen información adicional (Parikh et al., 2016). Los biomarcadores más relevantes son el estado mutacional de las cadenas pesadas de inmunoglobulina (Perfil mutacional IgVH), concentración de β 2-microglobulina plasmática, presencia de del(17p) o mutación *TP53* (Hallek et al., 2018).

En la práctica clínica este conjunto de marcadores está englobado en el CLL-IPI (Índice Pronóstico Internacional para la LLC), el cual clasifica a los pacientes en 4 grupos con diferente sobrevida global a 5 años (International CLL IPI working group, 2016) (**Tabla 1**).

Valor CLL-IPI	Categoría CLL-IPI	SG a 5 años	Consecuencia clínica potencial
0 - 1	Bajo riesgo	93,2%	No tratar
2 - 3	Riesgo intermedio	79,3%	No tratar, excepto si la enfermedad es realmente sintomática
4 - 6	Alto riesgo	63,3%	Tratamiento indicado, excepto si la enfermedad es asintomática
7 - 10	Muy alto riesgo	23,3%	Si se necesita tratar, usar terapias dirigidas o tratamientos bajo evaluación en estudios clínicos. Evitar quimioterapia

Tabla 1 CLL-IPI. El índice Pronóstico Internacional para la LLC (CLL-IPI) clasifica a los pacientes en 4 grupos, asignándole un valor a los factores adversos de 5 marcadores pronósticos individuales, el que mayor puntaje tiene es la presencia de delección o mutación en *TP53*, a cual se le asigna 4 puntos; mientras que un perfil IgVH No mutado o un valor de β 2-microglobulina >3.5

mg/L reciben 2 puntos, por último una edad mayor de 65 años o estadio RAI o Binet intermedio o alto son ponderados con 1. La sumatoria de cada uno de estos puntajes determinan el valor CLL-IPI y en qué categoría de riesgo se encuentra el paciente, lo cual define si amerita o no tratamiento. Un dato importante es que a medida que aumenta el CLL-IPI la sobrevida global (SG) a 5 años va decayendo, pasando de ser un 93,2% en la categoría de bajo riesgo a 23,3% en la de muy alto riesgo (Modificado de Hallek, 2020).

Una de las principales ventajas de este índice es que identifica con más certeza a aquellos pacientes que no requieren tratamiento (Hallek, 2020). Además, al englobar varios parámetros permite diferenciar entre grupos de riesgos que antes no era posible, por ejemplo, logra distinguir pacientes con del(17p) con alto riesgo y con muy alto riesgo (International CLL IPI working group, 2016), lo cual permite generar una atención más dirigida de acuerdo con la necesidad de cada grupo de paciente.

1.3.1 Perfil Mutacional IgVH

Una cascada de señalización clave en la biología de los LB es la mediada a través de su receptor (BCR), el cual está formado por una inmunoglobulina de superficie asociada a moléculas accesorias que facilitan y amplifican la señal. Una vez unido a su antígeno, el BCR inicia un proceso de refinamiento de la afinidad antígeno-anticuerpo que comienza a través de mutaciones puntuales generadas por la enzima deaminasa de citidina inducida por activación o del inglés "activation induced cytidine deaminase" (AID), por lo que el secuenciando del gen IgVH posibilita determinar si el linfocito adquirió o no mutaciones somáticas.

En el año 1994 Schroeder y Dighiero sugieren que la LLC es una enfermedad heterogénea en donde el proceso tumoral puede originarse, ya sea en linfocitos B memoria o linfocitos B vírgenes (Schroeder and Dighiero, 1994). En este trabajo se muestra que por lo menos el 50% de los pacientes expresan IgVH con una homología menor al 98% con su configuración germinal, mientras que en el resto la homología es $\geq 98\%$.

Posteriormente, este concepto de heterogeneidad molecular es reafirmado con los trabajos de Hamblin y col. (Hamblin et al., 1999) y Damle y col. (Damle et al., 1999). Ambos estudios demuestran que, pacientes con IgVH no mutado (IgVH No mut) ($\geq 98\%$ de homología) tienen una sobrevida media de 8 años, mientras que aquellos con IgVH mutados (IgVH Mut) (Homología $< 98\%$) la sobrevida media es de 25 años. A partir de entonces, el perfil mutacional IgVH surge como el principal factor pronóstico en la LLC, y recientemente en el año 2017, se incluyó en el algoritmo terapéutico (**Fig. 2**) para identificar pacientes que podrían beneficiarse con las nuevas terapias disponibles.

1.3.2 β 2-microglobulina

Varios estudios han mostrado que marcadores séricos, tales como niveles solubles de CD23 (Reinisch, et al., 1994; Sarfati, et al., 1999), timidina quinasa y β 2-microglobulina (Hallek, et al., 1995) están asociados con sobrevida global o sobrevida libre de progresión en pacientes con LLC. De estos, solo la β 2-microglobulina se ha mantenido como un factor pronóstico independiente en varios estudios multiparamétricos (Hallek et al., 2018).

β 2-microglobulina es parte del dominio extracelular del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), y ha sido sugerido que niveles elevados de esta molécula podría generar expresión anómala del MHC-I produciendo así un menor reconocimiento de las células leucémicas por parte del sistema inmune (Hallek et al., 1995). Por lo tanto, valores séricos de β 2-microglobulina >3.5 mg/L se ha asociado con una LLC más agresiva.

1.3.3 Lipoproteína Lipasa

La lipoproteína lipasa (LPL) es una proteína N-glicosilada que es capaz de hidrolizar triglicéridos a partir de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (Felts et al., 1975). En la LLC, diferentes grupos han descrito que LPL está diferencialmente sobre expresada en pacientes un perfil IgVH No Mut, asociándose a un pronóstico desfavorable (Oppezzo et al., 2005; Vasconcelos et al., 2005). A partir de estas observaciones, múltiples evidencias han confirmado que la expresión de LPL a nivel de ARN mensajero es uno de los marcadores moleculares más robusto en la LLC (Rombout et al, 2016). Más recientemente, nuestro grupo demostró que la presencia de LPL en el clon leucémico tiene dos orígenes: 1) transcripción activa de la proteína que ocurre principalmente en pacientes con perfil IgVH No Mut y, 2) una fuente externa donde LPL pareciera ser internalizada a partir del plasma (Prieto et al., 2018). Además, en dicho manuscrito sugerimos un nuevo método de identificación de esta proteína a través de citometría de flujo.

1.3.4 Alteraciones Cromosómicas

En la LLC, a diferencia de otras patologías hematológicas, no existe una translocación cromosómica que la caracterice. Sin embargo, Döhner y col. demostraron que el 82% de los pacientes con LLC presentan aberraciones cromosómicas que pueden ser detectadas usando la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) (Döhner et al., 2000). La alteración citogenética más frecuente encontrada en la LLC es la del(13q14), identificada en un 55% de los pacientes,

seguida por la del(11q22-23) en un 25% de los casos, trisomía 12 en un 10% a un 20%, mientras que la menos frecuente es la del(17p13), identificada sólo entre 5%- 8% de los pacientes (Hallek, 2019).

La del(13q14) se asocia a buen pronóstico, y es diagnosticada principalmente en pacientes con un perfil IgVH Mut (Döhner et al., 2000). Diferentes trabajos han demostrado que la ausencia de este fragmento de ADN produce pérdida de los microARNs 15a y 16-1(Calin et al., 2002; Cimmino et al., 2005).

En lo que respecta a la trisomía del cromosoma 12 no se ha demostrado una relación directa entre los genes involucrados y la patogénesis de la LLC (Hallek, 2019). Sin embargo, trabajos como los de Ballati y col. muestran que pacientes con trisomía 12 presentan una mayor frecuencia de mutaciones en *NOTCH1* asociado a menor supervivencia global (Ballati et al., 2012). En contraste, Seiffert y col. describieron el mismo año que la incidencia de esta alteración cromosómica no incrementa con estados avanzados de la enfermedad (Seiffert et al., 2012), además ha sido demostrado que las células leucémicas con trisomía 12 expresan altos niveles de CD20 (Tam et al, 2007) y raramente presentan mutaciones en *TP53* (Zenz et al., 2010). Ambas observaciones podrían relacionarse con un pronóstico favorable de la enfermedad. Por ende, hoy en día el valor pronóstico de la trisomía 12 en la LLC sigue siendo controversial.

Por su parte, la del(11q22-23) se asocia a un perfil IgVH No mut y a un pronóstico desfavorable (Stilgenbauer et al., 2002). Varios estudios han mostrado baja supervivencia global y remisiones más cortas en comparación con aquellos pacientes que presentan del13q, trisomía 12 o FISH sin alteraciones (Döhner et al., 2000; Marasca, et al. 2013). En la región escindida se ubican dos de los genes más importantes asociados a la fisiopatología de la LLC, éstos son *ATM* (Gen mutado de la ataxia telangiectasia) y *BIRC3* ('Baculoviral IAP Repeat Containing 3'). Cuando ocurre ruptura de doble hebra (DSB) en el ADN la proteína ATM sincroniza varias vías de señalización involucradas en la reparación del ADN, arresto de ciclo celular y apoptosis (Stankovic and Skowronska, 2013), de aquí su importancia en el mantenimiento de la integridad del genoma. ATM activa directa e indirectamente a p53 y en consecuencia la mayoría de las drogas citotóxicas requieren que la vía ATM/p53 esté intacta para que puedan ser efectivas.

La del(17p13) incluye la región donde se localiza el gen *TP53*, y es la alteración cromosómica que tiene peor pronóstico y menor supervivencia (Stilgenbauer et al., 2002). Estos pacientes muestran una marcada resistencia a la quimioterapia, abarcando entre el 30-50% de los casos refractarios a Fludarabina, y cuya respuesta no mejora cuando se combina con un anticuerpo anti-CD20 (Hallek et al.,2010). La mejor respuesta en estos pacientes se ha obtenido con el inhibidor de la BTK (Tirosina quinasa de Brutón) y el anti-Bcl2. El 80% de los casos con del(17p13) muestran mutaciones de TP53 en el alelo remanente, y también es posible encontrar

mutaciones en este gen sin la presencia de la delección, en cuyo caso el pronóstico es similar (Seiffert et al., 2012).

De acuerdo con datos publicados por Baliakas y col. es posible identificar en un 16% de los casos un cariotipo complejo, el cual se define por la presencia de 3 o más anormalidades cromosómicas, asociándose a peor pronóstico (Baliakas et al., 2014). Dada la importancia y el impacto que tienen las distintas alteraciones cromosómicas en el pronóstico de la LLC, la técnica de FISH es un estudio necesario para categorizar a los pacientes en los diferentes grupos de riesgo, y de esta manera poder definir intervalos de seguimiento y/o el tratamiento más adecuado.

1.4 Tratamiento

La decisión de iniciar tratamiento depende de la presencia o no de una enfermedad activa. Pacientes asintomáticos con estadíos Binet A-B o Rai 0-II no tienen indicación de tratamiento y deben ser monitoreados en intervalos de cada 3-12 meses (Kipps et al., 2017). En cambio, aquellos individuos que presentan Binet C, Rai III-IV o síntomas de enfermedad activa deben iniciar tratamiento. La elección de la terapia más adecuada depende también de la presencia de otros factores pronóstico, comorbilidades asociadas que afecten el estado general del paciente y si recibió tratamiento previo.

La quimio-inmunoterapia (CIT) ha sido la primera línea de tratamiento de la LLC por mucho tiempo. Sin embargo, con el advenimiento de nuevas drogas que tienen como blanco inhibir vías que promueven la proliferación o supervivencia de clon tumoral, esta tendencia ha ido cambiando. En los últimos años han sido publicados varios estudios donde se compara la CIT contra los nuevos agentes, y estos últimos han mostrado superioridad en varios grupos de pacientes, especialmente en aquellos con alto riesgo (Burger, et al. 2015; Roberts, et al., 2016; Woyach, et al., 2018; Moreno, et al., 2019). Aunque la CIT pareciera ir perdiendo importancia en el tratamiento de LLC, en la actualidad sigue jugando un rol central en los pacientes con IgVH Mut, en cuyo caso la combinación de fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR) produce importantes supervivencias libres de progresión (SLP) en casi el 50% de los pacientes, con posibilidad de cura en aquellos casos donde no se ha tenido recaída más allá de los 10 años (Fischer et al., 2016; Thompson et al., 2016).

En la **figura 1** se resumen las terapias dirigidas que están actualmente aprobadas en la LLC.

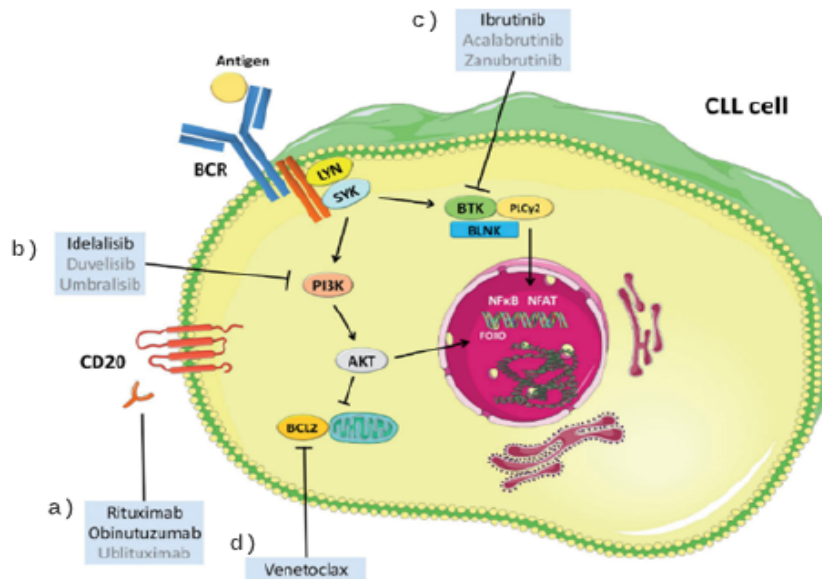


Fig.1 Terapias dirigidas en la LLC. En negrita se pueden observar los inhibidores ya aprobados para el tratamiento de la LLC, y en gris moléculas que se encuentran aún bajo investigación (Modificado de Fürstenau, Hallek y Eichhorst, 2019). **a)** Entre las primeras terapias dirigidas usadas en el tratamiento de la LLC se encuentra el Rituximab, un anti-CD20, el cual fue el primer anticuerpo monoclonal en ser aprobado por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA). Rituximab actúa uniéndose a CD20 en la superficie del LB, lo cual permite la eliminación de los linfocitos a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y por inducción directa de la apoptosis (James and Kipps, 2011). Posteriormente se desarrolló obinutuzumab, un anti-CD20 de segunda generación. En la actualidad, está aprobado el uso de ambos anti-CD20 en combinación con otras drogas para el tratamiento de la LLC (Fürstenau, Hallek y Eichhorst, 2019). **b)** Idelalisib es un inhibidor de la isoforma delta de la enzima fosoinositol 3-quinasa (PI3K). En contraste a las otras isoformas de PI3K, PI3Kδ es expresada selectivamente en células hematopoyéticas. Al inhibir a la proteína PI3Kδ, Idelalisib bloquea varias vías de señalización celular involucradas en el mantenimiento de la viabilidad y proliferación de la célula B leucémica (Zirlik and Veelken, 2018). **c)** Por su parte el ibrutinib es un inhibidor irreversible de la BTK. Existe evidencia que más allá de su efecto directo sobre la proliferación del clon tumoral, ibrutinib es capaz de modular el microambiente tumoral para revertir mecanismos de evasión inmune (Charalambous, Schwarzwich & Witzens-Harig, 2018). **d)** Venetoclax es una molécula pro apoptótica, el cual inhibe a la proteína BCL2 promoviendo así la muerte del clon leucémico, al ser un mecanismo río debajo de p53, esta terapia ha tenido gran éxito en aquellos pacientes con pérdida o mutación en TP53 (Fürstenau, Hallek y Eichhorst, 2019).

Dentro de las nuevas moléculas, las que mayor impacto clínico han tenido se encuentran los inhibidores de la vía de señalización del BCR, y dentro de estos los destinados a bloquear a la enzima PI3K (Idelalisib) o a la tirosina quinasa de Brutón (Ibrutinib, Acalabrutinib). Datos provenientes del estudio clínico llevado a cabo por el NIH (Instituto Nacional de Salud – Estados Unidos) donde se evaluó ibrutinib en primera línea para el tratamiento de la LLC muestran que pacientes con del(17p) o mutación en *TP53* presentaron una SLP a cinco años de 74,4%, y aquellos casos negativos tanto para *TP53* como para del(17p) la SLP fue de 100% (Ahn et al., 2018). A partir de estos resultados prometedores se recomienda que aquellos pacientes con alteraciones en p53 deberían recibir ibrutinib como primera línea de tratamiento, así como para aquellos casos que sean negativos para ambas alteraciones, pero que presente un perfil IgVH No Mut. Más

recientemente, en abril 2020 la FDA ('U. S. Food and Drug Administration') aprobó el uso combinado del ibrutinib y Rituximab para el tratamiento de primera línea en la LLC basado en los resultados del estudio clínico E1912 (Shanafelt et al., 2019).

De igual manera el venetoclax, un bloqueante de la proteína anti-apoptótica 2 asociada a linfoma B (BCL-2); al estimular la muerte celular de una manera independiente de p53 se ha convertido en una de las terapias con mayor éxito, sobre todo en aquellos pacientes con del17p (Fürstenaу, Hallek y Eichhorst, 2019). El estudio clínico MURANO donde se comparó Venetoclax + Rituximab versus CIT (Bendamustina + Rituximab) en pacientes con LLC refractaria, mostró una SLP a 2 años de 84,9% en los pacientes que recibieron Venetoclax + Rituximab, frente a un 36,3% del otro brazo del ensayo (Seymour et al., 2018).

Basado en todos estos nuevos resultados, en el 2020 el grupo de Hallek propone un algoritmo actualizado en el tratamiento de primera línea en LLC, el cual se resumen en la **Fig. 2**. Si bien, la última década ha generado grandes avances en el tratamiento de la LLC, información adicional es requerida para determinar si los nuevos agentes deben ser usados en monoterapia o en combinación, y cuál es la terapia secuencial más recomendada. Este último punto es sumamente importante para ofrecer el mejor manejo a los pacientes refractarios.

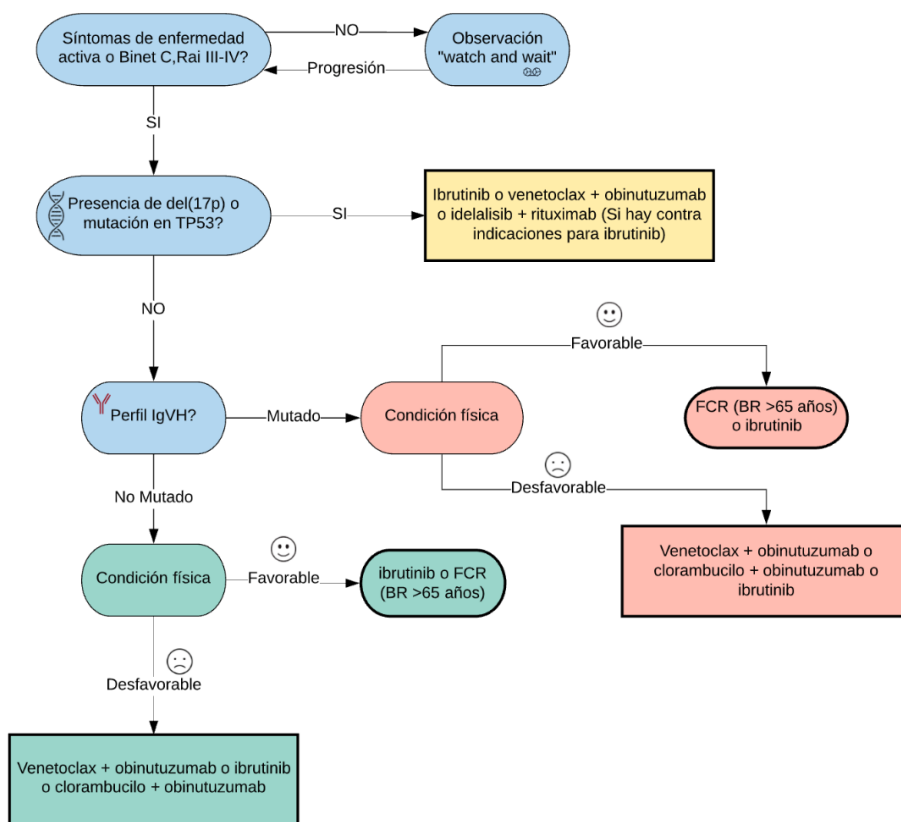


Figura 2. Primera línea de tratamiento en la LLC. La decisión de iniciar tratamiento depende de si hay o no de una enfermedad

activa. En pacientes asintomáticos con estadios Binet A-B o Rai 0-II no está indicado tratamiento y se recomienda ser monitoreados en intervalos de cada 3-12 meses. En cambio, aquellos individuos que presenten Binet C, Rai III-IV o síntomas de enfermedad activa deben iniciar tratamiento, cuya decisión de la terapia más adecuada será basado tomando en cuenta el estado de p53, perfil mutacional IgVH, presencia de comorbilidades y edad del paciente. Para aquellos pacientes con del17p o mutación en *TP53* se recomienda el tratamiento con ibrutinib o venetoclax+anti-CD20. Si p53 no está comprometido, pero presenta un perfil IgVH No Mut, hay dos escenarios, si el paciente tiene un buen estado general se recomienda ibrutinib o en su defecto FCR, o Bendamustina + Rituximab (BR) si es mayor de 65 años, por el contrario, si tiene comorbilidades asociadas que contraindiquen el uso del ibrutinib, la primera recomendación es Venetoclax + Obinutuzumab. Por su parte los pacientes con perfil IgVH Mut podrían ser buenos candidatos para CIT, teniendo en cuenta que la SLP en este grupo de pacientes tratados con FCR es >10 años en casi el 50% de los pacientes. Si el paciente con IgVH Mut no es candidato para CIT o ibrutinib, la terapia más recomendada en este caso sería Venetoclax + Obinutuzumab (Hallek, 2020).

2. Microambiente Tumoral y Proliferación

2.1 Microambiente Tumoral

La relevancia del microambiente tumoral en la LLC es destacada en los diversos estudios publicados que prueban que células leucémicas progresivamente se acumulan *in vivo*, pero rápidamente experimenta apoptosis cuando son cultivadas *in vitro* (Panayotidis et al., 1996; Burger et al., 2000, Caligaris-Cappio, 2003). Estas observaciones sugieren que el linfocito tumoral es dependiente de un conjunto de señales de supervivencia y proliferación que recibe por parte de poblaciones celulares accesorias que conforman su microambiente. En especial, interacciones dadas con células *nurse-like* (NLCs), células estromales de mesenquimales (MSCc), células T activadas y células endoteliales (ECs) podrían ser las responsables de mantener el defecto en la muerte celular (Kipps et al., 2017).

En la LLC el compartimento proliferativo está representado por agregados locales de prolinfocitos y paraimunoblastos proliferantes que forman los pseudofolículos o centros proliferantes (CPs) (Lennert et al. 1978). Los CPs son estructuras histológicas claves en los nódulos linfáticos (NLs), pulpa blanca del bazo y médula ósea donde se encuentran infiltrados de linfocitos B leucémicos. La interacción entre las células neoplásicas y su microambiente conlleva a la diferenciación de una subpoblación tumoral con mayor capacidad proliferativa, favoreciendo de este modo el desarrollo de una LLC más agresiva y resistencia al tratamiento (Messmer et al., 2005).

Las células de LLC recirculan continuamente entre la SP y los OLS, cuyo proceso es dependiente de quimiocinas secretadas por células estromales en el tejido, las cuales atraen y retienen linfocitos tumorales a través de receptores de quimiocinas, en cooperación con moléculas de adhesión (Ten Hacken and Burger, 2017). La distribución de las células B en los NLs está determinada por la expresión de CXCR4 y CXCR5, receptores de las quimiocinas CXCL12 y

CXCL13 expresadas por las células estromales. A su vez, las células estromales de la médula ósea secretan CXCL9, 10, 11, 12 y 13 y CCL19 y 21 que se unen a los receptores CXCR3, CXCR4 y CXCR5 expresados por el clon leucémico (Davids & Burger 2012).

A continuación, se describen el rol de las células no B en el microambiente tumoral, cuya interacción con el linfocito leucémico favorece la progresión de la enfermedad (**Fig. 3**).

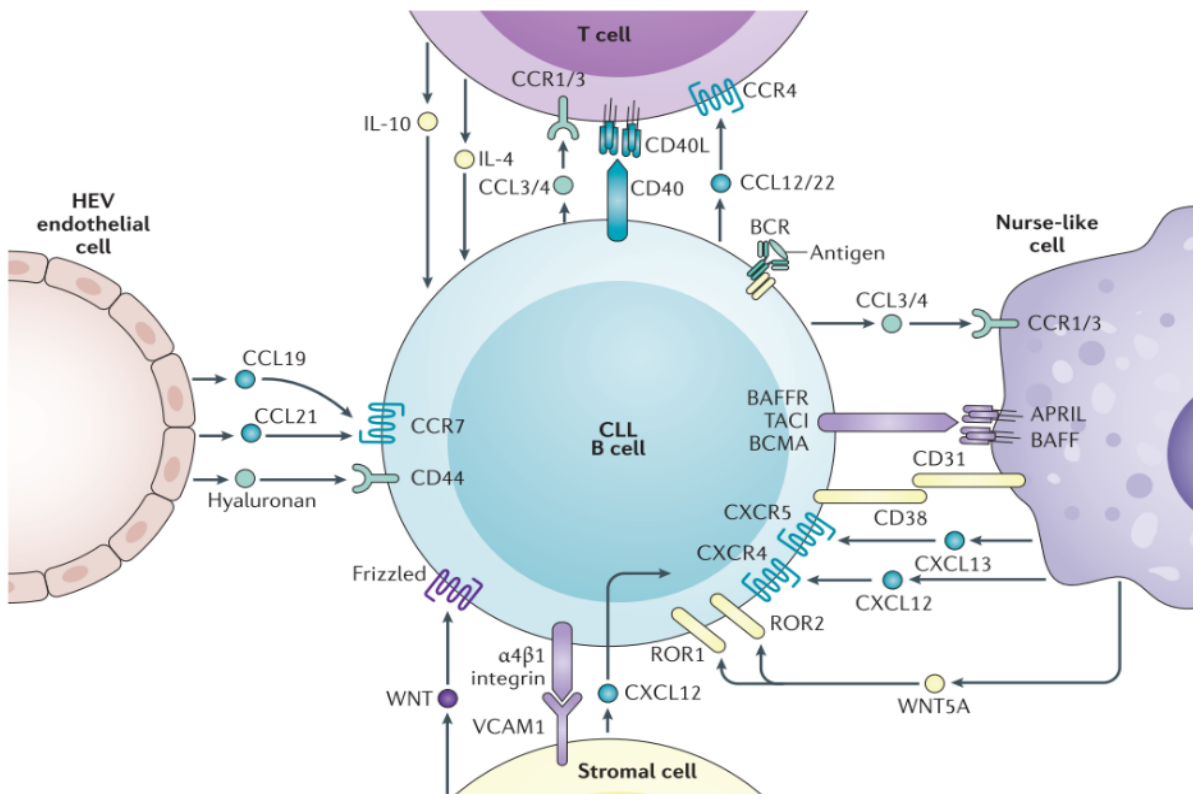


Fig. 3 Microambiente tumoral en la LLC. Células como NLCs, células mesenquimales estromales, Linfocitos T y células endoteliales forman parte del microambiente tumoral en la LLC, las cuales ya sea por interacción directa o por secreciones de citocinas y quimiocinas envían señales de supervivencia y proliferación al clon tumoral. (Kipps et al., 2017).

2.1.1 Células ‘Nurse-like’ y células estromales mesenquimales en la LLC.

Las NLCs son células de origen monocítico, las cuales espontáneamente se diferencian *in vitro* a partir de monocitos provenientes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con LLC, e *in situ* pueden ser encontradas en OLS (Burger et al., 2000). Las NLCs inducen quimiotaxis de las células leucémicas a través de la secreción de

quimiocinas como CXCL12 (Burger et al. 2000) y CXCL13 (Bürkle & Niedermeier 2007), las cuales atraen a las células de LLC al microambiente. Además de secretar estas quimiocinas, las NLCs estimulan la supervivencia de las células leucémicas mediante la expresión del factor activador del linfocito B (BAFF) y el ligando inductor de proliferación (APRIL) (Tsukada et al., 2002). Deaglio y col. describieron que las NLCs al expresar el ligando CD31 interactúan con CD38 (Deaglio et al., 2005), un receptor presente en la célula tumoral y cuya alta expresión se ha asociado a peor pronóstico (Damle et al., 1999; Ibrahim et al., 2001; Morabito et al., 2001). Por otro lado, Burger y col. describieron que las NLCs son capaces de activar al BCR y a la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B) en células de LLC cuando son puestas en co-cultivo (Burger et al., 2009). Estudios adicionales han mostrado que los monocitos protegen a las células de LLC de la apoptosis *in vitro*, a través de la secreción de CD14 soluble, el cual activa NF- κ B (Seiffert et al., 2010).

En cuanto a las MSCs, se conoce que son cruciales durante la linfopoyesis B así como durante la formación de los centros germinales. En el contexto de la LLC, se ha demostrado que las células leucémicas son protegidas de la apoptosis espontánea o inducida por drogas a través del contacto directo con MSCs de MO (Lagneaux et al., 1998; Kurtova et al., 2009), las cuales además son capaces de alterar la arquitectura normal del tejido (Janel et al., 2014). Las MSCs constitutivamente secretan quimiocinas como CXCL12, que promueven el tráfico de células tumorales a los OLS y proveen señales adicionales que soportan la supervivencia del clon tumoral (Burger et al., 1999, Burger et al., 2009). La adhesión generada a través de la unión de la integrina VLA-4 ('very late antigen 4') con su ligando VCAM-1 ('vascular cell adhesion molecule 1') presente en las MSCs de la MO favorece las interacciones entre las células de LLC y el estroma con subsiguiente desregulación de la proteína anti-apoptótica MCL-1 ('myeloid cell leukemia 1') (Kurtova et al. 2009) y el proto-oncogén *TCL1* ('T-cell leukemia/lymphoma 1') (Sivina et al. 2012). Aparte de modular estas moléculas, se ha demostrado también que el co-cultivo de células de LLC con MSCs de MO inducen la sobreexpresión de marcadores de una enfermedad agresiva, incluyendo ZAP70 y CD38, así como la disminución en la expresión de CXCR4 (Purroy et al., 2015) y CD20, este último con implicaciones en la resistencia al tratamiento con anti-CD20 (Marquez et al., 2015).

En resumen, las NLCs y las MSCs tienen un efecto sobre el tráfico de LB leucémicos a los OLS, así como en la estimulación de actividad anti-apoptótica, por lo que la combinación de estos dos tipos celulares genera un ambiente que contribuye a la supervivencia de las células leucémicas de LLC y a la resistencia al tratamiento.

2.1.2 Linfocitos T en el microambiente leucémico.

Interacciones entre LB expresando CD40 y el ligando CD40 (CD40L) presente en linfocitos T (LT) activados, son críticas en el contexto de la presentación de antígenos y la inducción de la respuesta B en condiciones normales (van Kooten and Banchereau, 2000). Similarmente, la activación de células de LLC mediada por CD40 promueve la sobrevivencia del clon tumoral y la progresión de la enfermedad (Ghia et al, 2008). Diversos trabajos sugieren la existencia de un diálogo bidireccional entre las células B de LLC y las células T CD4^{pos}, generado por moléculas de adhesión y quimiocinas que inducen la expresión de varias citoquinas en ambos tipos de células (Caligaris-Cappio, 2003). Las células T inhiben la apoptosis en el linfocito B leucémico a través de la producción de Interleuquina 4 (IL4), interferón γ (INF γ) e interleuquina 2 (IL2), las cuales inducen la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL-2 (Caligaris-Cappio, 2003).

La unión de CD40-CD40L desencadena un conjunto de señales que permite la activación de ciertas vías de señalización JAK-STAT, así como del factor de transcripción NF-kB. La vía JAK3-STAT3 induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas como BCL-XL y MCL-1 (De Toteró et al., 2006), mientras que la activación de NF-kB afianza la expresión de AID, generada por IL-4 (Zhou et al., 2003). Además, promueve la migración de las células B leucémicas a través de la proteína CD49d (Shachar & Harán, 2011).

A pesar de que ha sido ampliamente demostrado la importancia de las señales recibidas a través de la vía CD40L por parte del clon leucémico, numerosos resultados han reportado que, si bien en la LLC el número absoluto de LT circulantes está aumentado, su funcionalidad pareciera estar comprometida (Riches & Gribben, 2013). Brusa y col. reportaron una asociación entre estados más avanzados de la enfermedad y el incremento tanto de células memoria CD4^{pos} como de linfocitos CD8^{pos} terminalmente diferenciados (Brusa et al., 2013). Además, estas células presentan alteraciones para formar sinapsis inmunológica (Ramsay et al., 2008), mostrando reducida motilidad mediada por GTPasas Rho (Ramsay et al., 2013) y aumento en la expresión de marcadores de agotamiento celular, incluyendo la proteína de muerte celular programada (PD-1) (Brusa et al., 2013; Riches et al., 2013), lo cual se correlaciona con elevada expresión del ligando PD-1 (PD-L1) en células de LLC.

2.1.3 Células endoteliales y células dendríticas foliculares en la LLC.

Elementos adicionales en el microambiente de la LLC, incluye a las células endoteliales y a las células dendríticas foliculares (FDCs), las cuales son esenciales para el tráfico y retención de células leucémicas en los OLS (Hacken and Burger, 2017). Si bien, la migración de las células de LLC hacia los NLS es mediada en gran parte por la interacción CXCR4-CXL12, se ha descrito

también que CCL19 y CCL21 secretada por las células endoteliales tienen un rol en la quimiotaxis a través del receptor CCR7 presente en la célula leucémica (Kipps et al., 2017). De forma más directa, las células de LLC se unen a través de endotelina 1, presente en la superficie del LB leucémico, al receptor de endotelina A (ETAR) en las células endoteliales, promoviendo así la supervivencia de la célula tumoral y la resistencia a drogas (Maffei et al., 2014).

Por su parte, la interacción recíproca entre la célula de LLC y las FDCs a través de CXCR5-CXCL13 es esencial para el posicionamiento del LB tumoral dentro de los pseudofolículos, así como para la progresión *in vivo* del modelo murino de LLC E μ -TCL1 (Heinig et al., 2014). Además, co-cultivos de FDCs con células de LLC inhibe la apoptosis espontánea de la célula leucémica a través de un contacto directo dependiente de la ligación de CD44, con la subsecuente sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica MCL-1 (Pedersen et al., 2002).

2.2 Poblaciones Proliferantes en la LLC

Si bien la LLC se caracteriza por la acumulación lenta y progresiva de LB quiescentes, un estudio publicado en 2005 por Messmer y col. mostró que dentro del clon tumoral existe un 0,1-1% de células que proliferan activamente (Messmer et al., 2005). Esta proliferación celular es consecuencia de una estrecha comunicación bidireccional entre el LB leucémico y células no B en los CPs.

En la actualidad, múltiples fracciones proliferantes (FPs) han sido descritas en la LLC. En el 2007, Damle y col. proponen que existe un sub-grupo de células leucémicas expresando CD38 con alta capacidad de proliferar y que su presencia se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad (Damle et al., 2007). En el 2010, nuestro grupo describe en el seno de pacientes IgVH No Mut, una segunda FP caracterizada por la expresión simultánea de inmunoglobulinas clonales IgM e IgG y altos niveles de la enzima AID (Palacios et al., 2010). Posteriormente, en el 2011 Calissano y col. plantean un modelo donde la subpoblación tumoral proliferante expresa altos niveles de CD5 y baja expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 (Calissano et al. 2011). Y más recientemente, en el 2014 Huemer y col., muestran que dentro de la FP $CXCR4^{low}/CD5^{high}$ existen una subpoblación que son CD86^{pos} las cuales constituyen una fracción que recién ha migrado de un nicho linfóide y presentan la mayor diversidad genética sub clonal (Huemer et al. 2014).

De manera interesante, las subpoblaciones proliferantes descritas por Palacios, Calissano y Huemer presentan alta expresión de la enzima AID (Palacios et al., 2010; Patten et al., 2012; Huemer et al., 2014). Esto muestra la importancia que tiene para la célula leucémica la interacción con su microambiente, entre ellos con los LT, los cuales a través de la secreción de citocinas como IL-4 o la unión CD40-CD40L promueve la proliferación celular y expresión de AID

(Zhou et al., 2003). En condiciones fisiológicas esta enzima se expresa en LB durante su paso por el centro germinal, y es responsable de los procesos de hipermutación somática (HMS) y cambio de clase (CC) que permiten generar la diversidad de anticuerpo (Muramatsu et al., 2000). Sin embargo, dado a su acción mutagénica, una expresión aberrante de esta enzima se asocia a la generación de síndromes linfoproliferativos (Pérez-Duran et al., 2007) y en el caso específico de la LLC, alta expresión de AID ha sido descrita en pacientes de mal pronóstico (Oppezzo et al., 2003; McCarthy et al., 2003; Albesiano et al., 2003).

2.2.1 Población Proliferante CD38^{POS}

CD38 es una proteína de transmembrana que en condiciones fisiológicas se expresa en altos niveles en progenitores de células B, en LB presentes en los centros germinales y en células plasmáticas. Su ligando mayormente conocido y ampliamente estudiado es CD31, presente en una variedad de células, entre ellas las NLCs, LT y ECs. En la LLC la interacción CD38/CD31 activa vías involucradas en la proliferación y migración de la célula leucémica (Deaglio et al., 2010).

Desde finales del siglo pasado varios grupos han demostrado que existe una asociación entre la alta expresión de CD38($\geq 30\%$) y un curso clínico más agresivo en la LLC (Damle et al., 1999; Ibrahim et al., 2001; Morabito et al., 2001). Calissano y col. mostraron enriquecimiento del marcador de proliferación celular Ki-67 en la subpoblación tumoral CD38^{POS} en comparación con su contraparte CD38^{NEG} (Calissano et al., 2009). Se ha descrito también que células B CD38^{POS} responde mejor a las señales del BCR y que expresan altos niveles de CD69 y HLA-DR, ambos indicativos de reciente activación (Damle et al., 2007). Además, se ha demostrado que las células de LLC CD38^{POS} tienen una mayor capacidad de migrar en respuesta a CXCL12 (Lanham et al., 2003). Estudios *in vitro* en el mismo sentido muestran que la activación de CD38 lleva a la proliferación y quimiotaxis de células de LLC a través de ZAP-70 y la vía de señalización ERK1/2 (Calissano et al., 2009).

En el 2007, Pepper y col. demostraron que células CD38^{POS} purificadas de pacientes con LLC tienen un fenotipo distinto a las CD38^{NEG}, estas características biológicas incluyen, resistencia a la muerte celular, lo cual es asociado a la sobre-expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), así como incremento de los receptores VEGF y de la proteína anti-apoptótica MCL-1 (Pepper et al., 2007; Mirshahi et al., 2006). Posteriormente, los mismos autores hipotizaron que esta subpoblación al tener aumentada la tasa de proliferación celular podrían tener una mayor evolución clonal, con acumulación de mutaciones o alteraciones citogenéticas que favorecieran al clon tumoral. Sin embargo, después de 2 años de seguimiento, el porcentaje de frecuencia de evolución clonal detectado fue el mismo para ambas poblaciones (CD38^{POS} y CD38^{NEG}). Además se demostró que, si bien la población CD38^{POS} tiene mayor actividad de la

telomerasa, ambas poblaciones mostraron telómeros de igual longitud, indicando que tienen aproximadamente el mismo número de divisiones (Lin et al., 2008).

Estos resultados indican que las células leucémicas CD38^{pos} constituyen una población heterogénea, donde si bien hay una fracción de estas células que presentan un incremento en el potencial proliferativo, no todas están realizando una proliferación efectiva, ya que, de acuerdo con los datos publicados por Messmer y Col. solo entre 0,1%-1% de células proliferan en la LLC.

2.2.2 Población Proliferante IgM^{pos}/IgG^{pos}

En el 2010 nuestro grupo describió una subpoblación de linfocitos B que presenta un activo cambio de clase (CC) en pacientes con IgVH No Mut y con pronóstico desfavorable. Esta subpoblación tumoral presenta alta expresión de la enzima mutagénica AID, así como del marcador de proliferación celular KI-67, el oncogén C-MYC y la proteína antiapoptótica BCL-2, (Palacios et al., 2010). Además de la presencia de AID y de las moléculas descritas anteriormente, Palacio y col. reportaron que esta subpoblación IgM^{pos}/IgG^{pos}/AID^{pos} expresa moléculas involucradas en la interacción del LB tumoral con su microambiente, tales como CD49d y las quimiocinas CCL3 y CCL4, lo cual estaría sugiriendo que esta subpoblación ha estado en contacto reciente con un microambiente activado.

Posteriormente, Palacios y col. evaluaron el transcriptoma y microARNoma, tanto de la fracción proliferante (IgM^{pos}/IgG^{pos}/AID^{pos}) como de la quiescente (IgM^{pos}/IgG^{neg}/AID^{neg}). Los resultados obtenidos sugieren que la proliferación de esta sub-población está relacionada con la sobreexpresión del miR-22, el cual estaría actuando como molécula clave en la regulación de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/AKT mediante regulación negativa de PTEN ('phosphatase and tensin homolog') en células B de pacientes con LLC (Palacios et al., 2014). La activación de esta vía se asocia con la translocación del factor de transcripción FOXO1 al citoplasma lo cual conlleva a su degradación, a la sobreexpresión de survivina y a la disminución de p-27. Finalmente, a través de estudios de transfección mostraron que esta vía puede desencadenarse por señales del microambiente como CD40L/IL-4. Y más aún que, esta regulación también está presente en los nódulos linfáticos de pacientes IgVH No Mut con progresión de la enfermedad (Palacios et al., 2014).

Una observación importante sobre esta FP radica en el hecho de que si bien el clon IgG parece ser la fracción más proliferante, la mayoría de los pacientes con LLC presentan expansión de un clon tumoral IgM^{pos} y no IgG. En la práctica son pocos los pacientes que exhiben un clon IgG, y estos por lo general tienden a tener un re-arreglo génico VH4-34, con un perfil IgVH Mut y una enfermedad estable (Kipps et al., 2017). Por lo que una pregunta válida es ¿qué les pasa a

las células proliferantes IgM^{pos}/IgG^{pos} a lo largo de la evolución de la enfermedad? La respuesta exacta a esta pregunta es desconocida, pero es muy probable que esta subpoblación tumoral muera una vez que es liberada del NL a SP, ya sea por privación de factores que soporten su supervivencia o por acumulación de daños en el ADN que conlleven a la muerte de éstas.

2.2.3 Población Proliferante CXCR4

Calissano y col. profundizaron en la caracterización de las poblaciones proliferantes en la LLC usando diferencias en la densidad de expresión de moléculas de superficie como CD5, el cual es sobre-expresado luego de la activación del BCR, y CXCR4, un receptor involucrado en mantener el contacto entre la célula B y las células estromales en los órganos linfoides secundarios. Para ello, evaluaron *in vivo* la cinética de división celular del LB leucémico a través de la medición de la incorporación de deuterio en el ADN. Los autores mostraron que existen dos grupos bien diferenciados, donde aquellas células con baja expresión de CXCR4 y alta expresión de CD5 (CXCR4^{low}/CD5^{high}) contenían más ADN con deuterio, en comparación con aquellas expresando CXCR4 alto y CD5 bajo (CXCR4^{high}/CD5^{low}), indicando así que la subpoblación CXCR4^{low}/CD5^{high} ha proliferado. Además, esta observación fue confirmada por la expresión de KI-67 y MCM6, ambas moléculas presentes desde la fase G1 a la M del ciclo celular (Calissano et al., 2011). En este estudio, se llegó a la conclusión que la expresión diferencial de ambos marcadores son consecuencia de la activación del BCR, en donde la baja expresión de CXCR4 es debido a la internalización del receptor posterior a un evento de activación, y por lo tanto de un pasaje reciente desde un órgano linfoide hacia la SP. En la **Fig. 4** se resume el proceso de recirculación propuesto por los autores para las células de LLC. Por otro lado, Calissano y col. aislaron ambas fracciones celulares del mismo paciente y compararon el perfil de expresión génica, lo cual arrojó que la FP presenta una sobre-expresión de genes relacionados con la proliferación celular, anti-apoptosis y genes involucrados en el daño oxidativo en comparación con las células quiescentes (FQ) (Calissano et al., 2011).

Posteriormente, Patten y col. mostraron que la FP CXCR4^{low}/CD5^{high} presenta alta expresión de la enzima AID y que su expresión se asocia a peor pronóstico y alteraciones citogenéticas adversas. Mediante experimentos *in vitro* mostraron que esta enzima es funcional tanto en muestras de pacientes con IgVH Mut como No Mut, dado que bajo la estimulación de CD40L e IL-4, las células proliferantes presentaron más DSBs y CC (Patten et al., 2012). Estos datos concuerdan con lo descrito por Palacios y col. donde encontraron mayor expresión de AID en la FP IgM+/IgG+, sugiriendo así que AID está jugando un rol fundamental en un microambiente tumoral activado y que podría estar involucrada en la evolución clonal de la enfermedad.

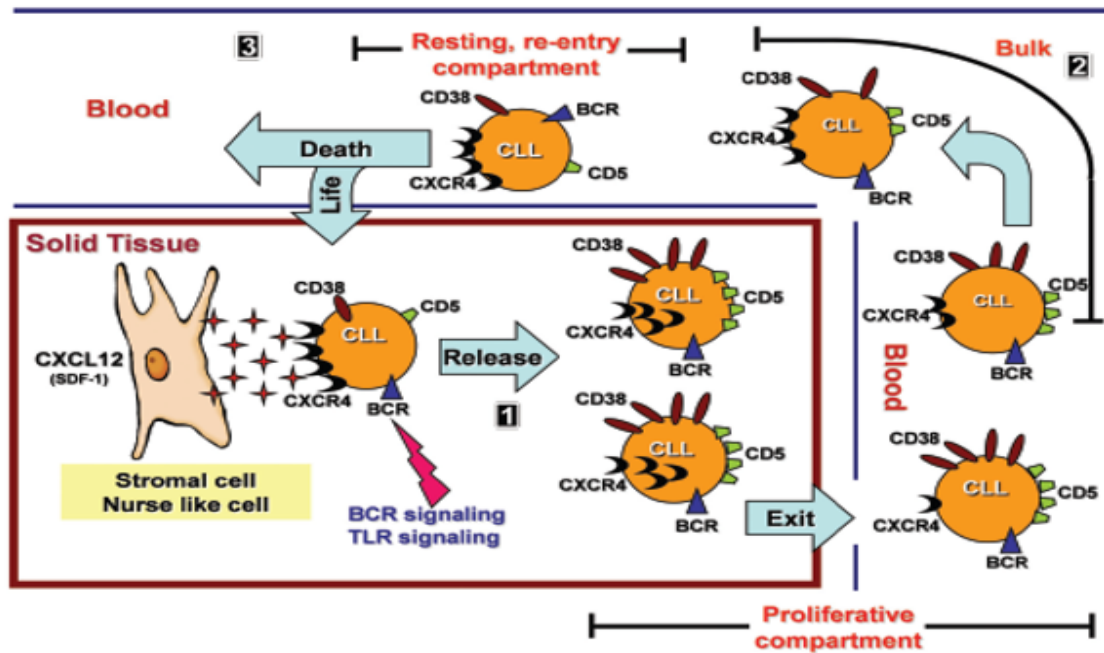


Fig.4 Modelo hipotético del ciclo de vida de una célula B de LLC. Las células de LLC son atraídas a los OLS por diferentes estímulos, entre ellos la interacción CXCR4-CXCL2. Una vez en el estroma son activadas a través del BCR o TLR, lo que ocasiona sobre-expresión de CD5 e internalización de CXCR4 para luego ser liberadas a SP. Con el pasar del tiempo y posiblemente por la carencia de señales del microambiente, las células comienzan a re-exresar CXCR4 y disminuye la expresión de CD5. Estas células pueden seguir el gradiente de CXCL12 y entrar nuevamente al estroma, o continuar circulando y morir (Calissano et al., 2011).

2.2.4 Población Proliferante CD86^{pos}

En el 2014, Huemer y col. describieron una población celular caracterizada por la expresión de la molécula de superficie CD86, con alta expresión de Ki-67 y AID, y que se superpone con la sub-población CXCR4^{low}/CD5^{high} descrita por Calissano. Además, las células CD86^{pos} presentan señales de daño en el ADN que, según los autores, podrían ser originadas por la acción de la enzima mutagénica AID. Por otro lado, mostraron que esta subpoblación en SP es un marcador predictivo independiente para determinar el tiempo de inicio del tratamiento ('Time to first Treatment' TFT) tanto en pacientes con IgVH Mut como No Mut, por lo que sostienen que AID es activa, independientemente del estado mutacional IgVH (Huemer et al. 2014).

2.3 Rol de AID en la LLC

Como se mencionó anteriormente, en condiciones fisiológicas, AID se expresa en LB activados y es responsable de los procesos HMS y CC, implicados en la generación de la diversidad de anticuerpos. Dicho rol fue demostrado *in vivo* por la ausencia de ambos eventos en ratones AID^{-/-} (Muramatsu et al., 2000). Si bien su actividad en el ADN del linfocito B permite un mejor

reconocimiento y procesamiento del antígeno, debido a su acción mutagénica, presenta también un “lado oscuro” a través de la generación de mutaciones fuera de los genes de inmunoglobulinas (Kinoshita & Nonaka, 2006). AID es capaz de mutar oncogenes, y se le ha relacionado con la generación de translocaciones en linfomas de células B (Duquette et al., 2005; Pérez-Durán et al., 2007; Robbiani et al., 2009).

En la LLC, además de la asociación de AID con las poblaciones proliferantes, su implicancia en esta leucemia ha sido abordada por diferentes grupos desde que su expresión fuese detectada en muestras de pacientes con LLC (Oppezzo et al., 2003; McCarthy et al., 2003; Albesiano et al., 2003). Oppezzo y col. describieron que individuos con IgVH No Mut no presentan evidencia alguna de HMS a pesar de la expresión de AID, pero éstos si tienen mutaciones en las regiones pre-switch, así como actividad de CC. Esto muestra una clara disociación entre los 2 eventos, y sugiere además que AID estaría requiriendo de uno o más cofactores para llevar a cabo el proceso de HMS en esta leucemia (Oppezzo et al., 2003; Oppezzo & Dighiero, 2005). Por otro lado, diversos estudios han mostrado una asociación entre la expresión de AID y la presencia de aberraciones cromosómicas de mal pronóstico en la LLC (Heintel et al., 2004; Leuenberger et al., 2010; Patten et al., 2012; Gelmez et al., 2014).

Al presente, las implicancias directas de AID en el origen y la progresión de la LLC continúan sin ser claramente establecidas. Sin embargo, recientes esfuerzos de nuestro laboratorio en colaboración con el grupo del Dr. Chiorazzi, han demostrado que la sobreexpresión de AID en el modelo doble transgénico AID/Eu-TCL1 conlleva a una leucemia más agresiva y sobrevidas más cortas (Morande et al, iwCLL2019; artículo en revisión). Estos datos proponen un rol directo de AID asociado con la evolución de la enfermedad y confirman las observaciones realizadas previamente en humanos.

3. Mecanismos de resistencia a la muerte celular regulada

En la LLC el microambiente tumoral no solo genera señales de proliferación, sino también de sobrevida a través de la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas, por lo que similar a lo que ocurre en otras neoplasias, una alteración de la homeostasis entre estos dos procesos es lo que podría definir el curso de la enfermedad.

3.1 Apoptosis

La apoptosis es una forma altamente regulada de muerte celular que juega un rol esencial en la embriogénesis, en el desarrollo de tejidos, en la inmunidad y en el mantenimiento de la homeostasis. Sin embargo, cuando este proceso es deficiente o se produce en exceso puede dar paso a una variedad de patologías, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, desórdenes

inmunológicos o cáncer (Kerr et al., 1972; Perini et al., 2018). La maquinaria apoptótica comprende 2 principales vías de activación (la extrínseca y la intrínseca) y una fase de ejecución, ambas mediada por proteasas de la familia caspasa (Shi et al., 2002).

La vía extrínseca involucra a moléculas localizadas en la superficie celular, tales como receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) o Fas, los cuales tras la unión con su ligando promueven la activación de caspasa 8. Por su parte, la vía intrínseca (también conocida como vía mitocondrial) es regulada por la familia de proteínas BCL-2 e integra varias señales intracelulares donde la disrupción de la integridad mitocondrial es un paso crucial (Shi et al., 2002). Ambas vías culminan en la activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7.

La activación de la apoptosis puede ser desencadenada por una variedad de estímulos, tanto fisiológicos como patológicos, en el caso específico de la vía mitocondrial su activación es dada por diferentes formas de estrés celular, tales como daño en el ADN, estrés oxidativo, radicales libres, pérdida de señales de supervivencia, entre otros. De igual forma, es la vía que se activa cuando se usa quimioterapia y radiación para el tratamiento de neoplasias malignas (Perini et al., 2018). En la siguiente figura se resumen las vías de señalización de la apoptosis (**Fig. 5**).

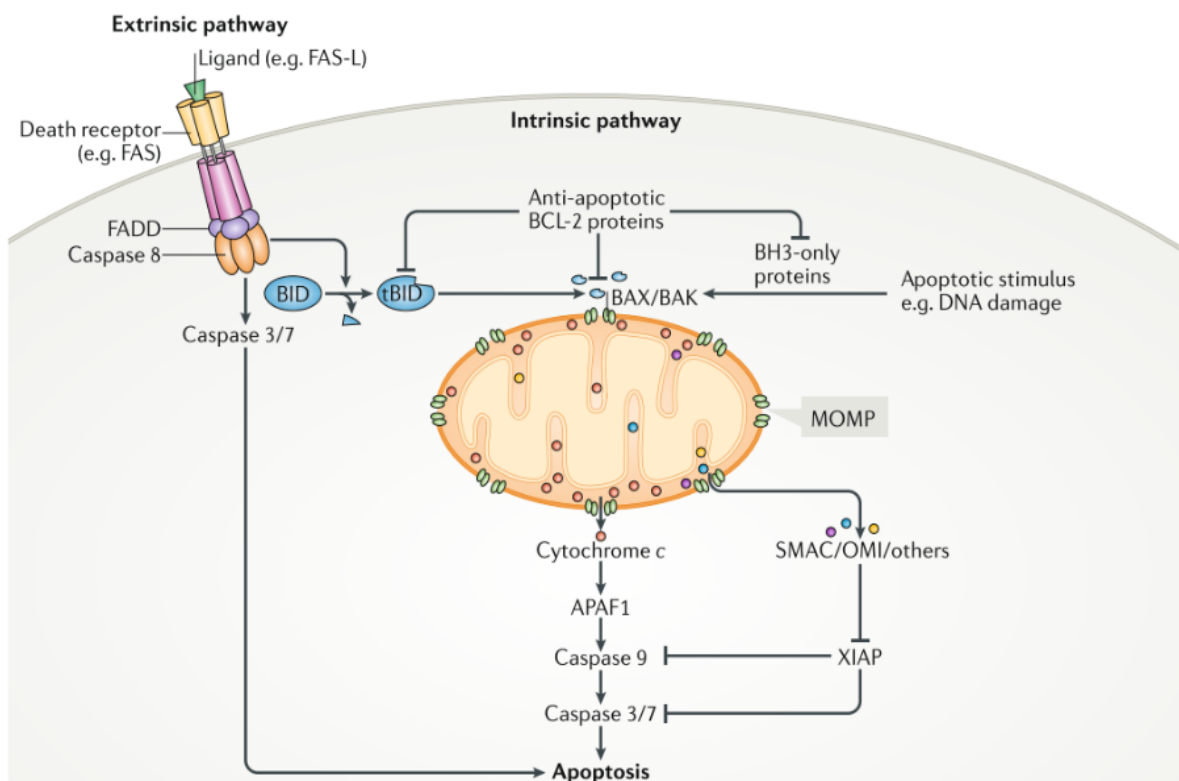


Fig. 5 Señalización de la apoptosis. La apoptosis puede ocurrir a través de dos vías. La vía extrínseca es mediada por miembros de la superfamilia del receptor de TNF, los cuales tras la unión con su ligando inducen la dimerización de caspasa

8, que luego activa a las caspasas ejecutoras 3 y 7. Por su parte, la vía intrínseca es inducida por una variedad de estímulos que conllevan a la activación de las proteínas BH3, éstas tienen doble efecto, inhibir a las proteínas anti-apoptóticas y activar a BAX y BAK, éstos últimos tras su oligomerización producen MOMP que permite la liberación del citocromo c, el cual se une a la proteína activadora de apoptosis 1 (APAF-1) y a pro-caspasa 9 para formar el apoptosoma. Posteriormente, se produce el clivaje de pro-caspasa 9, generando la activación consecuyente de las caspasas efectoras 3, 6 y 7, que luego actúan sobre un complejo de DNAsas activado por caspasa (CAD), cuyo resultado final es la apoptosis. Las caspasas pueden ser inactivadas por inhibidores endógenos de la apoptosis (Ej. XIAP). Para prevenir estos la mitocondria libera factores como SMAC y OMI que antagonizan estas señales (Bock & Tait, 2019).

3.1.1 Familia de proteínas BCL-2 como “switch” entre la supervivencia y muerte celular.

La familia BCL-2 comprende miembros tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos, y de acuerdo con su estructura y función pueden ser agrupados de la siguiente manera:

1. Proteínas anti-apoptóticas: Este grupo está representado en humanos por las proteínas BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BFL-1/A1, MCL-1 y BCL-B.
2. Los miembros pro-apoptóticos pueden ser divididos en 2 subfamilias:
 - a) Efectores pro-apoptóticos con multidominios: BAK y BAX.
 - b) Proteínas que sólo tienen el dominio BH3 (proteínas BH3): BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, PUMA Y NOXA.

Las proteínas anti-apoptóticas previenen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) a través de 2 mecanismos: uniéndose y secuestrando a las formas activas de BAK y BAX, o secuestrando a las proteínas BH3 (Perini et al., 2018). Todas las proteínas anti-apoptóticas se unen a BAX, pero solamente BCL-XL y MCL-1 pueden secuestrar a BAK (Adams & Cori, 2007). Por su parte, las proteínas BH3 pueden iniciar apoptosis, ya sea directamente activando a BAX y BAK o contrarrestando la actividad de las proteínas anti-apoptóticas al unirse a su surco hidrofóbico (Lessene et al., 2008). Las proteínas BH3 cuando son activadas generan un cambio conformacional en BAX y BAK, permitiendo su homodimerización y la inducción de MOMP (Cheng et al., 2001). Además, numerosas señales pueden interferir indirectamente con la apoptosis, entre ellos la vía NF- κ B activa la transcripción de proteínas anti-apoptóticas, tales como MCL-1 e inhibidores endógenos de la apoptosis (IAPs); y la vía PI3K/AKT es capaz de fosforilar a BAD. Por el contrario, la vía de p53 estimula la transcripción de proteínas pro-apoptóticas como PUMA y NOXA (Billard, 2013).

Alteración en la expresión de miembros de la familia BCL-2 es observada en una variedad de neoplasias, incluyendo enfermedades linfoproliferativas y tumores sólidos. La proteína BCL-2 fue implicada por primera vez en cáncer al conocerse su participación en la translocación entre los cromosomas 14 y 18 que ocurre en gran parte de los linfomas foliculares (Cory and Adams, 2002).

3.1.2 Desbalance en la expresión de proteínas de la familia BCL-2 es un sello distintivo en la LLC

Las células de LLC detenidas en la fase G0/G1 del ciclo celular tienden a acumularse en SP y OLS. Sin embargo, una vez que éstas son removidas del paciente y puestas en cultivo experimentan apoptosis espontánea en un periodo de tiempo corto, lo cual sugiere que el microambiente tumoral no solo genera señales de proliferación, sino también de sobrevida (Caligaris-Cappio et al., 2003). En línea con esto, Herishanu y col. describieron una mayor expresión de genes anti-apoptóticos en el NLS en comparación con SP y MO, y que dicho desbalance dependía de la activación de la vía NF-kB (Herishanu et al., 2011). Además, en pacientes con estados avanzado de Binet, BCL-2 y MCL-1 están sobre expresados, mientras que la expresión de BAX es significativamente menor (Pepper et al., 2008). La disminución de BAX se asocia, además con eventos citogenéticos adversos, como del17p y del11q, lo cual es consistente con datos que demuestran que BAX es transcripcionalmente regulado por la vía p53/ATM. Por otro lado, Paterson y col. mostraron fosforilación de BIM tras la activación del BCR, sugiriendo que esta proteína BH3 podría servir para coordinar señales de sobrevida mediada por el microambiente (Paterson et al., 2012).

La sobreexpresión de la proteína BCL-2 en la LLC fue originalmente atribuida a hipometilación en la región promotora de su gen (Hanada et al., 1993). Sin embargo, con el descubrimiento de los microRNAs (miRNAs), se demostró que el miR-15 y el miR-16 regulan negativamente a BCL-2, pero éstos están frecuentemente suprimidos o disminuidos en pacientes con LLC, especialmente en aquellos con del13q (Calin et al., 2002; Cimmino et al., 2005). En el mismo sentido, múltiples estudios han asociado la disminución de los miR-181a y miR-181b con aumento en la expresión de BCL-2, MCL-1 y XIAP durante la progresión de la enfermedad (Visone et al., 2011; Zhu et al., 2012). Zhu y col., utilizando células primarias de LLC lograron demostrar que los miR-181a/miR-181b son capaces de unirse a la región 3' UTR de BCL-2, MCL-1 y XIAP, produciendo así su inhibición. Por otro lado, ha sido identificado un polimorfismo G(-248)A en el promotor del gen BAX, lo cual resulta en baja expresión de la proteína BAX, un incremento de la relación BCL2/BAX y una sobrevida global menor (Starczynski et al., 2005).

Adicionalmente, otras vías de señalización han sido implicadas en la regulación positiva de proteínas anti-apoptóticas, entre ellas PI3K/AKT, activación del BCR y CD40L (Petlickovski et al., 2005; Willimott et al., 2007; Longo et al., 2008). Aunado a esto, inhibición de NF-kB resultó en reducción de BCL-2 y MCL-1, sugiriendo que esta vía contribuye al mantenimiento en la expresión de ambas proteínas (Hewamana et al., 2008). Dado que MCL-1 presenta una vida media muy corta (1-2 horas) y que las probabilidades de una recirculación tan frecuente a los NLS son bajas, es posible que las células de LLC reciban estimulación a partir de citocinas y quimiocinas circulantes, o a través del contacto células-células en el endotelio vascular. En este

sentido, Pepper y col. mostraron que las células de LLC CD38+ tienen mayor expresión de VEGF, lo cual sugiere que existe una retroalimentación autocrina positiva, donde la fosforilación del receptor de VEGF genere aumento de MCL-1 (Pepper et al., 2007). Claramente, los mecanismos biológicos que regulan la apoptosis en la LLC son complejos, pero la sobre expresión de BCL-2 y MCL-1 es una característica distintiva en esta leucemia.

3.1.3 BCL-2 como blanco terapéutico

El primer agente usado clínicamente para reducir proteínas anti-apoptóticas fue un oligonucleótido anti-sentido de 18 bases complementarias a los seis primeros codones del RNA mensajero (RNAm) del gen BCL-2, el cual en estudios preclínicos mostró disminución de la expresión de BCL-2, aumento de BAX e incremento en la apoptosis (Cotter, 1997). Sin embargo, cuando se comparó con quimioterapia en ensayos clínicos, no mostró aumento significativo en la supervivencia de pacientes con LLC (O'Brien et al., 2009). Posteriormente, comenzó la era de los compuestos que mimetizan la actividad natural de las proteínas BH3, el primero de estos fue el ABT-737 que se une con alta afinidad (< 1 nmol/L) al surco de unión BH3 de las proteínas BCL-XL, BCL-2 y BCL-W (Petros et al., 2006). Aunque el tratamiento con ABT-737 induce apoptosis masiva en diferentes líneas celulares derivadas tanto de tumores sólidos como de leucemia y linfomas, su uso a nivel clínico se vio limitado por su baja solubilidad, lo cual generó imposibilidad del que el compuesto fuese biodisponible oralmente (Perini et al., 2018). Para solucionar este inconveniente, fue desarrollado ABT-263 (Navitoclax), el cual tiene los mismos blancos que el ABT-737, pero además se puede administrar vía oral. Navitoclax mostró actividad *in vitro* sobre un panel bastante amplio de tumores. Además, experimentos *in vivo* con este inhibidor revelaron una respuesta rápida y completa en diferentes modelos tumorales (Tse et al., 2008). A pesar de los resultados prometedores, su uso clínico se vio restringido por sus efectos sobre las plaquetas, las cuales expresan altos niveles de BCL-XL, generando así trombocitopenia como efecto secundario (Wilson et al., 2010).

Usando ingeniería reversa se creó ABT-199 (Venetoclax), el cual es un potente inhibidor de la proteína BCL-2, mientras que la interacción con BCL-XL y BCL-W es muy baja (Souers et al., 2013). Al unirse a BCL-2, Venetoclax bloquea el secuestro de BIM mediado por BCL2, y éste al ser liberado es capaz de activar a BAX/BAK llevando a la vía intrínseca de la apoptosis. Dado que, venetoclax actúa río abajo de varias vías claves en la supervivencia de la célula leucémica es capaz de inducir apoptosis independiente del estado de *TP53* (Anderson et al., 2016). Múltiples estudios clínicos han evaluado el uso de venetoclax solo o en combinación con otros agentes para el tratamiento de LLC, mostrando en todos superioridad y aumento de la SLP, incluso en aquellos pacientes con enfermedades refractarias y alteraciones citogenéticas adversas (Roberst et al., 2016; Stilgenbauer et al., 2016; Seymour et al., 2018; Flinn et al., 2019). Lo que conllevó a que

en el 2016 la FDA aprobara el uso de venetoclax como agente simple en el tratamiento de la LLC refractaria o en recaída con del17p o mutación en *TP53* (Stilgenbauer et al., 2016).

Además, la combinación de Venetoclax con un anti-CD20 ha dado resultados muy favorables. El estudio clínico MURANO donde se comparó Venetoclax + Rituximab versus CIT (Bendamustina + Rituximab) en pacientes con LLC refractaria, mostró una SLP a 2 años de 84,9% en los pacientes que recibieron Venetoclax + Rituximab, frente a un 36,3% del otro brazo del ensayo (Seymour et al., 2018). A partir de este estudio se incluyó el uso de venetoclax en LLC refractarias o en recaída (R/R), independientemente del estado de *TP53* (Ryan and Davids, 2019). De igual manera, el estudio CLL14 investigó la combinación de venetoclax con obinutuzumab (un anti-CD20 de segunda generación) versus obinutuzumab con clorambucilo en pacientes con LLC sin tratamiento previo, mostrando que la SLP a 24 meses fue significativamente más alta en el grupo Venetoclax-Obinutuzumab (88,2%) en comparación con Clorambucilo-Obinutuzumab (64,1%) (Fisher et al., 2019), de esta manera en el 2019 la FDA aprueba el uso de esta combinación como primera línea de tratamiento en la LLC (Ryan and Davids, 2019).

A pesar del que el tratamiento con Venetoclax ha logrado respuestas importantes y duraderas en muchos pacientes, cada vez con más frecuencia se reportan nuevos mecanismos de resistencia. En este sentido, dos estudios independientes en pacientes que desarrollaron refractariedad al venetoclax identificaron la presencia de mutaciones en el sitio de unión de la droga (Blombery et al, 2019; Taush et al., 2019). De igual manera, Guieze y col. describieron mutaciones en los genes *ATM*, *TP53* y *SF3B1* en pacientes con LLC después de desarrollar resistencia al venetoclax, además los autores detectaron aumento en la expresión de MCL-1, lo cual sugiere que la resistencia asociada a este fármaco involucra múltiples cambios complejos (Guieze et al., 2019). Además, estudios preclínicos han demostrado que el incremento de otras proteínas anti-apoptóticas, tales como MCL-1 y BCL-XL, pueden generar resistencia al venetoclax (Choudhary et al., 2015; Jayappa et al., 2017).

3.2 Piroptosis

Si bien, la apoptosis juega claramente un rol en el desarrollo tumoral y las vías o moléculas implicadas en la resistencia a este tipo de muerte celular han sido constante foco de estudio. Cada vez cobra más importancia, el rol que podría estar teniendo la piroptosis en la fisiopatología de enfermedades oncológicas. Dado que ésta es un tipo de muerte celular proinflamatoria, todavía no está claro si la piroptosis estaría promoviendo o inhibiendo el crecimiento tumoral. Aunque, este mecanismo pareciera ser dependiente del tipo de tejido (Xia et al., 2019).

La piroptosis se define como un tipo de muerte celular regulada (MCR) que depende de la formación de poros en la membrana plasmática por proteínas miembros de la familia gasdermina, frecuentemente (pero, no siempre) como consecuencia de la activación de caspasas inflamatorias (Galluzzi et al., 2018). Similar a lo que ocurre en la apoptosis, una célula piroptótica experimenta condensación nuclear y fragmentación del ADN. Pero, además por la presencia de poros en la membrana celular el balance iónico se ve alterado, permitiendo entrada de agua, ruptura de la membrana y la liberación de mediadores proinflamatorios, incluyendo IL-1 β , IL-18 y ATP (Xia et al., 2019).

Entre los miembros de la familia gasdermina, solamente gasdermina D (GSDM-D) y gasdermina E (GSDM-E) son clivadas por caspasas para formar poros en la membrana e inducir piroptosis. Generalmente, GSDM-D es clivada por las caspasas inflamatorias (caspasa 1/4/5/11) como consecuencia de la activación del inflamasoma, mientras que GSDM-E es clivada por la caspasa 3 (miembro de la vía de la apoptosis) para producir muerte piroptótica (Zheng and Li, 2020).

3.2.1 La activación del inflamasoma es la base de la piroptosis

El inflamasoma es un complejo multiproteico que forma parte de la inmunidad innata, el cual se ensambla en el citoplasma en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Típicamente comprende un sensor que tras el reconocimiento de su ligando se oligomeriza y recluta una proteína adaptadora conocida como ASC ('apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD'), esta última consta de dos dominios, un dominio de pirina (PYD) y uno de reclutamiento de caspasa (CARD), permitiendo así ser un puente entre el sensor y pro-caspasa 1 (Broz and Dixit, 2016). La proximidad entre estas dos moléculas favorece la auto proteólisis de pro-caspasa 1 para producir su forma activa, una vez activada caspasa 1 (Casp.1) es capaz de procesar y activar a pro IL-1 β y a pro IL-18 (En la **Fig. 6** se esquematiza este proceso).

De igual manera, Casp.1 escinde a GSDM-D en un sitio de consenso presente en la región de unión del dominio C-terminal y N-terminal. Este clivaje separa ambos dominios, eliminando la auto inhibición y permitiendo al dominio N-terminal translocarse a la parte interna de la bicapa lipídica donde se une con alta especificidad a ciertos inositol fosfatos o cardiolipina. Una vez unido a la membrana plasmática, GSDM-D N-terminal se oligomeriza para generar un poro con un diámetro interno entre 10-14 nm, siendo este mecanismo el responsable de la rápida permeabilización de la membrana plasmática que ocurre durante la piroptosis y la principal forma de liberación de IL-1 β (Ding et al, 2016; Liu et al., 2016; Sborgi et al., 2016). El mecanismo descrito anteriormente forma parte de la vía canónica del inflamasoma que conlleva a la activación de casp1, sin embargo, existe una vía no canónica donde los lipopolisacáridos (LPS)

presente en las bacterias Gram negativas pueden activar directamente a las caspasas inflamatorias humanas 4 y 5 (u 11 murina), llevando así al clivaje de GSDM-D (Wang, 2020) (**Fig. 6**).

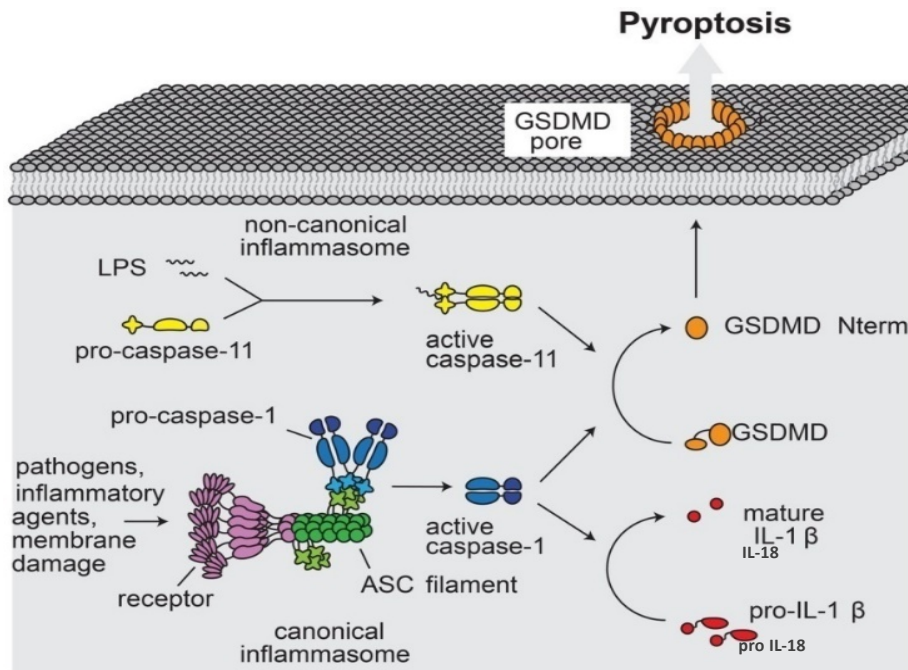


Fig.6 Inflamasoma canónico y no canónico. La vía canónica del inflammasoma conlleva a la formación de un complejo multiproteico en el citoplasma cuyo objetivo es la activación de Casp.1, con la consecuente activación de citoquinas inflamatorias y el clivaje de GSDM-D para producir piroptosis. Por su parte, en la vía no canónica, pro-caspasa 11 murina (o sus homólogos en humanos, caspasa 4 y 5) pueden ser activadas directamente por LPS, generando piroptosis sin requerir el ensamblado del multi complejo (Modificado de Sborgi et al., 2016)

Hasta la fecha, han sido identificados cinco receptores capaces de ensamblar inflammasomas, entre ellos los pertenecientes a la familia NLR ('NOD-like receptors') (NLRP1, NLRP3 y NLRC4), la proteína ausente en melanoma 2 (AIM2) y pirina. Existen además otros inflammasomas que han sido propuestos para activar Casp.1, pero su rol aún no ha sido dilucidado. Estos incluyen NLRP6, NLRP7, NLRP12 y la proteína 16 inducible por IFN-γ (IFI-16) (Man and Kanneganti, 2016). Entre los inflammasomas, el NLRP3 es el más caracterizado y ampliamente estudiado, se sabe que este responde a una gran variedad de ligandos endógenos e infecciosos, pero su activación se genera en dos pasos, primero debe ser transcrito y traducido, y luego activado. El primer paso ocurre cuando tras la exposición a DAMPS o PAMPS el TLR se autofosforila resultando en la activación de NF-κB, cuya vía estimula la transcripción y expresión de los componentes del inflammasoma que luego son exportados hacia el citoplasma donde permanecen inactivos hasta que ocurre un segundo estímulo que llevaría a la oligomerización de

NLRP3, ASC y pro-caspasa 1, formando así el multi complejo (Moossavi et al., 2018). Diferentes mecanismos han sido sugeridos de ser capaces de generar este segundo paso de activación, entre los más ampliamente aceptados se encuentran:

1. Eflujo de potasio: Varios estudios han demostrado que una elevada concentración de potasio extracelular previene la activación del complejo NLRP3, mientras que baja concentraciones de potasio intracelular inicia la activación del inflamasoma (Muñoz-Planillo et al., 2013; Katsnelson et al., 2015)
2. Flujo de calcio: Murakami y col. mostraron que el bloqueo en la señalización del calcio inhibe la activación del inflamasoma (Murakami et al., 2012). De igual manera un estudio farmacológico identificó que el bloqueo del receptor del inositol 1,4,5-trifosfato (implicado en la liberación de calcio intracelular desde el retículo endoplasmático), disminuye el flujo de calcio y consecuentemente inhibe la activación de NLRP3 (Lee et al., 2012).
3. Disfunción mitocondrial: Señales de daño mitocondrial resulta en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), liberación y oxidación de ADN mitocondrial en el citosol, y/o translocación de específicos fosfolípidos mitocondriales, como cardiolipina. Todas estas sustancias han sido demostradas que son capaces de activar el inflamasoma NLRP3 (Shimada et al., 2012; Lyer et al., 2013).
4. Liberación de catepsina B lisosomal: En este modelo, la fagocitosis de partículas ambientales parece activar el complejo NLRP3 que forma estructuras cristalinas cuando son absorbidas por los fagocitos. Estos agregados desencadenan la fuga lisosómica debido a sus características físicas y liberan el contenido en el citosol a través de un mecanismo mediado por la catepsina B, lo que aumenta la activación del complejo NLRP3 (Bai et al., 2018).

3.2.2 TMEM176A y TMEM176B, noveles canales iónicos reguladores del inflamasoma.

Dado que la activación del inflamasoma es sensible al flujo de iones, el interés por identificar los canales iónicos involucrados en este proceso ha aumentado considerablemente en los últimos años. En este sentido, la proteína de transmembrana 176B (TMEM176B), también conocida como TORID ('tolerance-related and induced') ha sido identificada como un canal iónico inmunomodulador (Louvet et al., 2005; Segovia et al., 2014). TMEM176B y su homólogo TMEM176A son canales iónicos ácido sensibles no selectivos que contienen 4 dominios transmembrana y un motivo ITIM (dominio de inhibición basado en tirosinas) en una de sus colas citoplasmáticas, formando así parte de la familia de proteínas MS4A ('membrane-spanning 4-domain family, subfamily A'), la cual tiene 18 miembros hasta el momento, destacándose entre ellos CD20 y FcεRIβ (Eon Kuek et al., 2016, Louvet et al., 2005).

TMEM176A y TMEM176B son considerados de expresión ubicua en seres humanos, aunque se ha identificado alta expresión en monocitos, macrófagos y células dendríticas (CDs) CD11b+ (Condamine et al., 2010). Los genes que codifican para estos dos canales iónicos están adyacentes en el cromosoma 7, presentan un patrón de expresión y regulación similar y existe evidencia de que estas dos proteínas interactúan entre sí formando multímeros (Louvet et al., 2005; Condamine et al., 2010). En cuanto a su ubicación en la estructura celular, se encuentran localizados en la membrana endofagosomal, así como en la red trans-Golgi (Segovia et al., 2020). Además, ha sido descrito un posible mecanismo de compensación funcional entre ambas proteínas, dado que células deficientes en TMEM176B han mostrado incremento en la expresión de TMEM176A (Drujont et al., 2016). En CDs TMEM176B controla el PH fagosomal y promueve la presentación cruzada para activar linfocitos T reguladores (Treg) CD8+, mecanismo que ha sido asociado con la tolerancia a los aloinjertos (Louvet et al., 2005; Segovia et al., 2014).

Diferentes estudios han mostrado que la expresión de estos canales iónicos está alterada en varios tipos de cáncer en comparación con tejidos normales. En cáncer gástrico bajos niveles de ARNm de TMEM176A y TMEM176B han sido correlacionados con mejor supervivencia (Sun et al., 2018). Cuajungco y col. mostraron que la expresión de TMEM176A, así como de TMEM176B se encuentra elevada en linfomas, pero no en tejidos normales, y que TMEM176A por sí solo está incrementado en carcinoma de pulmón (Cuajungco et al., 2012). Del mismo modo, fue descrito que TMEM176B está sobre expresado en carcinoma renal, específicamente en células que forman parte de la neovascularización de este tumor, sugiriendo así un rol en la angiogénesis (Otsubo et al., 2014). En contraste, el silenciamiento epigenético de TMEM176A en carcinoma colo-rectal, hepatocarcinoma (HCC) y carcinoma esofágico ha sido asociado con progresión tumoral (Gao et al., 2017; Li et al., 2018; Wang et al., 2017).

Más recientemente, Segovia, Russo y col. mostraron que alta expresión de TMEM176B en células estromales de cáncer de colon se relaciona con menor supervivencia global. Además, los autores detectaron una fuerte correlación negativa entre la expresión de TMEM176B y la activación del inflammasoma NLRP3 (Segovia y Russo et al., 2019).

3.2.3 Piroptosis, ¿un mecanismo ambiguo en cáncer?

Ha sido establecido por años que la exposición por tiempo prolongado de células o tejidos a microambientes inflamatorios aumenta el riesgo a desarrollar neoplasias, por ende, la activación de la piroptosis que lleva a la liberación de mediadores inflamatorios como IL-1 β e IL-18 podrían promover la carcinogénesis. Sin embargo, estudios utilizando ratones NLRP3 $^{-/-}$ y casp1 $^{-/-}$ han demostrado que en ausencia de un inflammasoma activo estos ratones son más sensibles a desarrollar cáncer de colon inducido por azoximetano/sulfato de dextrano sódico (Dupaul-Chicoine et al., 2010; Allen et al., 2010). Estas observaciones indican que la piroptosis

podría jugar un rol dual promoviendo o inhibiendo el crecimiento celular en diferentes modelos tumorales.

Un estudio reciente mostró que la disminución en la expresión de GSDM-D promueve la proliferación celular en cáncer gástrico (Wang et al., 2018). Y en hepatocarcinoma (HCC), Wei y col. demostraron que la expresión del inflamasoma NLRP3 está disminuido e incluso completamente ausente, y que hay una correlación negativa entre su expresión y el grado clínico-patológico de la enfermedad (Wei et al., 2014). Por el contrario, en cáncer de pulmón de células pequeñas (NSCLC) alta expresión de GSDM-D ha sido asociada con tumores más grandes, estadios más avanzados de la clasificación TNM ('Tumor-Node-Metastasis') y sobrevidas más cortas (Gao et al., 2018).

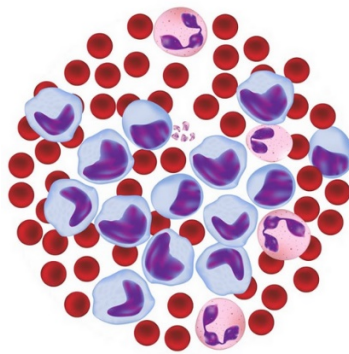
En el contexto de la LLC, la información disponible acerca del rol del inflamasoma es casi inexistente, de hecho, el único trabajo orientado en este sentido es el publicado por Salaro y col., quienes describen bajos niveles de NLRP3 en células de LLC asociado a mayor proliferación celular, mientras que sobre expresión de NLRP3 causa acelerada apoptosis (Salaro et al., 2016). En línea con lo reportado por Salaro y col., resultados previos de nuestro grupo, donde se evaluó el transcriptoma de las poblaciones proliferantes IgM^{POS}/IgG^{POS}, muestran que esta subpoblación tumoral presenta una menor expresión de FOXO1 ('Forkhead box protein O1') y CLIC4 ('Chloride Intracellular Channel 4'), siendo estas dos moléculas asociadas a la activación del inflamasoma NLRP3 (Kim et al., 2017; Liu et al., 2019; Tang et al., 2017; Domingo-Fernández et al., 2017). Aunado a esto, ha sido descrito que pacientes con una LLC avanzada tienen menor producción de IL-1 β , mientras que aquellos que presentan una enfermedad estable los valores de IL-1 β son cercanos a lo normales (Aguilar-Santelises et al., 1989; Yan et al., 2011; Garley et al., 2016).

Todo lo descrito hasta ahora señala el rol del microambiente en la proliferación y sobrevida del clon tumoral en la LLC. Lo cual nos lleva a postular que la interacción del linfocito B leucémico con células adyacentes, promueve su activación, generando así incremento en la expresión de las FPs AID+, y la expresión aberrante de esta enzima puede conducir a nuevas mutaciones que favorezcan a la célula leucémica. Además, el microambiente podría estar promoviendo la sobrevida del clon tumoral, no solo a través de la inhibición de la apoptosis sino también generando señales que conllevarían a menor activación del inflamasoma y como consecuencia mayor resistencia a la muerte celular por un defecto en la piroptosis.

Tomando en cuenta lo anterior, este trabajo se centra en el estudio de nuevos mecanismos que pudiesen estar favoreciendo el desarrollo de una LLC más agresiva, y en este sentido plantea e intenta responder las siguiente dos preguntas

¿Una mayor expresión de la enzima mutagénica AID en las FPs está asociado con el origen de las dos alteraciones citogenéticas de peor pronóstico en la LLC?

¿El canal iónico TMEM176A se asocia al desarrollo de una enfermedad más agresiva en la LLC a través de la inhibición del inflamasoma?



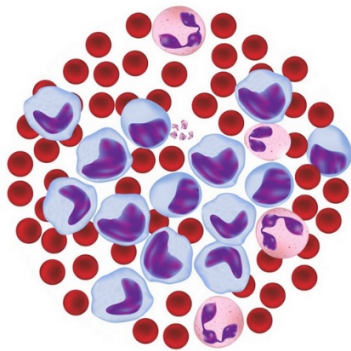
Objetivos

Objetivo General

Identificar nuevos mecanismos implicados en la proliferación y sobrevida del clon tumoral que conlleven al desarrollo de una LLC más agresiva.

Objetivo Específico

- I.** Determinar si existe o no una asociación entre un alto porcentaje de la FP IgM+/IgG+ en sangre periférica y la evolución clínica de la enfermedad
- II.** Demostrar que la sobreexpresión de AID en las fracciones proliferantes del clon tumoral está asociada a un incremento de alteraciones cromosómicas.
- III.** Analizar el comportamiento de las fracciones proliferantes y de la expresión de AID durante la terapia con un inhibidor de la BTK.
- IV.** Evaluar el rol del inflammasoma en células primarias de la LLC.
- V.** Identificar nuevos mecanismos o blancos terapéuticos que promuevan la muerte celular en la LLC.



Materiales y Métodos

1. Muestras de Pacientes

Los pacientes incluidos en el estudio provienen del servicio de Hematología del Hospital Maciel en Montevideo, siendo reclutados en el proyecto titulado "Implicancias de la expresión anómala de la enzima mutagénica AID en la progresión de la Leucemia Linfocítica Crónica", el cual fue aprobado por el comité de Bioética de dicho hospital, durante el período 2015-2019. Todos los pacientes proporcionaron un consentimiento informado, de acuerdo con las regulaciones éticas de Uruguay y de la Declaración de Helsinki. El diagnóstico de LLC se basó en características celulares e inmunofenotípicas, de acuerdo con las guías de diagnóstico vigentes (Rawstron et al., 2018).

Una vez obtenida la SP, se procedió al aislamiento de las PBMCs por centrifugación en gradiente de densidad, utilizando el reactivo Ficoll-Histopaque-1077 (Sigma), siguiendo indicaciones del proveedor e inmediatamente criopreservadas con 90% Suero Fetal Bovino (SFB) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), utilizando el recipiente de congelación Thermo Scientific™ Mr. Frosty™, almacenadas a -80 °C y posteriormente en nitrógeno líquido.

2. Extracción de Ácido Ribonucleico (RNA) y Síntesis de ADN copia (cDNA)

La extracción de RNA se realizó a partir de 5×10^6 PBMCs utilizando el reactivo TRIzol (Ambion, 15596026) y siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente, el RNA obtenido se cuantificó por absorbancia a 260nm. A partir de 1µg de RNA se realizó la síntesis de cDNA, empleando la enzima M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Invitrogen, 28025). Se utilizó como cebador oligo dT, de tal manera de retro-transcribir las moléculas de ARN mensajero (ARNm) presentes en ese momento en la célula tumoral.

3. Determinación del Perfil Mutacional IgVH

Para la determinación del perfil mutacional IgVH se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del cDNA de PBMCs con cebadores dirigidos a secuencias consenso de la región líder (LH) y Cµ del gen IgVH. Cuya finalidad es obtener el rearreglo correspondiente al BCR del clon tumoral, siguiendo lo descrito en (Ghia et al., 2006). El producto de PCR es purificado y clonado en el vector pGEM-T easy (Promega, Cat. Nº A137A), luego los plásmidos son extraídos de las colonias recombinantes utilizando Nucleo Spin® Plasmid (Mancherey-Nagel, Cat. Nº 740588). Posteriormente, se realiza la secuenciación por la técnica de Sanger partiendo del oligo SP6, y una vez obtenidas las secuencias, éstas son analizadas en las bases de datos

IgBLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) o ImMunoGeneTics (IMGT, <http://www.imgt.org>). Determinado así, su porcentaje de identidad con respecto a la secuencia del ADN germinal. Si el porcentaje de identidad es $\geq 98\%$ se considera como IgVH No Mutado, de lo contrario, el paciente es considerado IgVH Mutado.

4. PCR de AID, LPL y GAPDH

La amplificación de AID fue realizada a partir de 1 μ L del cDNA mediante PCR utilizando la enzima Taq ADN Polimerasa (Invitrogen, 18038) con los reactivos correspondientes (Buffer, MgCl₂, H₂O y oligos), en un termociclador Applied Biosystem 2720. Los oligos utilizados se muestran en la **tabla 2**. Siendo las condiciones de ciclado las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C y 1 minuto a 72°C; y un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos (Palacios et al., 2010).

Por otro lado, la PCR de LPL (Lipoproteína Lipasa) y GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa) fueron realizadas con 1 μ l de ADN y utilizando el mismo ciclado para ambas: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de: 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 1 minuto a 72°C; y un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos.

Para la evaluación de los productos de PCR se emplearon geles de agarosa al 1.5% (Ultra pura de Invitrogen, Cat. N° 16500), teñidos con el agente intercalante del ADN, Bromuro de Etidio (Eurobio, GEPBET02). Se utilizó el peso molecular DNA Ladder con un rango entre 100-2000 pares de base (Invitrogen, 15628). Y la visualización de los geles se llevó a cabo en un transiluminador (Carestream, Gel Logic 112).

A continuación, se muestran las secuencias de los oligos utilizados para los 3 genes:

	Primer Forward	Primer Reverse
AID	5'-GAG GCAAGAAGA CAC TCT GG-3'	5'-CTA CTT CTG TGA GGA CCG C-3'
LPL	5'-GGA ATG TAT GAG AGT TGG GTG-3'	5'-CAA TGC TTC GAC CAG GGG ACC-3'
GAPDH	5'-GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA-3'	5'-ATG CCA GTG AGC TTC CG TT 3-'

Tabla 2. Primers utilizados en las PCR de AID, LPL y GAPDH

5. Análisis por citometría de flujo y aislamiento celular por 'cell sorting' de la FP IgM^{POS}/IgG^{POS}

1x10⁶ PBMCs asiladas de pacientes con diagnóstico de LLC fueron fijadas con 4% de paraformaldehído (PFA) por 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Luego se lavó dos veces con buffer fosfato salino (PBS), y se llevó a cabo la permeabilización con PBS conteniendo 0,5% de Saponina y 5% de SFB (buffer de permeabilización). Finalmente, las células fueron inmunomarcadas con anti-IgM F(ab')₂ conjugado a ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch, Cat. Nro. 709-116-073) y anti-IgG F(ab')₂ conjugado con Alexa Fluor 488 (AF488) (Jackson ImmunoResearch, Cat. Nro. 709-546-098), a una dilución de 1:40 y 1:100, respectivamente. La incubación se realizó a 4°C durante 30 minutos y protegida de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó dos veces con buffer de permeabilización, y las PBMCs fueron adquiridas utilizando el citómetro de flujo CyAn ADP (Dako). Para el análisis se utilizaron los programas Summit v4.3 (Dako) y FlowJo (BD).

En cuanto al aislamiento celular por 'cell sorting' se aplicó el protocolo marcación descrito anteriormente. Con la diferencia, que se utilizó entre 50-100x10⁶ de PBMCs y la separación celular se realizó a través del equipo FACSAria Fusion III (BD). Las células fueron recolectadas en tubos de 15 ml conteniendo 2ml de SFB y mantenidas en hielo. Posteriormente, fueron lavadas con PBS y resuspendidas en PBS con 0.02% de azida de sodio.

6. Preparados para FISH

Las células IgM^{POS}/IgG^{POS} obtenidas a partir del 'cell sorting' fueron resuspendidas en una concentración 100.000 células/200 uL de PBS/Azida de sodio 0.02%, y centrifugadas en un portaobjeto previamente tratado con Poli-L-Lisina 0,1% (Sigma), usando el equipo Cytospin3 (Thermo Shandon) a una velocidad de 1500 rpm por 10 minutos. Los portaobjetos fueron guardados a -20°C hasta el análisis del FISH, el cual se llevó a cabo en el Laboratorio de Citogenética del Hospital Maciel, utilizando las sondas de identificador específico de locus, Vysis para LLC (Abbot , Cat. Nro. 04N02-022).

7. Purificación de células CD19^{POS} por separación celular activada por magnetismo (MACS)

A partir de PBMCs de pacientes con LLC se realizó la purificación de células CD19^{POS} utilizando el sistema MACS. Las células se incubaron con microbeads anti-CD19 humano (Miltenyi Biotec, 130-050-301) por 15 minutos a 4°C. Posteriormente fueron lavadas y se procedió a la separación magnética, utilizando columnas LS. Se apartó una alícuota de células previo a la

purificación, y de las fracciones CD19^{pos} y CD19^{neg} para evaluar la eficiencia de la separación a través de citometría de flujo.

8. Western Blot anti-TMEM176A

Células CD19^{pos} de pacientes con LLC fueron lisadas con el buffer RIPA conteniendo 0,1% de dodecilsulfato sódico (SDS) e inhibidor de proteasas (Roche, Cat. N° 11873580001), posteriormente las proteínas fueron sonicadas y cuantificadas utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher). Previo al sembrado, las muestras se diluyeron en un buffer de carga (β -mercaptoetanol 25%, SDS 2.5%, Glicerol 50%, Buffer Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, Azul de Bormofenol 0.1 mg/mL), para luego ser calentadas a 100°C por 10 minutos.

Se cargaron 50 μ g de proteína en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras (SDS-PAGE) y se corrió a 25 miliamperios por gel. Se realizó electrotransferencia semi-seca a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m (Amersham, G&E) a 20 voltios por 30 minutos. Se verificó que la transferencia haya sido efectiva utilizando la tinción de Rojo Ponceau, una vez confirmado esto se procedió a bloquear la membrana con una solución de TBS-Leche 5% a TA en agitación por 2 horas. A continuación, se incubó con el anticuerpo policlonal de conejo anti-TMEM176A (Proteintech Group, Cat. Nro. 20378-1-AP) a una dilución de 1:200 en TBS-Tween 20 0,1%,-Leche 5% durante toda la noche (ON) a 4°C. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con TBS-Tween 20 0,1% y se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma, Cat. N° A0545) a una dilución de 1:10000 en TBS-Tween 20 0,1%,-Leche 5% por 1 hora a TA en agitación lenta. Se procedió a lavar la membrana nuevamente y se reveló con ECL (SuperSignal West Pico, Thermofisher Scientific).

La banda obtenida correspondiente al tamaño esperado para TMEM176A (26 kDa) fue cuantificada por densitometría, utilizando el programa Image J y normalizada al valor de expresión constitutiva de la enzima GAPDH, determinados también por WB.

9. Western Blot anti-GSDM-D

La preparación de las muestras, sembrado, corrida electroforética y electrotransferencia para evaluar la presencia de la proteína GSDM-D por WB es similar al procedimiento realizado para TMEM176A. Una vez realizada la electrotransferencia, se procedió a bloquear la membrana con una solución TBS-BSA 3% por 2 horas en agitación. Culminado este tiempo, se incubó con el

anticuerpo policlonal de conejo anti-GSDMD (Novus, Cat. Nº NBP2-33422) a una dilución 1:400 en TBS-Tween 20 0,1%-BSA 1% e incubado ON a 4°C. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con TBS-Tween-20 al 0,1% y se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma, Cat. Nº A0545) a una dilución de 1:10000 en TBS-Tween 20 0,1%,-Leche 5% por 1 hora a TA en agitación lenta. Se procedió a lavar la membrana nuevamente y se reveló con ECL (SuperSignal West Pico, Thermofisher Scientific).

Las bandas obtenidas, correspondiente a la proteína en su forma completa, así como los fragmentos producto del clivaje de GSDM-D fueron cuantificadas por densitometría, utilizando el programa Image J y normalizadas a los valores de expresión constitutiva de la enzima GAPDH.

10. Western Blot anti-GAPDH

GAPDH es una proteína de expresión constitutiva, por ende, es ampliamente utilizada como control interno de carga para normalizar los resultados de expresión de proteínas. Por lo que, a partir de las membranas previamente utilizadas para los WB anti-GSDMD y anti-TMEM176A se procedió a la determinación de GAPDH. Con esta finalidad, se bloqueó por 1 hora con TBS-Leche 5% y luego se incubó con el anticuerpo policlonal de conejo anti-GAPDH (Abcam, Cat. Nº ab37168) a una dilución 1:5000 en TBS-Tween20 0,1%,-Leche 5% por 1 hora a TA. Se lavó 3 veces con TBS-Tween20 0,1% y se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma, Cat. Nº A0545) a una dilución de 1:10000 en TBS-Tween 20 0,1%,-Leche 5% por 1 hora a TA en agitación lenta. Se procedió a lavar la membrana nuevamente y se reveló con ECL (SuperSignal West Pico, Thermofisher Scientific). La banda obtenida correspondiente al peso molecular estimado para GAPDH (37 kDa) fue cuantificada utilizando el programa Image J.

11. Evaluación de la muerte celular espontánea en células de LLC en cultivo

PBMCs criopreservadas obtenidas a partir de pacientes con LLC fueron puestas en cultivo celular en una densidad de $1 \times 10^6 / 400 \mu\text{L}$ de medio RPMI complementado con 10% de SFB, penicilina 100 $\mu\text{g/ml}$, estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$, amortiguador HEPES 1% y piruvato de sodio 1%. Para la evaluación del clivaje de GSMD-D se utilizaron entre $5-7 \times 10^6$ de células, colocadas en placas de 12 pocillos por 24 horas en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se recolectaron las células, se lavó con PBS y el pellet seco fue guardado a -80 °C hasta la realización del WB anti-GSDMD, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

En cuanto al ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) se llevó a cabo en el sobrenadante obtenido a partir $0,5 \times 10^6$ células cultivadas por triplicado en placas de 96 pocillos por 2, 24 y 48 horas en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Una vez culminada la incubación, se prosiguió a la cuantificación de LDH a través del kit comercial *Pierce LDH Cytotoxicity Assay* (Thermo Scientific, Cat. N° 88954), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

12. Inmunofluorescencia de NLRP3 y Casp. 1 activa

Entre $0,5-1 \times 10^6$ de PBMCs criopreservadas y aisladas de pacientes con LLC fueron puestas en cultivo celular por 24 horas en las condiciones de medio descritas en el apartado anterior, transcurrido el periodo de incubación las células fueron recolectadas, lavadas con PBS y marcadas para la detección de Casp.1 activa con la sonda FLICA-660-YVAD-FMK (ImmunoChemistry, Cat. N° 9122), dilución 1:250 e incubadas a 37°C protegidas de la luz por 30 minutos, después fueron lavadas y fijadas con las soluciones provistas por el kit. Una vez fijadas, las células fueron resuspendidas en 30 μ L de PBS y decantadas en un portaobjeto, previamente tratado con poli-L-Lisina 0,1% (Sigma), dejándose adherir por 2 horas. Posteriormente, se realizó la permeabilización con PBS-BSA 3%-Triton X-100 0.1% (PBT) por 15 minutos y luego se llevó a cabo la marcación con un anticuerpo monoclonal de rata IgG_{2A} anti-NLRP3 (R&D, Cat. N° MAB7578), dilución 1:50 en PBT e incubado protegido de la luz por 1:30 h. Transcurrido la incubación, se realizaron 2 lavados con PBT y se procedió al marcado con el anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado a AF488 (Cell Signalling, Cat. N° 4416) e anti-IgM F(ab')₂ conjugado a PE, dilución de 1:1000 y 1:40, respectivamente. Se incubaron por 45 minutos, protegidos de la luz.

Finalmente, se realizaron 3 lavados y se hizo una marcación con DAPI (Cell Signalling, Cat. N° 4083), dilución 1/5000 en PBS por 5 minutos. El montaje se realizó con ProLong y los preparados fueron observados en el Microscopio Confocal Zeiss LSM 800, utilizando aumento 60x con lente de inmersión en aceite.

13. Cultivo de células de LLC con (+)-BayK8644 y/o Venetoclax

Para la realización de la curva dosis-tiempo-respuesta del (+)-BayK8644, 1×10^6 de PBMCs criopreservados fueron puestas en cultivo celular por duplicado en placas de 48 pocillos en las condiciones de medio descritas anteriormente. Se evaluaron 5 concentraciones de (+)-BayK8644 (5, 10, 25, 50 y 100 μ M). Además, se mantuvo 2 condiciones control, una conteniendo el vehículo,

correspondiente al equivalente del (+)-BayK8644 en EtOH, y otra solo con medio. Todas las células fueron mantenidas por 6 y 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

En cuanto al venetoclax (MedKoo, Biosciences), 1x10⁶ de PBMCs criopreservados fueron cultivadas con 2.5, 5, 10 y 100 nM de la droga por 4 y 12 horas. Como controles, se usó el equivalente de DMSO, correspondiente a la concentración de 100nM, más una condición solo con medio, esta última con la finalidad de medir el porcentaje de muerte celular espontánea.

El efecto combinado de ambos compuestos fue evaluado a través del cultivo de 1x10⁶ de PBMCs con 50 µM de (+)-BayK8644 o el equivalente de EtOH por 20 horas. Pasado este tiempo se añadió 10 nM de Venetoclax o su equivalente en DMSO por 4 horas más. En todos los casos anteriores la respuesta al tratamiento se evaluó por la activación de Casp.1 y viabilidad celular, evidenciada por citometría de flujo.

El clivaje de GSDM-D inducido por ambas drogas fue determinado a través del cultivo celular de 5-7x10⁶ PBMCs en placas de 12 pocillos con 50 uM de (+)-BayK8644 o el equivalente a EtOH por 2 horas. Transcurrido este tiempo se agregó venetoclax 10 nM o DMSO por 4 horas más. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, y se guardó el pellet seco a -80 hasta el análisis de GSDM-D por WB.

14. Evaluación de la activación de Casp. 1 y viabilidad celular por citometría de flujo

La activación de Casp.1 se evaluó con la sonda 660-YVAD-FMK (ImmunoChemistry, Cat. Nº 9122), usada a una dilución 1:250 e incubada por 30 minutos a 37°C, protegida de la luz. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con un buffer provisto en el kit e incubadas por 30 minutos a 4°C con anti-IgM F(ab')₂ conjugado PE (Jackson ImmunoResearch, Cat. Nro. 709-116-073), dilución 1:40 en PBS-SFB 4%. Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron 2 lavados con PBS-SFB 4% y se agregó DAPI como agente intercalante del ADN (Cell Signalling, Cat. Nº 4083), dilución 1/5000, previo a la adquisición con el equipo FACSAria Fusion III (BD).

15. Ratones Eµ-TCL1

La cepa Eµ-TCL1 fue gentilmente proporcionada por *The Feinstein Institutes for Medical Research*, Nueva York. Los ratones se mantuvieron en el Bioterio SPF ('Specific Pathogen Free') del Institut Pasteur de Montevideo, siguiendo las normativas éticas internacionales para el uso

de animales de laboratorio (*ARRIVE Guidelines*). Todos los experimentos fueron supervisados y aprobados por el comité de ética en el uso de animales (CEUA) de la institución bajo el protocolo N° 002-18. Se estableció una tabla de calificación para definir el punto final humanitario, donde se evaluó aspectos relacionados al estado general del ratón y a la enfermedad, que se muestran a continuación:

Apariencia general	Puntos	Estado corporal	Puntos	Comportamiento	Puntos
Normal	0	Normal	0	Normal	0
Pelaje hirsuto	1	Aumento o pérdida leve de peso	1	Abatimiento, debilidad o letargia	1
Encorvado	2	Adelgazamiento severo	2	Inactivo y/o postrado	2
Ojos cerrados	2	Obesidad severa I	2	Hipersensibilidad al estímulo	2
Moribundo	4	Obesidad severa II	4	Automutilación	4
Pelaje	Puntos	Deshidratación	Puntos	Respiración	Puntos
Normal	0	Normal	0	Normal	0
Alopecia	1	Pliegue cutáneo que desaparece lento	1	Aumento o disminución leve	1
Eczema y pérdida de pelo	2	Pliegue cutáneo que permanece	2	Respiración rápida	2
Lesiones múltiples infectadas	2	Ojos entrecerrados	2	Difícil e irregular	2
Úlceras numerosas	4	Animal letárgico	4	Ruidos anormales	4

Tabla 3. Tabla de punto final humanitario para ratones Eμ-TCL1.

Una vez que el animal alcanzaba un puntaje mayor a 14, o al menos una sección con puntaje 4, se procedía a la eutanasia por dislocación cervical y extracción del bazo bajo condiciones de esterilidad. Posterior a la disrupción mecánica del tejido, usando *Cell Strainer* de 100 μM (Corning), las células fueron contabilizadas con cámara de Malassez. Reservando 3x10⁶ de esplenocitos para la determinación del clon tumoral por citometría de flujo y el resto fueron criopreservadas en 90% de SFB y 10% de DMSO (Sigma), utilizando el recipiente de congelación Thermo Scientific™ Mr. Frosty™, y almacenadas a -80 °C.

16. Determinación de la expresión de TMEM176A en ratones Eμ-TCL1 por PCR

Utilizando el reactivo TRIzol se extrajo RNA a partir de muestras de bazo de ratones Eμ-TCL1 con ≥90% de infiltración tumoral, determinado por citometría de flujo. Partiendo de 1 μg de RNA se realizó la retro-transcripción como fue descrito anteriormente y se procedió a la realización de la PCR de TMEM176A. Se utilizó GAPDH como gen de control interno y como control positivo, células dendríticas de MO obtenidas de ratones “wild type” C57BL/6. La

amplificación de TMEM176A fue realizada a partir de 1µL del cDNA, mediante una PCR utilizando la Taq ADN Polimerasa (Invitrogen, 18038) con los reactivos correspondientes y en el termociclador Applied Biosystem 2720. Los oligos utilizados fueron, *Forward*: 5'-GCA GTC GGC AAG GTG GA-3' *Reverse*: 5'-CAG CAT CCG CTT CCA CCC AG-3', y las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de: 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 61° y 1 minuto a 72°C; y un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos.

Para la amplificación de GAPDH, se aplicaron las mismas condiciones usadas en humanos.

17. Cultivo celular de esplenocitos de Eµ-TCL1 en presencia de (+)-BayK8644 y Venetoclax

1x10⁶ esplenocitos criopreservados de ratones Eµ-TCL1 con enfermedad avanzada, fueron puestos en cultivo celular por duplicado en placas de 48 pocillos con 400 µL de medio RPMI complementado con 10% de SFB, penicilina 100 µg/ml, estreptomycin 100 µg/ml, amortiguador HEPES 1%, piruvato de sodio 1%, aminoácidos no esenciales 1% y beta-mercaptoetanol 0,05 mM. Se añadió 50 µM de (+)-BayK86444, Venetoclax 10 nM o, el equivalente en vehículos (EtOH y DMSO) por 6 horas en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂.

Pasado este tiempo, las células fueron marcadas para Casp.1 activa con la sonda FLICA 660-YVAD-FMK, siguiendo el mismo protocolo descrito para células humanas. Posteriormente, los esplenocitos se incubaron por 30 minutos a 4°C con anti-IgM conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BioLegend, Cat. Nº 406506) y anti-CD5 conjugado a PE (Biolegend, Cat. Nº 100608), dilución 1:30 y 1:200 en PBS/SFB 4%, respectivamente. Transcurrido la incubación, las células fueron lavadas 2 veces con PBS/SFB 4% y marcadas con DAPI (Cell Signalling, Cat. Nº 4083), dilución 1/5000, previo a la adquisición con el equipo FACSAria FusionIII (BD).

18. Transferencia celular adoptiva (TCA) de ratones Eµ-TCL1

Entre 10-15x10⁶ de esplenocitos criopreservados obtenidos a partir de 3 ratones Eµ-TCL1 con infiltración tumoral ≥70% en bazo fueron transferidos en 200 µL de PBS por vía intraperitoneal (IP) en ratones Eµ-TCL1 jóvenes entre 10-12 semanas de edad. Se realizó extracción de sangre periférica de la vena submandibular antes de la TCA y luego semanalmente a partir de los 21 días post transferencia. Los ratones recibieron anestesia inhalatoria con isoflurano (Terrell), previo al sangrado y se extrajo entre 50-75 µL de sangre venosa, recolectada en tubos de 1.5 ml, previamente impregnados con 10 µL de EDTA 3K (DeltaLab, Cat. Nº 705010).

Una vez obtenida la SP, se realizó hemograma para obtener los valores de recuento de leucocitos, plaquetas y hemoglobina, usando el equipo Mindray BC-5000 Vet. Además, 10 μ L de SP fue tratada con 100 μ L de buffer de lisis de glóbulos rojos por 5 minutos. Las células remanentes fueron marcadas con los anticuerpos murinos anti-CD19 conjugado a FITC (BioLegend, Cat. N^o 152404) y anti-CD5 conjugado a PE (BioLegend, Cat. N^o 100608), dilución 1:40 y 1:200, respectivamente. La incubación se realizó por 30 minutos a 4^oC y protegida de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó 1 lavado con PBS/SFB 4% y las células fueron adquiridas con el citómetro de flujo Accuri (BD) para determinar el porcentaje del clon tumoral en SP.

19. Tratamiento con (+)-BayK8644 y Venetoclax en el modelo de transferencia celular adoptiva E μ -TCL1.

16 ratones E μ -TCL1 jóvenes recibieron por vía intraperitoneal 10×10^6 esplenocitos obtenidos a partir de 3 de ratones E μ -TCL1 con infiltración tumoral $\geq 70\%$ en bazo. Pasado 1 semana de la TCA los animales fueron divididos en 4 grupos (Control, BayK, Venetoclax y BayK+Venetoclax), tomando en cuenta el sexo y la linfocitosis, para iniciar así el tratamiento.

El (+)-BayK8644 fue administrado vía intraperitoneal a 1mg/Kg diluido en 200 μ L de PBS (Segovia and Russo, et al. 2019). En cuanto al venetoclax, se usó una dosis escalonada de 50 mg/Kg la primera semana y 100 mg/Kg para el resto del tratamiento, siendo administrado por vía enteral a través de cánula orofaríngea flexible en un volumen de 100 μ L constituido por 60% de Phosal 50 PG (Lipoid), 30% de polietilenglicol 400 (PEG-400) (Sigma) y 10% de EtOH (Carter et al., 2017). El grupo control recibió el vehículo de ambas drogas, PBS con el equivalente en EtOH vía IP más la combinación de Phosal-PEG400-EtOH vía oral. Todos los tratamientos fueron dados diariamente durante 8 semanas. Y se realizó sangrado de la vena submandibular previo a la TCA, y luego una vez por semana desde el inicio de las terapias y extendidos hasta 2 semanas posterior a la interrupción de las drogas. A partir de la SP se realizó hemograma, utilizando el equipo Mindray BC-5000 Vet, así como la evaluación del clon tumoral por citometría de flujo, siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Una vez finalizado el tratamiento, los ratones fueron evaluados 2 veces por semana hasta la semana 20 para determinar la supervivencia de los 4 grupos, tomando en cuenta los criterios de la tabla de punto final humanitario. En la siguiente figura se resume el esquema de tratamiento administrado.

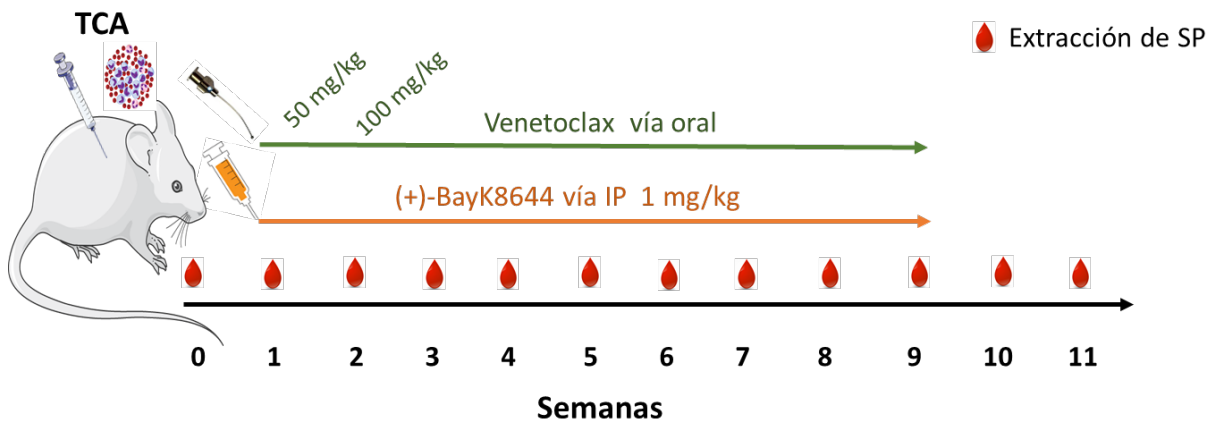
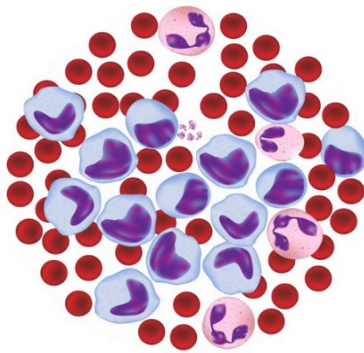


Fig. 7 Esquema de tratamiento en el modelo Eμ-TCL1. Ratones Eμ-TCL1 entre 10-12 semanas recibieron cada uno por vía IP 10×10^6 esplenocitos aislados de 3 ratones Eμ-TCL1 con infiltración tumoral en bazo $\geq 70\%$. Pasado 1 semana de la TCA se inició el tratamiento con 1mg/Kg de (+)-BayK8644 por vía IP y/o venetoclax vía oral. Éste último fue dado a 50 mg/kg la primera semana y luego escalado a 100 mg/kg para el resto del tratamiento. El grupo control recibió el vehículo tanto del (+)-BayK8644, correspondiente a PBS con EtOH, así como del Venetoclax (Phosal-PEG400-EtOH). Ambos tratamientos fueron administrados diariamente por 8 semanas. Además, se realizó extracción de SP previo a la TCA y luego semanalmente hasta la semana 11 para el seguimiento del clon tumoral.



Resultados

1. Un alto porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} en sangre periférica se asocia a una enfermedad más agresiva.

1.1 Determinación del porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} por citometría de flujo.

Nuestro grupo describió la presencia de un alto porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} en SP de pacientes LLC con un perfil de genes IgVH No Mut y con una acelerada progresión clínica (Palacios et al., 2010). Tomando en cuenta dicha observación, la selección de individuos para este estudio se basó en el perfil mutacional. Se incluyeron así, 15 pacientes con perfil de genes IgVH No Mut, de los cuales 14 presentaban además expresión de los marcadores AID y LPL (Lipoproteína Lipasa) a nivel de ARNm. Mientras que, los 11 pacientes restantes se corresponden con un perfil IgVH Mut con negatividad para AID y LPL en casi todos los casos (**Tabla 4**).

Una vez establecido ambos grupos, y utilizando la técnica de citometría de flujo, se procedió a la determinación del porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} en SP, a partir de PBMCs obtenidas al momento del diagnóstico de la enfermedad. Los resultados muestran mayor frecuencia de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} en SP de pacientes con un perfil IgVH No Mut, con una media de 2,82%. Mientras que, en los pacientes con perfil IgVH Mut esta media fue de 1,88% ($p: 0.0305$, *t test, two tailed*) (**Fig. 8**). corroborando las observaciones previas del laboratorio en esta nueva cohorte de pacientes que se utilizó para la presente tesis.

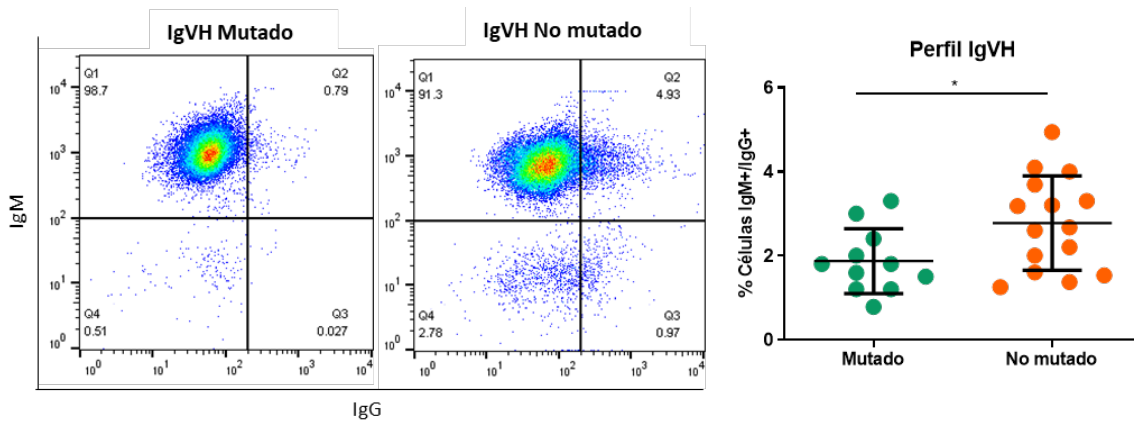


Fig. 8 Porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} de acuerdo con el perfil IgVH. Se eligieron 26 pacientes con diagnóstico de LLC, de los cuales 11 presentaban un perfil de genes IgVH Mut y 15 No mut. A partir de PBMCs obtenidas al debut de la enfermedad, se procedió al análisis de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos}. A la izquierda se muestra gráficos de puntos representativos de un paciente mutado y uno no mutado, y a la derecha la cohorte total de los 26 pacientes analizados. En la gráfica se puede observar que el grupo IgVH no mutado presenta una mayor frecuencia de células IgM^{pos}/IgG^{pos}, con una media de 2,82%, frente al 1,88% presentado por los pacientes IgVH mutado ($p: 0.0305$, *t test, two tailed*).

A continuación, se muestra una tabla con las características clínicas y moleculares de los pacientes incluidos en este análisis (**Tabla 4**).

LLC Nº	Binet	Recuento de linfocitos, x10e3/uL	Perfil IGHV	FISH	AID	LPL	% FP IgM+/IgG+	TFT (Meses)
1	B	43,66	No Mut	del13q/del11q	(+)	(+)	1.6	14
2	B	80	No Mut	S/A	(+)	(+)	2.6	24
3	A	19,45	No Mut	S/A	(+)	(+)	1.53	37
4	A	26,2	No Mut	S/A	(+)	(+)	1.25	16
5	B	21,42	No Mut	S/A	(+)	(+)	4	14
6	A	49,47	No Mut	S/A	(+)	(+)	2.2	9
7	C	40,22	No Mut	Tri12	(+)	(+)	3.3	1
8	B	81	No Mut	S/A	(+)	(+)	3.2	10
9	C	27,49	No Mut	del17p/del13q	(-)	(-)	4.1	12
10	B	90,40	No Mut	del13q	(+)	(+)	4.93	6
11	B	161,00	No Mut	del11q	(+)	(+)	2.67	1
12	B	5,27	No Mut	N/D	(+)	(+)	3.18	8
13	B	77,00	No Mut	del11q	(+)	(+)	3.57	9
14	C	112	No Mut	del17p	(+)	(+)	1,37	11
15	B	57	No Mut	S/A	(+)	(+)	2.0	9
16	B	75,32	Mut	N/D	(+)	(-)	3.0	8
17	A	24,73	Mut	S/A	(-)	(-)	0.78	N/T
18	B	53,00	Mut	N/D	(-)	(-)	3.3	18
19	A	37,52	Mut	del13q	(+)	(-)	1.59	38
20	A	18,87	Mut	S/A	(-)	(-)	2.4	N/T
21	C	71,20	Mut	N/D	(-)	(-)	1.8	1
22	A	36,60	Mut	S/A	(-)	(-)	1.8	N/T
23	A	14,80	Mut	del13q	(+)	(-)	2.0	N/T
24	A	25,80	Mut	S/A	(-)	(-)	1.18	N/T
25	A	19,50	Mut	N/D	(-)	(+)	1.2	N/T
26	A	24,00	Mut	S/A	(+)	(+)	1.5	N/T

Tabla 4 Caracterización clínica y molecular de pacientes con LLC. Para cada paciente se incluyó: A) Clasificación clínica de Binet: A, B o C. B) Recuento linfocitario (10×10^3 células/uL) en SP C) Perfil mutacional IgVH: Mutado o No mutado. D) Alteraciones citogenéticas evaluadas por FISH: del13q, del11q, tri12, del17p, sin alteraciones (S/A), no determinado (N/D). E) Expresión de los marcadores moleculares AID y LPL, determinados por PCR y ambos asociados a peor pronóstico F) Porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} G) 'Time to first treatment' (TFT), valor expresado en meses o no tratado (N/T).

1.2 El porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} al debut de la enfermedad se asocia al estadio Binet y puede predecir el TFT.

Una vez conocido el porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} de los 26 pacientes involucrados en el estudio, se procedió a evaluar si existía una asociación entre ellos y las etapas más avanzadas de la enfermedad. Los resultados muestran que pacientes con estadios Binet B o C al momento del diagnóstico presentan un mayor porcentaje de FP IgM^{pos}/IgG^{pos} en SP ($p: 0,0002$, t Test, *two tailed*) (**Fig. 9-a**).

Con el objetivo de profundizar nuestros estudios sobre la importancia de las poblaciones proliferantes en la sangre periférica de pacientes con LLC y su rol en la progresión de la enfermedad, decidimos evaluar si el porcentaje de la FP tiene un impacto en el ‘*Time to First Treatment*’ (TFT). Para ello se hizo un análisis retrospectivo a 5 años, y se estableció un punto de corte de 2%, con base a lo reportado por (Palacios et al., 2010). Aquellos pacientes con células IgM^{pos}/IgG^{pos} en SP >2% fueron definidos como alta frecuencia, mientras que quienes presentaban un porcentaje ≤2% fueron clasificados como baja. Una vez analizados todos los datos se realizó una gráfica de Kaplan-Meier. Como puede observarse, nuestro análisis muestra de manera significativa que aquellos pacientes con mayor porcentaje de FP en SP al momento del debut de la enfermedad requirieron tratamiento antes (media de TFT = 9 meses). Por el contrario, para aquellos pacientes en donde la FP fue igual o inferior al 2%, el tiempo que transcurrió desde el debut hasta el primer tratamiento fue mayor (media de TFT= 38 meses) (p: 0.061, test de Log-rank) (Fig. 9-b).

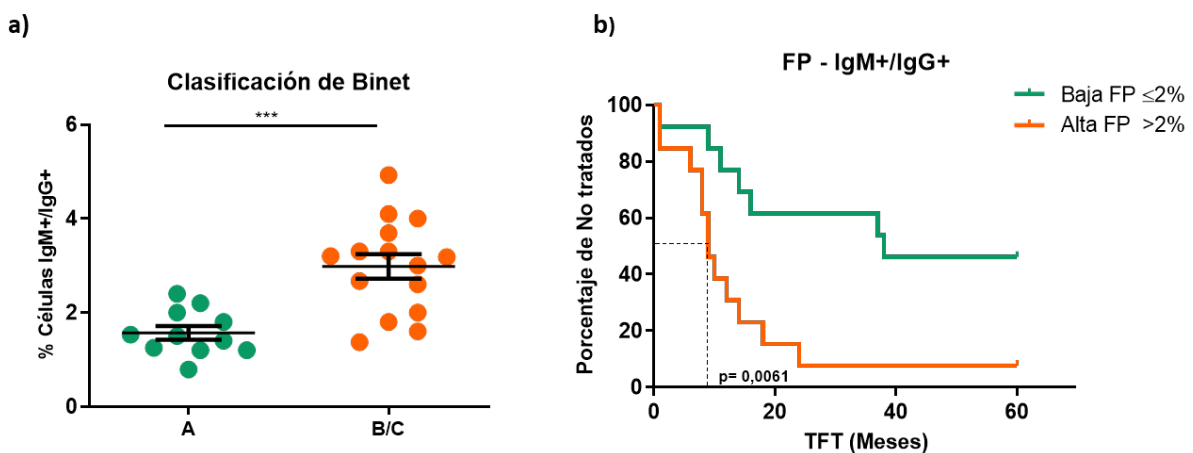


Fig. 9 El porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} se asocia a una enfermedad más agresiva. a) Resultados de citometría de flujo muestran mayor expresión de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} en aquellos pacientes que presentaron un estadio Binet B o C al momento del diagnóstico (p:0.0002, *t* Test, *two tailed*); **b)** Los pacientes fueron divididos de acuerdo si presentaban una alta (>2%) o baja (≤2%) frecuencia de FP, y a través de un análisis retrospectivo a 5 años se determinó el TFT de cada uno. Observamos que aquellos pacientes con mayor porcentaje de FP en SP al debut de la enfermedad requirieron tratamiento antes, con una media de TFT de 9 meses, mientras que quienes presentaban una FP ≤2% la media de inicio de tratamiento fue de 38 meses (p: 0,0061, test de Log-rank).

1.3 La FP IgM^{pos}/IgG^{pos} aumenta con la progresión de la enfermedad.

Dado que todos los estudios mostrados anteriormente sugieren una asociación positiva entre el porcentaje de la FP en SP y la evolución clínica del paciente, hipotetizamos que la progresión de la enfermedad podría ir acompañada de un incremento de la subpoblación proliferante IgM^{pos}/IgG^{pos}. Para probar esta hipótesis, se seleccionaron 6 pacientes con diagnóstico de LLC, determinándose por citometría de flujo el porcentaje de FP IgM^{pos}/IgG^{pos} al debut de la enfermedad y al momento de la progresión clínica. Esta última definida por el pasaje a un estadio Binet B o C, o la presencia de síntomas de enfermedad activa con indicación de tratamiento. La media de progresión de este grupo fue de 18 meses, cuyas características clínico-moleculares se muestran en la **tabla 5**.

LLC Nº	Debut o Progresión	Binet	Recuento de linfocitos, x10e3/uL	Perfil IGHV	FISH	AID	LPL	% FP IgM+/IgG+	TFT (Meses)
2	Debut	B	80	No Mut	S/A	(+)	(+)	2,6	24
	Progresión	C	128		del17p/del11q	(+)	(+)	4,7	
3	Debut	A	19,45	No Mut	S/A	(+)	(+)	1,53	37
	Progresión	B	50		N/D	(+)	(+)	4,1	
4	Debut	A	26,2	No Mut	S/A	(+)	(+)	1,25	16
	Progresión	B	75,6		del11q	(+)	(+)	2,17	
5	Debut	B	21,42	No Mut	S/A	(+)	(+)	4	14
	Progresión	C	144,60		S/A	(+)	(+)	5,5	
14	Debut	C	112	No Mut	del17p	(+)	(+)	1,37	11
	Progresión	C	218		N/D	(+)	(+)	4	
15	Debut	B	57	No Mut	S/A	(+)	(+)	2	9
	Progresión	C	168		N/D	(+)	(+)	4,15	

Tabla 5 Caracterización clínica y molecular de pacientes con LLC al debut y en la progresión de la enfermedad. Para cada paciente se incluyó: A) Clasificación clínica de Binet: A, B o C. B) Recuento linfocitario (10x10³ linfocitos/uL) C) Perfil mutacional IgVH: Mutado o No mutado. D) Alteraciones citogenéticas evaluadas por FISH: del13q, del11q, tri12, del17p, sin alteraciones (S/A), no determinado (N/D). E) Expresión de los marcadores moleculares AID y LPL, determinados por PCR y ambos asociados a peor pronóstico F) Porcentaje de expresión de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} G) 'Time to first treatment' (TFT), valor expresado en meses o no tratado (N/T).

El análisis de los resultados indica un incremento significativo de células IgM^{pos}/IgG^{pos} en SP durante la progresión clínica de la enfermedad en todos los individuos evaluados (**p: 0.007, t test, two tailed) (**Fig. 10**). De manera interesantes, a 3 de estos 6 pacientes se les pudo realizar el estudio FISH al tiempo de la evolución y los datos muestran que en dos de ellos (LLC-2 y LLC-4) se detectó una aberración cromosómica de mal pronóstico al momento de la progresión. Así, por ejemplo, el paciente 02 presentó una doble delección (del11q + del17p) y el paciente 04 una del11q, las cuales estaban ausentes al debut de la enfermedad.

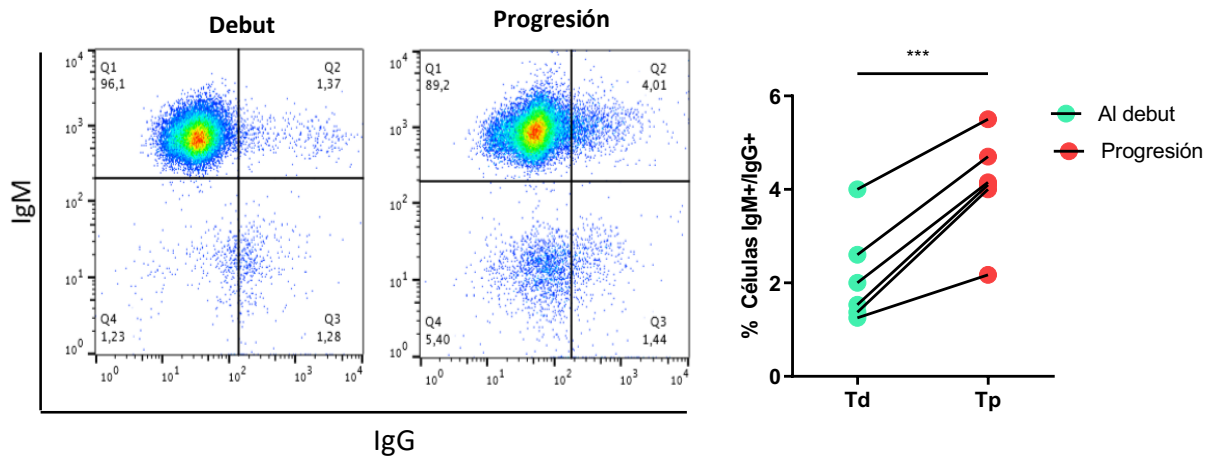


Fig. 10 FP IgM^{pos}/IgG^{pos} durante la progresión clínica de la LLC. Se eligieron 6 pacientes con diagnóstico de LLC y se determinó por citometría de flujo el porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} en SP tanto al debut (Td) como al momento de la progresión clínica (Tp). A la izquierda se muestran gráficos de punto de un paciente representativo, evidenciándose incremento de la fracción doble positiva para IgM e IgG en la evolución clínica de la enfermedad. A la derecha se encuentra graficados el resultado de los 6 individuos estudiados, apreciándose un incremento significativo del porcentaje de células IgM^{pos}/IgG^{pos} en la progresión (**p: 0.007, t test).

2. La FP es la primera subpoblación tumoral en adquirir la del11q

En la LLC no existe una única alteración cromosómica que la defina, como sí ocurre en otras patologías hemato-oncológicas de células B. Sin embargo, en un 82% de los pacientes es posible encontrar principalmente deleciones, ya sea al debut o en la progresión clínica de la enfermedad. A pesar de la alta frecuencia de estas alteraciones citogenéticas en la LLC, aún se desconocen los mecanismos involucrados en su generación. Diferentes trabajos han demostrado una asociación entre la expresión de AID y la presencia de aberraciones cromosómicas de mal pronóstico en esta leucemia (Heintel et al., 2004; Leuenberger et al., 2010; Patten et al., 2012; Gelmez et al., 2014). Es posible que el microambiente tumoral conlleve a la proliferación y a la expresión sostenida de AID en el linfocito B leucémico, y dada la acción mutagénica de esta enzima, consideramos posible que los daños que esta genera en el ADN podrían contribuir al origen de las alteraciones cromosómicas descritas en esta patología.

Tomando en cuenta estas observaciones y partiendo del hecho que en la LLC las células proliferantes son las que mayoritariamente expresan la enzima AID (Palacios et al., 2010; Patten et al., 2012; Huemer et al. 2014) decidimos determinar si la del11q y la del17p, involucrando los genes *ATM* y *TP53* respectivamente, son encontradas diferencialmente en la FP respecto a la FQ. Para llevar a cabo este objetivo, se seleccionaron 7 pacientes AID positivos con un perfil IgVH No mut y se realizó purificación celular por 'cell sorting' de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} y la FQ IgM^{pos}/IgG^{neg} al debut y al tiempo de la progresión. Una vez obtenidas las 2 subpoblaciones en las dos etapas de

la enfermedad, se prosiguió a la realización y análisis de estas deleciones por FISH. Para cada muestra se contaron 300 núcleos y se estableció como punto de corte 5% de núcleos positivos para hacer un diagnóstico de del11q o del17p, de acuerdo con la estandarización reportada por el Consorcio de Investigación en LLC (Smoley et al., 2010).

Los resultados muestran que, de los 7 pacientes evaluados, todos fueron negativos para la del11q en la FQ al momento del debut. Por su parte en la FP, 4 pacientes (57,14%) fueron positivos, 2 presentan un resultado normal; y en el paciente LLC-03 se contabilizó 3,33% de núcleos con pérdida de ATM. Los 5 pacientes que presentaron núcleos con pérdida de ATM en la FP, pero no en la FQ al momento del debut, pasaron a ser positivos para la del11q en su FQ cuando se evaluó luego de la progresión clínica. Por su parte, la muestra LLC-07 comienza a ser positiva para del11q solamente en la FP y no en la FQ cuando la enfermedad progresa (**Fig. 11**). En conjunto, estos datos sugieren que la FP es la primera en adquirir la del11q.

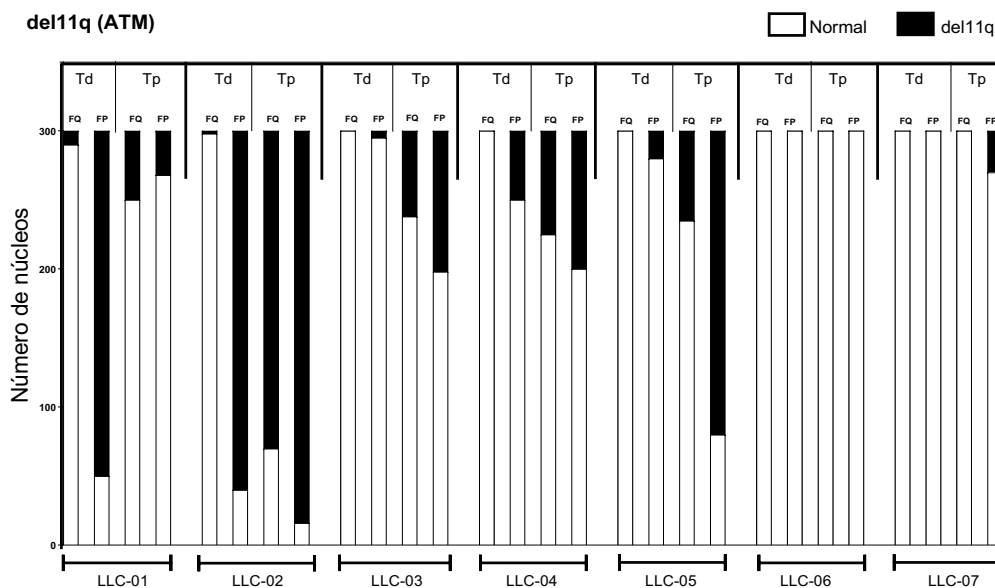


Fig. 11 Evaluación de la del11q en la FQ y FP. La FP IgM^{pos}/IgG^{pos} y la FQ IgM^{pos}/IgG^{neg} fueron aisladas de 7 pacientes AID+ y con un perfil IgVH No Mut tanto al debut como en la progresión de la enfermedad. Posteriormente se realizó el FISH para el gen *ATM*, se contaron 300 núcleos por muestra y se determinó un punto de corte $\geq 5\%$ para definir positividad de la deleción. Los resultados muestran que, en 5 de los 7 pacientes evaluados, que corresponde a un 71,42% de la muestra, la FP es la primera en adquirir la del11q, y que luego durante la progresión clínica dicha alteración citogenética se extiende al clon tumoral total.

En cuanto a la del17p, el paciente LLC-01 y LLC-03 muestran un comportamiento similar a lo observado con la del11q, donde la FP es la primera en adquirir la deleción de *TP53* y luego se extiende al clon tumoral total durante la progresión. Sin embargo, esto no se observó en el resto de los pacientes involucrados en el estudio (**Fig. 12**).

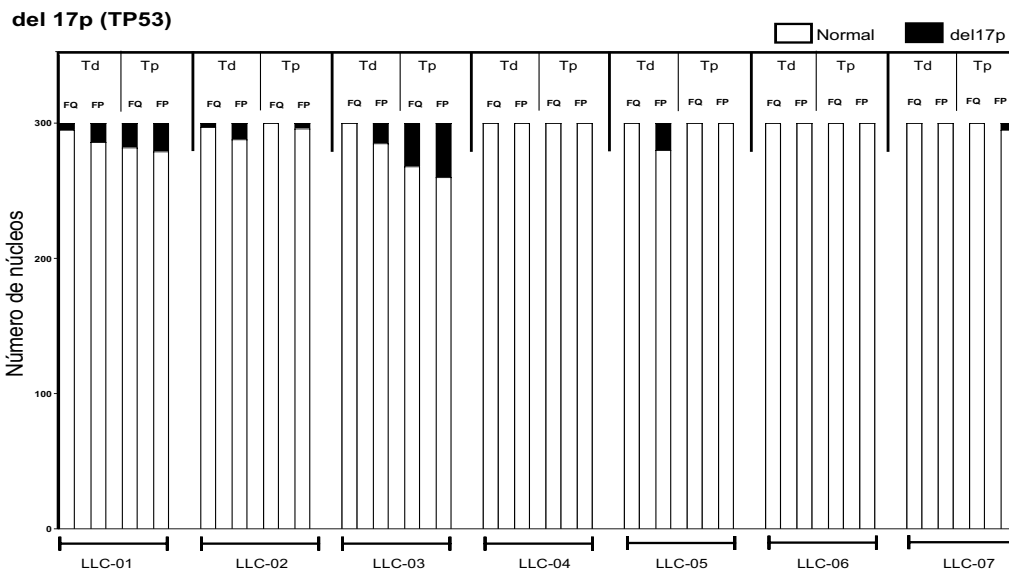


Fig. 12 Evaluación de la del17p en la FQ y FP. La FP IgM^{pos}/IgG^{pos} y la FQ IgM^{pos}/IgG^{neg} fueron aisladas de 7 pacientes AID+ y con un perfil IgVH No Mut tanto al debut como en la progresión de la enfermedad. Posteriormente se realizó el FISH para el gen *TP53*, se contaron 300 núcleos por muestra y se determinó un punto de corte $\geq 5\%$ para definir positividad de la delección. Los resultados muestran que, en el paciente LLC-01 y LLC-03 la FP adquiere primero la del17p y luego durante la progresión clínica se extiende también a la FQ. Sin embargo, en el resto de los individuos analizados esta tendencia no fue confirmada.

Dado a que existen trabajos que demuestran que la enzima AID es requerida para la generación de la translocación *C-MYC/IGH* en los linfomas de Burkitt (Ramiro et al., 2004; Duquette et al., 2005) y que dicha alteración cromosómica no ha sido descrita en LLC cuando se estudia la citogenética de todo el clon tumoral, decidimos determinar si en la FP esta translocación estaba presente. Para ello, se evaluó también *C-MYC* por FISH en 3 pacientes, obteniéndose como resultado que tanto la FP como la FQ no muestran esta alteración citogenética al debut de la enfermedad. Este dato confirma que la translocación *C-MYC/IGH* no ocurre en las células de LLC a pesar de la expresión de la enzima AID, y representa un control de especificidad de lo observado para la del11q (Fig. 13).

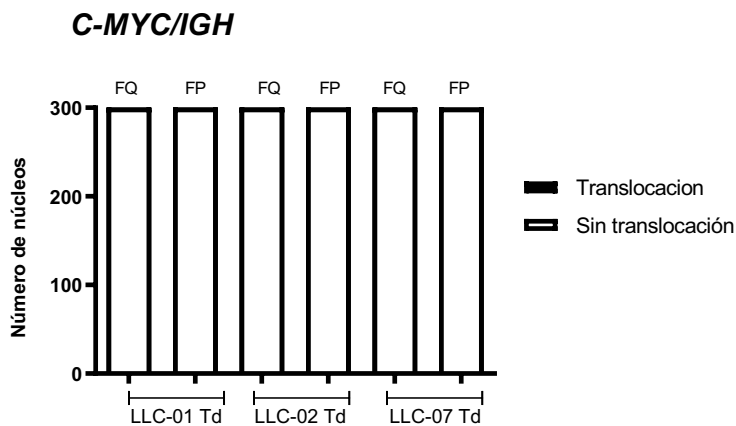


Fig. 13 Translocación C-MYC/IGH en la FQ y FP. Se muestra el resultado del FISH de 3 pacientes con diagnóstico de LLC, en cada uno se evaluó la presencia de la translocación *C-MYC/IGH* tanto en la FQ IgM^{pos}/IgG^{neg} como en la FP IgM^{pos}/IgG^{pos} al debut de la enfermedad, los resultados revelan que ambas subpoblaciones tumorales son negativas para esta alteración citogenética.

3. El tratamiento con ibrutinib disminuye el porcentaje de las FPs y la expresión de la enzima AID.

El ibrutinib es un inhibidor irreversible de la enzima BTK que ha mostrado una satisfactoria respuesta clínica en la LLC, especialmente en aquellos pacientes con del(17p) o mutación en *TP53* (Burger et al, 2015; Ahn et al., 2018). Dado que esta droga bloquea la señalización mediada por el BCR, parte de su éxito se ha atribuido a la inhibición de la proliferación del clon leucémico (Herman et al., 2014; Burger et al., 2017). Sin embargo, el efecto directo del ibrutinib sobre las poblaciones proliferantes no ha sido estudiado aún. En este contexto y en colaboración con el laboratorio del Dr. Jan Burger en el MD Anderson Cancer Center, decidimos evaluar el porcentaje de diferentes FPs, antes y después del tratamiento con ibrutinib. La cohorte de estudio en este caso estuvo conformada por 10 pacientes con diagnóstico de LLC de características clínicas agresivas, quienes recibieron ibrutinib en el contexto del estudio clínico NCT02007044 (ClinicalTrials.gov).

Los resultados obtenidos fueron publicados en la revista *Blood* en el año 2019 y forman parte de este trabajo de tesis (Morande & Sivina, 2019). En ese manuscrito reportamos una disminución significativa de las FPs IgM^{pos}/IgG^{pos} y $CXCR4^{low}/CD5^{high}$ a partir de la semana 1 de tratamiento. Además, en otras FPs como la $CD19^{pos}/Ki-67^{pos}$, $CD19^{pos}/CD38^{pos}$ y $CD19^{pos}/CD86^{pos}$ se evidencia también un descenso significativo de su frecuencia en la semana 4 (**Anexo 1, Fig. 1**).

Por otro lado, al comparar el estado de fosforilación de la vía AKT/PKB en la FP $CXCR4/CD5$ antes y después del ibrutinib, detectamos la desfosforilación de moléculas asociadas a la progresión de la LLC, tales como SYK (Tirosina quinasa de bazo), JAK1 (Quinasa Janus 1) y AKT1 después del tratamiento (**Anexo 1, Fig. 2**). Estos datos sugieren que el ibrutinib tiene un impacto directo en el estado de fosforilación de moléculas clave en las FPs del clon leucémico, inactivando así importantes vías de señalización en la LLC.

Dado que la expresión anómala de AID en la LLC está sobre representada en las fracciones proliferantes previamente descritas, decidimos evaluar la expresión de esta enzima en las FPs IgM^{pos}/IgG^{pos} y $CXCR4^{low}/CD5^{high}$ antes y luego del tratamiento con ibrutinib. Para ello se utilizó la técnica de citometría de flujo y los resultados muestran que se observa: 1) un descenso estadísticamente significativo de las células AID^{pos} luego de la terapia (**Anexo 1, Fig. 3 a-b**), y 2) una disminución significativa de los niveles de expresión de la enzima AID medidos a través de la intensidad media de fluorescencia (MFI) (**Anexo 1, Fig. 3 c-d**). Estos resultados sugieren que la disminución de AID está dada por una menor presencia de células AID^{pos} , y por un descenso en la expresión de la enzima en la célula tumoral.

En vías de discernir los mecanismos moleculares de acción del ibrutinib sobre la expresión de AID, decidimos estudiar el perfil de expresión de AID en células primarias de LLC estimuladas con CD40L+IL-4 e incubadas en presencia o ausencia de la droga. Detectamos un aumento en la proliferación del clon leucémico en la condición CD40L+IL-4 sin ibrutinib, que disminuye significativamente cuando la droga es agregada al cultivo celular, mientras que la viabilidad del clon tumoral no se ve afectada. De manera interesante, encontramos que esta disminución en la proliferación está acompañada de una disminución en la expresión de AID tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico (**Anexo 1, Fig. 4C**).

Durante la estimulación con IL-4, los monómeros del factor de transcripción STAT6 citoplasmáticos son fosforilados por la Janus quinasa 1 (JAK1) y la Janus quinasa 3 (JAK3) (Witthuhn et al, 1994; Hou et al., 1994). Una vez fosforilado, STAT6 se homodimeriza y es translocado al núcleo con la consecuente expresión de AID, dicho mecanismo es potenciado cuando se combina con CD40L a través de la activación de NF- κ B (Zhou et al., 2003; Dedeoglu et., 2004). Teniendo en cuenta estos datos bibliográficos, en la última parte del manuscrito decidimos evaluar el estado de fosforilación de STAT6 y la expresión de AID por WB después de la activación con CD40L+IL-4, en presencia o ausencia de ibrutinib. Los datos muestran que luego de la activación *in vitro* de células de LLC con CD40L+IL-4, ibrutinib induce la desfosforilación de la Tyr641 de STAT6, efecto que va acompañado de una disminución en la expresión de la enzima AID (**Anexo 1, Fig. 4D**).

En conjunto, estos resultados muestran que ibrutinib no solo ejerce su acción a través de la inhibición del BCR, sino que también está bloqueando la señalización de las quinasas JAK/STAT mediada por IL-4 y CD40L, describiendo así un nuevo mecanismo para esta droga en la inhibición de señales provenientes del microambiente. Este trabajo recibió un comentario en la misma edición de la revista, en donde se resaltan los beneficios del ibrutinib como droga antiproliferativa en el tratamiento de la LLC (Slupsky, 2019).

4. Activación del inflamasoma en la LLC

Todos los datos aportados en la primera parte de la tesis afianzan el rol que tienen las FPs en la fisiopatología de la enfermedad y su asociación con el desarrollo de una LLC más agresiva. Sin embargo, la interacción del LB tumoral con su microambiente es bastante compleja, en ese sentido en la LLC ha sido descrita una paradójica regulación del sistema inmune. Donde el microambiente genera señales proinflamatorias que promueven la supervivencia y proliferación del clon tumoral (Cuní et al., 2004; Schulz et al., 2011; Caligaris-Cappio et al., 2013; Hanna et al., 2017). Sin embargo, la célula leucémica también puede modular negativamente el sistema inmune con la finalidad de promover el crecimiento tumoral y tolerancia inmunológica (Dearden, 2008; Riches & Gribben, 2013; Hanna et al., 2017). En este sentido, el inflamasoma, uno de los componentes de la respuesta inmune innata ha emergido en los últimos años como un mecanismo que puede bien promover o inhibir el desarrollo de neoplasias (Kantono & Guo, 2018; Xia et al., 2019). No obstante, en la LLC es muy poco lo que se conoce de la contribución del inflamasoma en la fisiopatología de la enfermedad. En este sentido en colaboración con el Laboratorio de Inmunorregulación e Inflamación del Institut Pasteur de Montevideo, decidimos explorar la asociación de los canales iónicos TMEM176A y TMEM176B con la activación o no del inflamasoma en la LLC.

4.1 Alta expresión de TMEM176A en pacientes progresores se correlaciona con menor clivaje de GSDM-D.

TMEM176B y su homólogo TMEM176A han sido identificados como canales iónicos inmunomoduladores (Louvet et al., 2005; Segovia et al., 2014); recientemente Segovia, Russo y col. describieron que TMEM176B es capaz de inhibir el inflamasoma NLRP3 a través del control del calcio citosólico (Segovia, Russo et al., 2019). Además, diferentes estudios han asociado la sobreexpresión de ambas a proteínas con varios tipos de cáncer (Cuajungco et al., 2012; Gao et al., 2017; Wang et al., 2017; Sun et al., 2018;).

Resultados previos del grupo de trabajo, demostraron que las células de LLC de pacientes progresores presentan una mayor expresión de la proteína TMEM176A comparado con pacientes indolentes (Rammauro, Tesis de maestría, 2018). Mientras que, no se encontró diferencias en la expresión de TMEM176B entre ambos grupos. De manera interesante, esta sobreexpresión se asocia con disminución de la activación de Casp.1 (Rammauro, Tesis de maestría, 2018). Teniendo en cuenta lo anterior y sabiendo que Casp.1 activa escinde a GSDM-D para generar el fragmento N-terminal responsable de la apertura de poros en la membrana celular que ocurre durante la piroptosis (Ding et al, 2016; Liu et al., 2016; Sborgi et al., 2016), decidimos evaluar mediante WB si existía alguna correlación entre el clivaje de GSDM-D y la expresión de TMEM176A.

Para llevar a cabo este experimento, se realizó WB anti-GSDM-D, anti-TMEM176A y anti-GAPDH en células IgM+ de 14 pacientes con LLC. Posteriormente, la intensidad de las bandas correspondiente a cada una de las proteínas en estudio fue cuantificada por densitometría utilizando el programa Image J. El análisis de estos datos arrojó que existe una correlación negativa entre la expresión de TMEM176A y el clivaje de GSDM-D ($r: -0,78$, $p: 0,001$, Test de Pearson) (**Fig. 14**), este último representado por la relación entre el fragmento p30 de la GSDMD-D con la GSDMD en su forma completa, y normalizadas con valores obtenidos de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Relación GSDMD-p30/GSDMD-FL/GAPDH). Dado que la piroptosis es definida como un tipo de muerte celular mediada por proteínas de la familia GSDM (Galluzzi et al., 2018), podríamos especular que aquellos pacientes progresores con mayor expresión de TMEM176A presentan menos piroptosis.

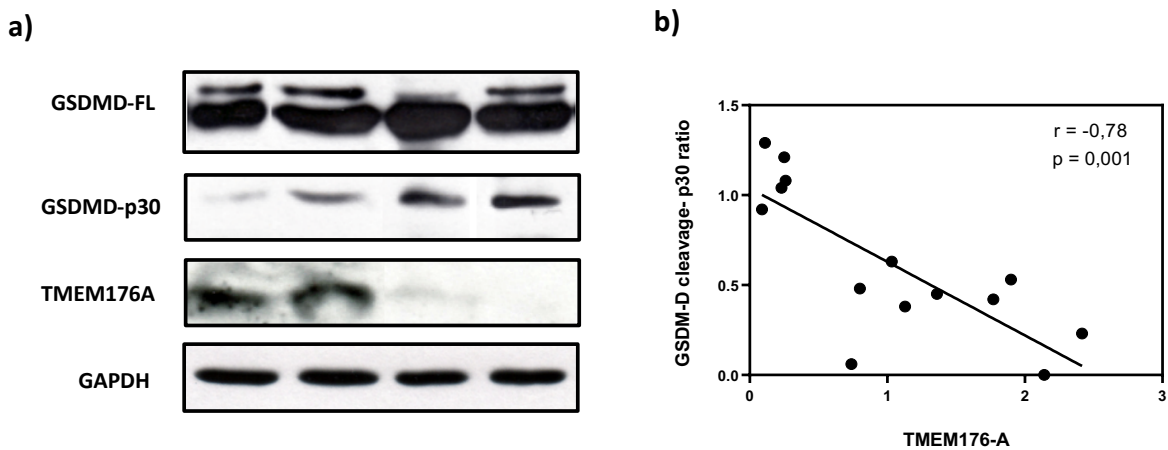


Fig. 14 Correlación entre la expresión de TMEM176A y el clivaje de GSDM-D. A partir de PBMCs de pacientes con LLC, se purificaron células IgM+ utilizando la técnica de separación celular activada por magnetismo (MACS). Posteriormente se lisaron las células y se llevó a cabo WB anti-GSDM-D, anti TMEM176A y anti-GAPDH. **a)** WB representativo de 4 pacientes, donde se puede observar que aquellos individuos que presentan mayor expresión de TMEM176A tienen menos fracción p30 de la GSDM-D, mientras que no hay cambios evidentes en la forma completa de la GSDM-D (GSDM-D FL) en ambas situaciones. Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga. **b)** Cuantificación de las bandas de proteínas utilizando el programa Image J, nos permitió determinar la relación TMEM176A/GAPDH y GSDMD-p30/GSDMD-FL/GAPDH para cada una de las muestras (14 en total), observándose una correlación negativa entre la expresión de TMEM176A y el clivaje de GSDM-D ($r: -0,78$, $p: 0,001$, Test de Pearson).

4.2 Células de LLC muestran marcadores de muerte celular piroptótica cuando son puesta en cultivo.

Diversos trabajos han demostrado que las células de LLC puestas en cultivos sin señales de sobrevida externas, tales como CD40L o co-cultivo con células estromales, experimentan apoptosis en un periodo de tiempo corto (Panayiotidis et al., 1996; Burger et al., 2000; Caligaris-Cappio et al., 2003). Tomando en consideración lo anterior decidimos evaluar si la piroptosis desempeña un rol en este fenómeno. Para ello, PBMCs obtenidas de 4 pacientes con diagnóstico de LLC fueron cultivadas con RPMI+4%SFB. Luego de 24 horas las células se lisaron y se realizó un WB anti-GSDMD, comparando así la condición al tiempo 0 y después de 24 horas de cultivo.

Los resultados muestran por un lado que existe expresión en las células de LLC de GSDM-D FL en ambos tiempos, lo cual es esperable ya que se trata de una proteína de expresión relativamente ubicua. De manera interesante, después de 24 horas de cultivo ocurre aumento del clivaje de GSDM-D en la posición D-275, generándose así el fragmento de aproximadamente 30 kDa (GSDM-D p30), involucrado en la piroptosis (**Fig. 15-a**). También se aprecia un incremento del fragmento de 43 kDa (GSDM-D p43) (**Fig. 15-a**), el cual ha sido descrito de ser producido por las casp3/7, que durante la muerte apoptótica inactiva a GSDM-D (Taabazuing et al., 2017)

Para confirmar los datos anteriores, cuantificamos la concentración de la enzima LDH en el sobrenadante, el cual es un marcador ampliamente utilizado para estudiar la muerte celular lítica. Para este experimento, PBMCs de 10 pacientes con LLC y una condición control con células MEC-1 fueron cultivadas en RPMI+4%SFB por 2, 24 y 48 horas, evaluándose así el porcentaje de citotoxicidad espontánea a través de la liberación de LDH. Los resultados muestran un aumento significativo de la concentración de esta enzima a las 24 y 48 horas post cultivo en todas las muestras de pacientes ($p: 0.0194$; $p: <0.0001$, Test Two way ANOVA) (**Fig. 15-b**). Si bien existe una variación interpaciente, en promedio a las 48 horas el 50% de las células presenta liberación de LDH, lo cual se relaciona con una muerte celular lítica compatible con piroptosis. Por su parte en las MEC-1 se observó un ligero descenso en la LDH a las 48 horas (**Fig. 15-b**). Siendo esto esperable, ya que, esta línea celular tiene un tiempo de duplicación de 40 horas (Stacchini et al., 1999). Estos resultados muestran que además de la apoptosis, las células de LLC podrían estar experimentado piroptosis espontánea cuando son puestas en cultivo celular.

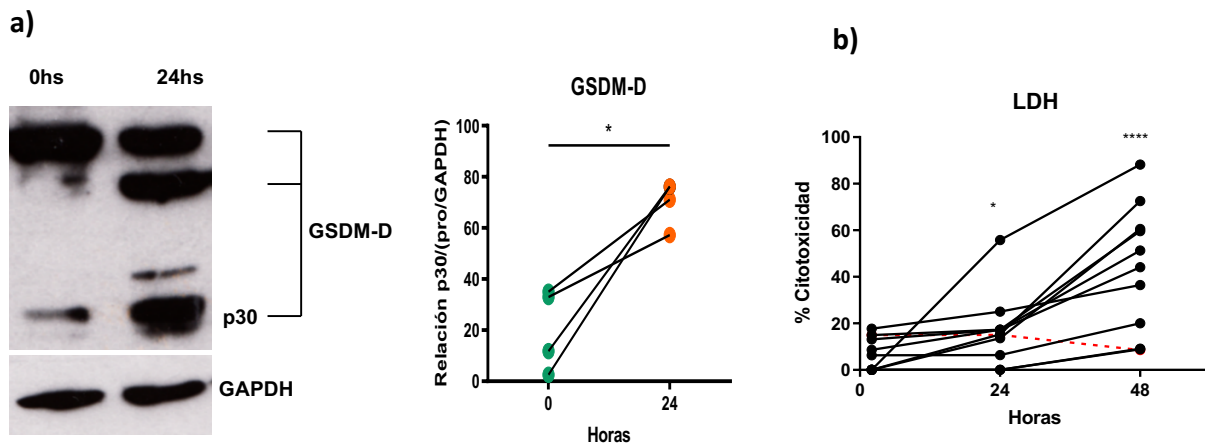


Fig.15 Piroptosis en PBMCs de LLC durante el cultivo celular. a) PBMCs de pacientes con diagnóstico de LLC fueron puestas en cultivo con RPMI+4%SFB por 24 horas. Posteriormente las células fueron lisadas y se llevó a cabo un WB anti-GSDM-D. A la izquierda se puede apreciar una imagen representativa donde se muestra la expresión de GSDM-D FL en ambos tiempos, así como el aumento del fragmento p30 y del p43 a las 24 horas post cultivo. Se procedió a la cuantificación de las bandas por densitometría, usando el programa Image J y normalizada a los valores obtenidos por la enzima GAPDH. A la derecha se muestra una gráfica con los 4 pacientes estudiados mostrando el resultado de la relación entre el fragmento p30-FL-GAPDH, lo cual arroja un incremento estadísticamente significativo del fragmento p30 (* p :0.023, t test) y por ende probablemente de la piroptosis después de 24 horas de cultivo celular. b) PBMCs de 10 pacientes con LLC fueron puestas en cultivo celular por triplicado con RPMI+4%SFB por 2, 24 y 48 horas, midiéndose en cada tiempo la liberación de LDH como marcador de piroptosis, observándose incremento en la concentración de esta enzima a medida que el tiempo avanza, siendo este aumento estadísticamente significativo tanto a las 24 como a las 48 horas (* p : 0.0194; **** p : <0.0001, Test Two way ANOVA), en el mismo experimento se cuantificó la liberación de LDH por parte de la línea celular de LLC, MEC-1, mostrado en la gráfica con la línea discontinua de color rojo, el cual arrojó una ligera disminución a las 48 horas dado probablemente por la proliferación celular.

4.3 Activación del Inflamasoma NLRP3 en células B de LLC.

El inflamasoma NLRP3 es uno de lo más caracterizado y ampliamente estudiado, cuya activación es generado por una variedad de DAMPS y PAMPS. Además, Salaro y col. mostraron expresión de NLRP3 en células de LLC (Salaro y col., 2016). Tomando en cuenta estos datos bibliográficos, decidimos evaluar si este sensor estaba involucrado en la activación del inflamasoma *in vitro* en células de LLC. Para llevar a cabo este experimento, PBMCs aisladas de pacientes con LLC fueron puestas en cultivo celular por 24 horas. Cumplido este tiempo, las células fueron marcadas con anti-IgM y anti-NLRP3. Así mismo, se utilizó la sonda FLICA 660-YVAD-FMK para evaluar Casp.1 activa y el agente intercalante del ADN DAPI como tinción de núcleo.

Como primer resultado se confirmó que las células de LLC expresan la proteína NLRP3, pero además se observó que ésta co-localiza en el citoplasma con Casp.1 activa (**Fig. 16**), sugiriendo así que durante la muerte celular espontánea que experimentan las células de LLC en cultivo, ocurre ensamblaje del inflamasoma NLRP3.

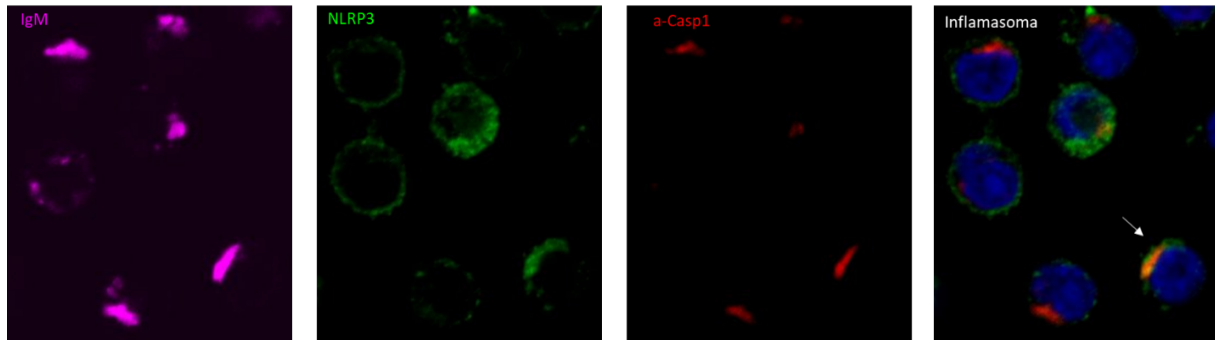


Fig.16 Activación del inflammasoma NLRP3 en células de LLC. Se observó mediante inmunofluorescencia la expresión de la proteína NLRP3 (mostrada en color verde) en células IgM+ (magenta) de pacientes con LLC, después de 24 horas de cultivo. Además, se muestra colocalización del sensor NLRP3 con Casp.1 activa (representada en color rojo), sugiriendo que el inflammasoma NLRP3 es activado en células de LLC durante la muerte celular en cultivo. En azul se muestra el agente intercalante del ADN, DAPI.

5. Modulación farmacológica del inflammasoma en PBMCs de LLC.

Si la sobreexpresión de TMEM176A es uno de los mecanismos responsable de la resistencia a la MCR observada en la LLC, específicamente por inhibición del inflammasoma, entonces al bloquear farmacológicamente esta proteína podríamos promover la muerte del clon tumoral. Con un razonamiento similar, pero orientado a tumores sólidos, Segovia, Russo y col. identificaron al compuesto (+)-BayK8644 como un potente inhibidor de TMEM176A y TMEM176B, cuyo mecanismo de acción es dependiente del flujo de Na⁺ y con afectación mínima de células negativas para TMEM176A/B (Segovia & Russo et al., 2019).

5.1 (+)-BayK8644 estimula la activación del inflammasoma en células primarias de LLC.

Como primer paso decidimos realizar una curva dosis-tiempo-respuesta del BayK8644 para evaluar la acción de la droga en distintas condiciones. Motivo por el cual, PBMCs aisladas de 3 pacientes con LLC fueron puestas en cultivo por duplicado con 5 concentraciones distintas de (+)-BayK8644 (5, 10, 25, 50 y 100 μ M), más una condición control con el vehículo (etanol) y una solo con medio. Después de 6 y 24 horas de cultivo, se evaluó la activación Casp.1 (Casp.1-A) con la sonda FLICA 660-YVAD-FMK en células IgM+, así como la permeabilización de la membrana celular, usando DAPI. Los resultados muestran que a medida que aumenta la concentración del BayK8644 se aprecia claramente un incremento progresivo de células IgM+/Casp.1-A+/DAPI+, así como de aquellas IgM+/Casp.1-A-/DAPI-, llamadas en conjunto células leucémicas moribundas. De igual manera, se observa una mejor respuesta en la condición de 24 horas, en la cual existe un ligero aumento de las células en proceso de muerte a partir de la concentración de 10 μ M en

comparación con el vehículo, sin embargo, esta diferencia se vuelve significativa en la concentración de 50 μM y 100 μM , obteniéndose una media de respuesta de 23,55% y 46,48%, respectivamente ($p: <0.0001$; $p: <0.0001$, Test Two Way ANOVA) (**Fig. 17**).

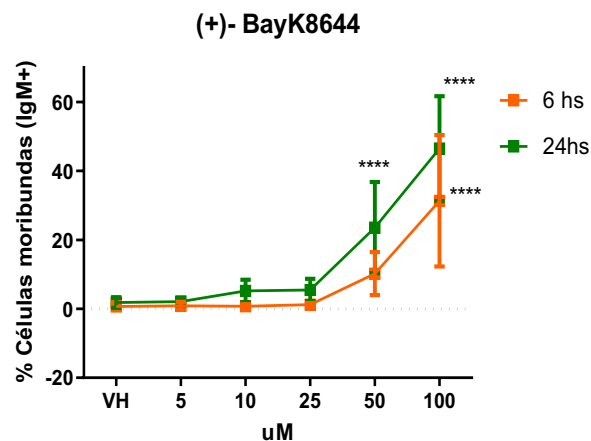


Fig. 17 Curva dosis-tiempo-respuestas del (+)-BayK8644 en PBMCs de LLC. PBMCs de 3 pacientes con LLC fueron puestas en cultivo celular con 5, 10, 25, 50 y 100 μM de (+)-BayK8644 por 6 y 24 horas, cada concentración se realizó por duplicado y se agregaron 2 condiciones controles, una solo con RPMI+4% SFB y otra con el vehículo, correspondiente a etanol. Los resultados de citometría de flujo fueron normalizados con el valor de la condición solo con medio para restar la piroptosis espontánea; el análisis arrojó que posterior a 24 horas de cultivo, y a medida que se aumenta la concentración de la droga existe un incremento progresivo de células IgM+/Casp.1-A+/DAPI+ e IgM+/Casp.1-A+/DAPI-, llamadas en conjunto células moribundas, siendo estadísticamente significativo a partir de la condición de 50 μM . Por su parte a las 6 horas, el aumento de células moribundas es menor (**** $p: <0.0001$; Test Two Way ANOVA).

5.2 Venetoclax promueve la activación de Casp.1 en PBMCs de LLC.

Hasta el punto anterior habíamos identificado un compuesto que a través de la inhibición de TMEM176A y la activación del inflammasoma, promovía la muerte del clon tumoral. Por lo que hipotetizamos que al combinar este tratamiento con una droga que tenga como blanco la apoptosis, podríamos lograr un sinergismo al activar ambas vías. En este sentido, elegimos el Venetoclax (Vcx), un mimético BH3 que tiene como 'target' la proteína BCL-2.

Se procedió a determinar una curva dosis-tiempo-respuesta para el venetoclax, estableciéndose dos puntos de tiempo, 4 y 12 horas; y 4 concentraciones (2.5, 5, 10 y 100 nM), más dos condiciones control, una con vehículo (DMSO) y otra solo con medio. Se eligieron los mismos 3 pacientes testeados para el (+)-BayK8644 y después de cumplidos los intervalos de tiempo pautados se realizó citometría de flujo, evaluando DAPI y activación de Casp.1 en células IgM+. Esperando encontrar, aumento de la permeabilidad celular, pero no de Casp.1 activa.

Sorpresivamente, nuestros resultados muestran un aumento significativo y progresivo de células IgM+/Casp.1-A+/DAPI+ e IgM+/Casp.1-A+/DAPI- en todas las condiciones de la droga tras 12 horas de cultivo (**p: 0.001, ****p <0.0001; Test Two ways ANOVA). De igual manera, a las 4 horas se apreció un incremento significativo en la concentración de 10 nM y 100 nM (**p:0.032; ****p <0.0001; Test Two ways ANOVA) (Fig.18).

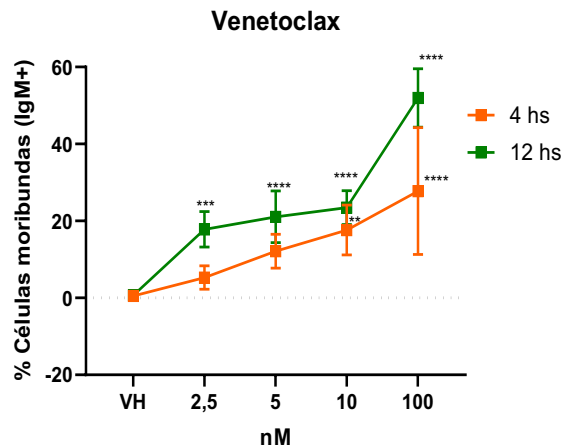


Fig. 18 Curva dosis-tiempo-respuestas del Venetoclax en PBMCs de LLC. PBMCs de 3 pacientes con LLC fueron puestas en cultivo celular con 2.5, 5, 10 y 100 nM de venetoclax por 4 y 12 horas, más un control solo con RPMI+4%SFB y uno con DMSO, correspondiente al vehículo (VH). Se determinó el porcentaje de muerte celular y activación de caspasa sobre células IgM+ por citometría de flujo, previo al análisis a todas las condiciones se le restó el porcentaje de células moribundas generadas espontáneamente (condición solo medio). Los resultados muestran aumento significativo y progresivo de células moribundas (IgM+/Casp.1-A+/DAPI+ e IgM+/Casp.1-A+/DAPI-) tras el tratamiento con venetoclax por 12 horas, del mismo modo en la condición de 4 horas se aprecia el incremento, pero éste es significativo a partir de los 10 nM (**p:0.032; ***p: 0.001, ****p <0.0001; Test Two ways ANOVA).

5.3 El fragmento p30 de la GSDM-D incrementa en respuesta al (+)-BayK8644 y al Venetoclax.

Dado a los resultados anteriores, nos propusimos confirmar que este aumento en la activación de Casp.1 visto con ambas drogas se debía porque efectivamente se estaba promoviendo la piroptosis con el tratamiento. Por lo que, tras elegirse la concentración de 50 μ M por 6 horas para el BayK8644 y la de 10 nM por 4 horas para el venetoclax, PBMCs de pacientes con LLC fueron puestas en cultivo con cada compuesto por separado más una condición control, esta última conteniendo tanto el vehículo DMSO como EtOH. Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron lisadas y se llevó a cabo un WB anti-GSDMD.

Con un total de 10 pacientes analizados, se aprecia un aumento significativo de la fracción p30 de la GSDM-D cuando las células son tratadas tanto con (+)-BayK8644 como con

Venetoclax (**p: 0.0014, *p:0.0118; Test One Way ANOVA) (**Fig. 19**); sin encontrarse diferencias significativas entre ambas drogas. Este resultado confirma que el (+)-BayK8644 promueve la muerte celular por piroptosis. Además, indica que el venetoclax no solo activa la vía de la apoptosis, sino que también estaría generando piroptosis en el clon tumoral.

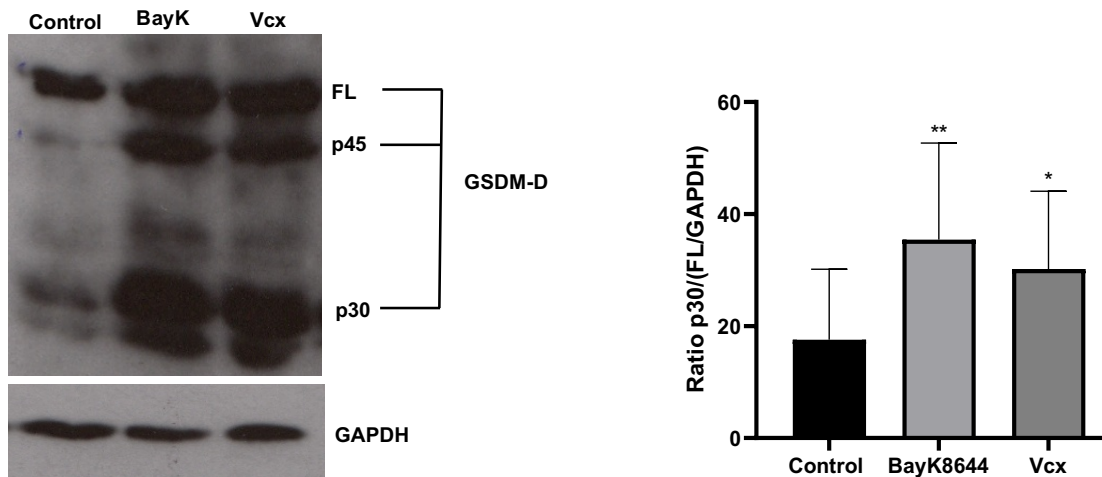


Fig. 19 Clivaje de GSDM-D mediado por (+)-BayK8644 y Venetoclax. PBMCs de pacientes con LLC fueron puestas en cultivo celular con 50 μ M de (+)-BayK8644 por 6 horas, Venetoclax 10 nM por 4 horas, o vehículos (DMSO+EtOH). A la izquierda se muestra un WB de 1 individuo representativo, donde se aprecia aumento de la fracción p30 y p45 de la GSDM-D, independientemente de que las células sean tratadas con BayK8644 o Venetoclax. Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga. La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría, usando el programa Image J, a la derecha se encuentra la gráfica de la relación p30/FL/GAPDH correspondiente a los 10 pacientes analizados, donde se aprecia incremento significativo en ambas condiciones tratadas. (**p: 0.0014, *p:0.0118; Test One Way ANOVA).

5.4 (+)-BayK8644 mejora la acción del venetoclax en células primarias de LLC.

Para evaluar el efecto combinado de ambas drogas cultivamos PBMCs provenientes de 10 pacientes con LLC en presencia de (+)-BayK8644 a 50 μ M o el equivalente a EtOH por 20 horas, transcurrido este tiempo se agregó Venetoclax 10 nM o el equivalente en DMSO por 4 horas más. Una vez recuperadas las PBMCs se realizó la marcación con la sonda FLICA 660-YVAD-FMK para Casp.1 activada y anti-IgM, y como marcador de permeabilidad celular se empleó el agente intercalante DAPI.

Los resultados reproducen lo reportado previamente en este trabajo, donde las células de LLC IgM+ presentan aumento de activación de Casp.1 y muerte tras el tratamiento con (+)-BayK8644 o Venetoclax. Además, se muestra que existe un efecto sumatorio significativo al combinar ambas terapias (*p <0.05, Test one way ANOVA) (**Fig. 20**). Esto sugiere que el (+)-BayK8644 mejora la acción del venetoclax y en este sentido estaríamos frente a un nuevo

compuesto que podría ser complementario a otras drogas aprobadas actualmente en el tratamiento de la LLC, contribuyendo así a ampliar el abanico terapéutico en esta leucemia.

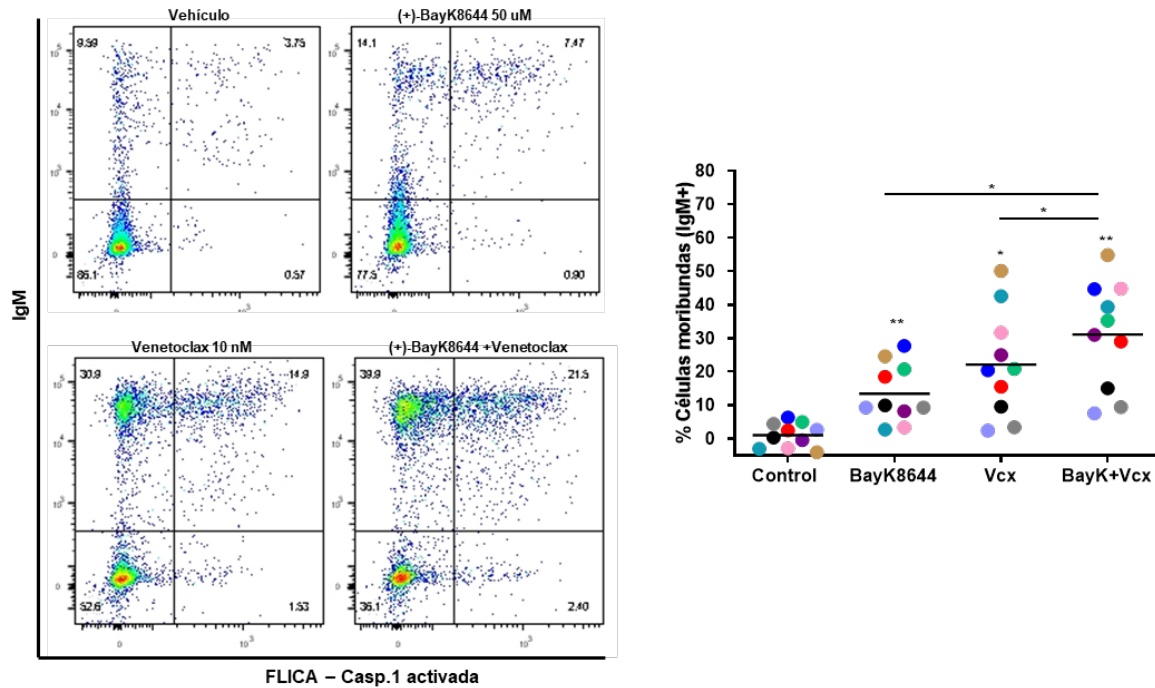


Fig. 20 Efecto combinado del (+)-BayK8644 + Venetoclax en PBMCs de LLC . PBMCs de 10 pacientes con LLC fueron puestas en cultivo con 50 μ M de (+)-BayK8644 o su equivalente de EtOH por 20 horas, transcurrido este tiempo se agregó Venetoclax 10 nM o DMSO, según correspondía, y se mantuvieron las células en cultivo por 4 horas más. Cada condición se hizo por triplicado, y se agregó un control solo con medio. Posteriormente se determinó el porcentaje de células moribundas IgM+ por citometría de flujo, utilizando la sonda FLICA 660-YVAD-FMK para Casp.1 activada y DAPI como marcador de permeabilidad de la membrana celular. A la izquierda se muestran gráficos de punto de un paciente representativo, donde se aprecia el incremento de células moribundas con cada una de las terapias, siendo este porcentaje mayor en la condición combinatoria. A la derecha se aprecia la gráfica con la cohorte total de 10 pacientes, La proporción de células moribundas fue normalizada restando el porcentaje de piroptosis espontánea determinada en la condición solo con medio. Los resultados muestran un incremento significativo de la muerte celular generada por el (+)-BayK8644 y Venetoclax respecto al vehículo, además se aprecia un mejor efecto al combinar ambas drogas (* p <0.05, ** p <0.01, Test one way ANOVA).

6. Modulación farmacológica de TMEM176A en ratones transgénicos E μ -TCL1.

Este modelo murino es caracterizado por la sobreexpresión del oncogén humano TCL1 en linfocitos B bajo el control del promotor V(H)-Ig(H)-E μ , lo cual resulta en un fenotipo de LLC (Bichi et al., 2002). De manera similar a lo que ocurre en humanos, la leucemia desarrollada por estos ratones es caracterizada por expansión clonal de células B IgM+/CD5+. Además, presentan un perfil IgVH No mutado, incrementada proliferación y aumento en la fosforilación de AKT, lo que

se traduce en una forma agresiva de la enfermedad (Bichi et al., 2002; Yan et al., 2006). También ha sido demostrado, que los ratones E μ -TCL1 sobre expresan otras proteínas relevantes en la LLC como BCL-2 (Perkarsky et al., 2016). Al ser un modelo de envejecimiento, las células tumorales recién son detectadas en SP y expandidas a bazo a partir de los 4 meses de edad, mientras que el infiltrado a MO ocurre alrededor a los 8 meses. Característicamente, todos los ratones entre 9-18 meses de edad presentan una enfermedad visible representada por linfocitosis, esplenomegalia y ascitis (Bichi et al., 2002).

6.1 (+)-BayK8644 en combinación con Venetoclax incrementa la muerte celular en esplenocitos aislados de ratones E μ -TCL1.

Dado que el (+)-BayK8644 tiene como target a TMEM176A, nuestro primer paso fue determinar si los ratones E μ -TCL1 expresaban este canal iónico. Por lo que realizamos PCR de punto final a partir de cDNAs extraídos de esplenocitos de ratones con infiltración tumoral mayor a 90% en bazo y como control positivo utilizamos células dendríticas de MO (BMDCs) murinas. Los resultados muestran que los ratones E μ -TCL1 expresan TMEM176A a nivel de ARNm (**Fig. 21-a**).

Una vez confirmado que el modelo murino expresa nuestro blanco terapéutico, procedimos a evaluar la respuesta tanto al (+)-BayK8644 como al Venetoclax, y a la combinación de ambos en células leucémicas IgM+/CD5+ aisladas de bazo de ratones E μ -TCL1 con enfermedad avanzada ($\geq 70\%$ de células leucémicas en bazo). Para ello, se eligieron las mismas concentraciones usadas en PBMCs de LLC humana, correspondiente a 50uM para el (+)-BayK8644 y 10 nM para el Venetoclax, y ambas condiciones fueron incubadas por 6 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación las células fueron recolectadas, marcadas y evaluadas por citometría de flujo. Los resultados muestran un aumento significativo de células DAPI+/Casp.1-A+ dentro del clon tumoral tras el tratamiento con (+)-BayK8644 en comparación con el vehículo, media de 22.58% frente a un 2,58%, respectivamente (**p: 0.002). Por su parte, en el grupo venetoclax la proporción de muerte piroptótica fue de 13.09% (*p: 0.0421). Además, el efecto individual tanto del (+)-BayK8644 como del venetoclax es mejorado al combinar ambas drogas, donde se alcanza una media de muerte de 35,65% (*p:0.0112, ****p <0.0001) (**Fig. 21-b y 21-c**).

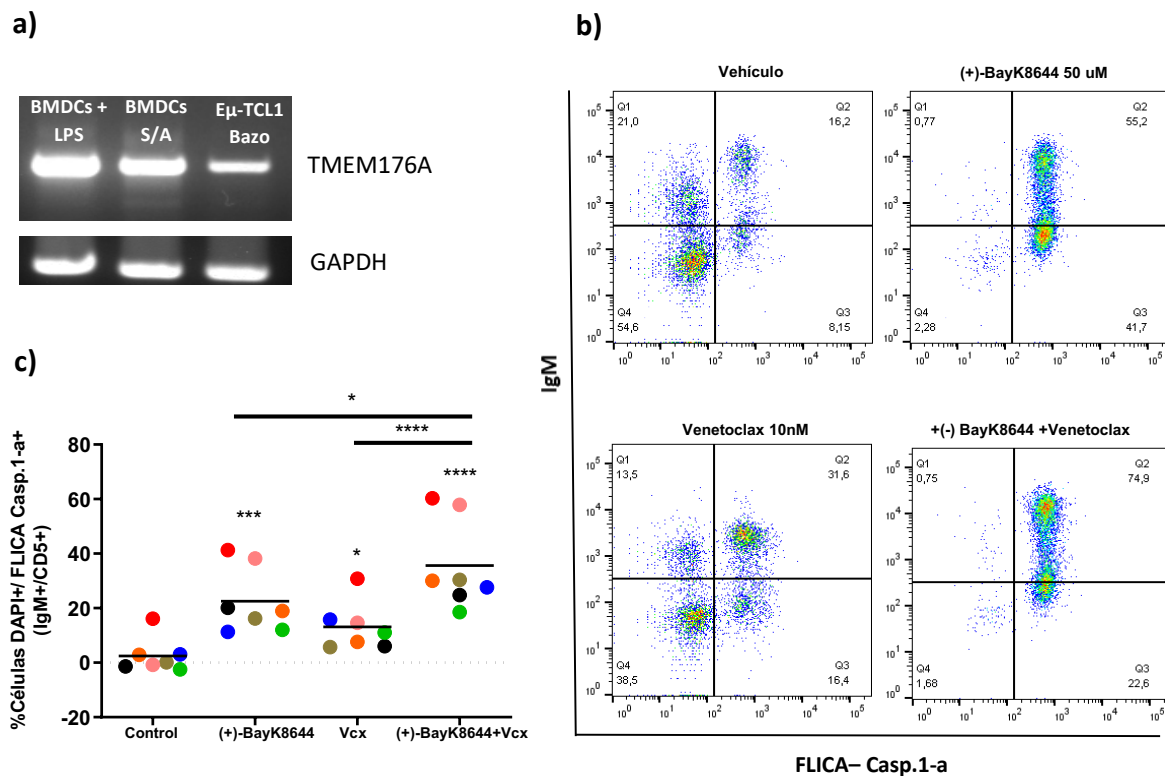


Fig. 21 Efecto combinado del (+)-BayK8644 + Venetoclax en células leucémicas de ratones Eμ-TCL1. a) Se determinó por PCR de punto final la expresión de TMEM176A en esplenocitos aislados de ratones Eμ-TCL1, se usó como control positivo BMDCs de ratones 'wild type' estimuladas con LPS y sin activar (S/A). Se muestra GAPDH como control interno. b) Esplenocitos aislados de ratones Eμ-TCL1 fueron puesto en cultivo celular por triplicado con 50 μM de (+)-BayK8644, 10 nM de Venetoclax o la combinación de ambas drogas por 6 horas, además de dos condiciones control, una que contenía los vehículos de ambos compuestos (EtOH y DMSO), y otro solo con RPMI+4%SFB. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se determinó por citometría de flujo el porcentaje de células Casp.1-A+/DAPI+ dentro del clon leucémico. A la derecha se muestra gráficos de punto de un ratón representativo, donde se aprecia incremento de células doble positivas para DAPI y Casp.1-A en la condición tratada con el (+)-BayK8644 en comparación con el vehículo. De igual manera, ocurre un incremento de la muerte celular con venetoclax, siendo este efecto mejorado en la condición combinatoria. c) Resultados finales de 7 ratones, en los cuales cada condición de las drogas y los vehículos fueron normalizados respecto a la condición solo con medio para restar el porcentaje de muerte celular espontánea, en la gráfica se aprecia un aumento significativo de la muerte pirotótica tras ambos tratamientos, y el efecto se ve aún mejorado al combinar el (+)-BayK8644 y el Venetoclax (*p <0.05, ***p:0.002, ****p <0.0001, Test de comparación múltiple de Tukey).

6.2 Efecto del (+)-BayK8644 y su combinación con el Venetoclax en el modelo de transferencia adoptiva de ratones Eμ-TCL1.

6.2.1 Puesta a punto del modelo de transferencia adoptiva Eμ-TCL1.

De manera similar a lo que ocurre en humanos, donde la LLC tiene una incidencia por lo general en personas mayores de 50 años, el modelo Eμ-TCL1 desarrolla una leucemia tipo LLC a partir de los 8 meses de edad. Si bien, todos los ratones llegan a presentar una enfermedad

franca, este rango se puede extender incluso hasta los 18 meses. Por lo que, el modelo de envejecimiento es un poco complejo a la hora de evaluar respuestas a terapias. Tomando en cuenta lo anterior y tras una pasantía de 3 meses en el Moffitt Cancer Center (Tampa – Florida), durante la cual recibí entrenamiento en el desarrollo y manejo del modelo Eμ-TCL1 de transferencia adoptiva, decidimos aplicar esta estrategia en nuestro proyecto.

La transferencia celular adoptiva (TCA) consiste en transferir esplenocitos de ratones Eμ-TCL1 con alta infiltración tumoral a ratones Eμ-TCL1 jóvenes o ratones *wild type* para acelerar la enfermedad. Al ser una técnica realizada por primera vez en este laboratorio, decidimos corroborar que bajo nuestras condiciones y utilizando esplenocitos criopreservados podíamos tener un desarrollo exitoso de la transferencia. Así que, ratones Eμ-TCL1 jóvenes entre 10-12 semanas de edad recibieron por vía IP 15×10^6 esplenocitos obtenidos a partir de ratones Eμ-TCL1 con un clon tumoral $\geq 70\%$ en bazo. El seguimiento de los ratones se llevó a cabo a través de extracción de SP de la vena submandibular previo al experimento, y en la semana 3, 4 y 5 post TCA. Los resultados muestran aumento del clon tumoral a partir de la semana 3 en el 100% de los ratones receptores, pasando de un porcentaje de células IgM+/CD5+ de alrededor 7% antes de la transferencia a 40% después de 5 semanas (**Fig. 22-a**). Además, el aumento del clon tumoral va acompañado de incremento en la leucocitosis (**Fig. 22-b**) y disminución de las plaquetas (**Fig. 22-c**). Ambos valores anteriores son obtenidos a partir de hemogramas, utilizando el contador hematológico Mindray-BC 5000.

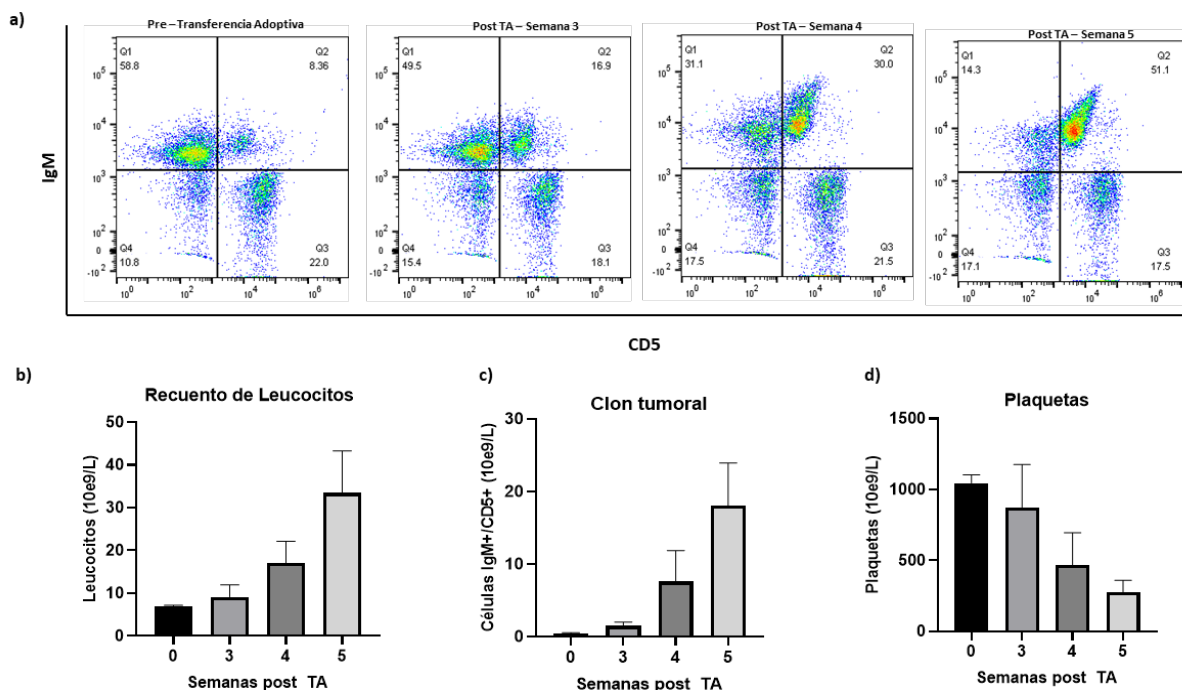


Fig. 22 Transferencia celular adoptiva en ratones Eμ-TCL1. 15×10^6 de esplenocitos criopreservados, aislados de bazo de Eμ-TCL1 con infiltración $\geq 70\%$ de células leucémicas, fueron transferidos por inyección vía IP en ratones Eμ-TCL1 jóvenes, entre 10-12 semanas de edad. Posteriormente, se realizó extracción de SP de la vena submandibular a las 3, 4 y 5 semanas post

TCA con la finalidad de realizar hemogramas y evaluar el clon tumoral por citometría de flujo. **a)** Gráficos de punto de 1 ratón representativo donde se observa un incremento progresivo de células leucémicas IgM+/CD5+ a medida que transcurre las semanas. **b y c)** Se muestra un incremento de la cuenta de glóbulos blancos que va acompañado de la expansión del clon tumoral. **d)** Se aprecia disminución progresiva de las plaquetas posterior a la transferencia adoptiva. n: 05.

6.2.2 Impacto del (+)-BayK8644 y su combinación con Venetoclax en la expansión del clon tumoral.

Una vez puesta a punto la técnica, se realizó TCA a 16 ratones E μ -TCL1 jóvenes, quienes recibieron cada uno por vía IP 10×10^6 de esplenocitos criopreservados obtenidos a partir de un pool de 3 ratones E μ -TCL1 con infiltración tumoral en bazo $\geq 70\%$. Pasada 1 semana de la TA, los ratones fueron divididos en 4 grupos (Control, BayK, venetoclax y BayK+venetoclax) pareados por sexo y leucocitosis para iniciar así el tratamiento.

El(+)-BayK8644 fue administrado por vía IP a una dosis de 1mg/Kg, por su parte el venetoclax se dio por vía enteral utilizando cánulas orofaríngeas a una concentración de 50mg/Kg la primera semana y luego escalada a 100 mg/Kg para el resto del tratamiento, mientras que el grupo control recibió el vehículo de los dos compuestos. Todas las sustancias fueron administradas diariamente por 8 semanas y se realizó extracción de SP semanal, evaluando así el clon tumoral, recuento de leucocitos y plaquetas.

En la figura 18 se muestra un resumen de los resultados semanales del recuento de leucocitos y clon tumoral durante el tratamiento. Apreciándose, un incremento progresivo de leucocitos en los grupos control y BayK hasta la semana 4. Por su parte, en aquellos ratones que recibieron Venetoclax o Venetoclax+BayK8644 ocurre disminución del recuento de glóbulos blancos a partir de la semana 1 hasta la semana 3, probablemente dado por un efecto del venetoclax sobre células no tumorales expresando BCL-2. Interesantemente, a la semana 4 todos los grupos presentan una media de leucocitosis similar (**Fig. 23-a**), que va acompañada de expansión del clon leucémico (**Fig. 23-b**). Esto confirma que los esplenocitos transferidos se expandieron exitosamente en todos los ratones receptores.

Después de la semana 4, la leucocitosis en el grupo control sigue aumentando progresivamente, mientras que en el grupo BayK comienza a disminuir e incluso se mantiene estable después de la interrupción del tratamiento (semana 9 y 10) (**Fig. 23**). Por su parte, el grupo venetoclax presenta un incremento acentuado de la leucocitosis y del clon tumoral (**Fig. 23**), lo cual concuerda con publicaciones previas que demuestran que los ratones E μ -TCL1 son resistentes al venetoclax como monoterapia (Carter et al., 2017; Patel et al., 2018; Ten Hacken et al., 2018). En cuanto a los ratones tratados con ambas drogas, en la semana 5 y 6 el recuento de leucocitos muestra una curva que se mantiene por debajo de la determinada para cada

tratamiento de forma individual (**Fig. 23-a**). Sin embargo, al enfocarnos en el comportamiento del clon tumoral, éste presenta una media similar tanto en el grupo BayK como en el BayK+venetoclax, e incluso a partir de la semana 8 el grupo BayK+venetoclax comienza a presentar valores superiores comparado al grupo BayK (**Fig. 23-b**). Esto sugiere que las diferencias vistas entre el grupo venetoclax y BayK+Venetoclax es dado por la acción del BayK y no por un efecto combinatorio de ambos tratamientos. Cabe destacar que, el número de ratones incluidos en este estudio es bajo, por ende, estos datos deben ser confirmados.

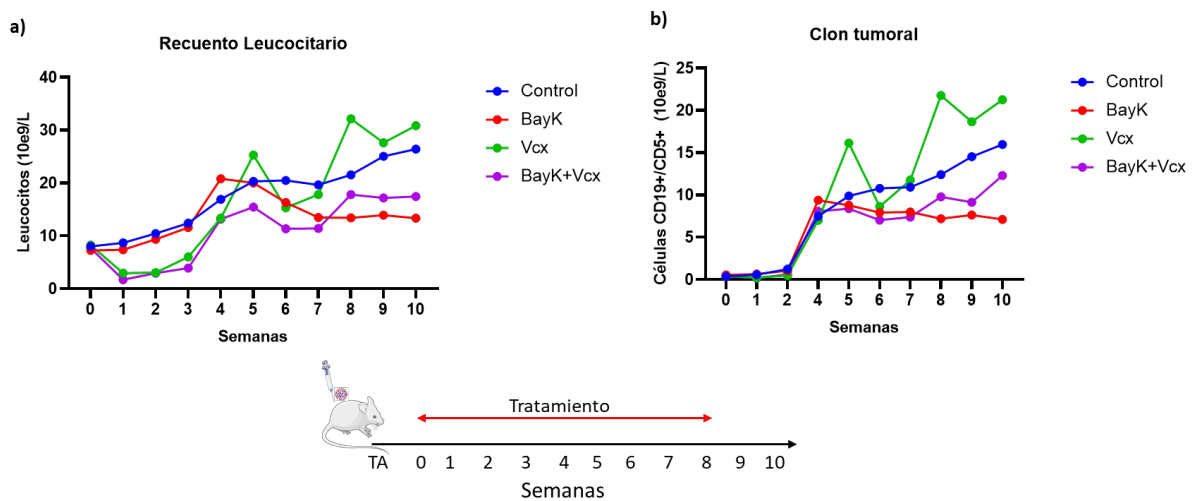


Fig. 23 Administración de (+)-BayK8644 y su combinación con Venetoclax en el modelo de TCA Eμ-TCL1. 16 ratones Eμ-TCL1 jóvenes entre 10-12 semanas de edad recibieron cada uno 10×10^6 de esplenocitos criopreservados, obtenidos a partir del bazo de 3 ratones Eμ-TCL1 con infiltración tumoral $\geq 70\%$. Los ratones fueron divididos en 4 grupos (Control, BayK, Venetoclax y BayK+Venetoclax), y se inició tratamiento 1 semana después de la TCA. Se administró 1 mg/Kg de (+)-BayK8644 por vía IP y venetoclax en la dosis de escalación de 50-100 mg por vía enteral, ambos compuestos fueron administrados diariamente por 8 semanas. Se realizó extracción de SP de la vena submandibular semanalmente, extendiéndose hasta 2 semanas post tratamiento, en cada punto se evaluó hemograma utilizando en equipo Mindray BC- 5000 y el clon tumoral por citometría de flujo. **a)** Se muestra resultados de la media del recuento leucocitos en todos los grupos a medida que transcurre el tiempo **b)** Expansión del clon tumoral en SP, donde se aprecia a la semana 4, expansión del mismo en todos los grupos, y luego maniéndose estable en el grupo BayK y BayK+Venetoclax hasta la semana 8, mientras que aquellos ratones que recibieron solo Venetoclax o el Vehículo de ambas drogas ocurre una expansión del clon tumoral progresiva, si bien se encuentran variaciones en el grupo Venetoclax, la media de estos ratones siempre se ubica por encima de los otros 2 grupos de tratamiento.

A continuación, se muestran los resultados detallados de la semana 10 en cada uno de los grupos. De las observaciones más resaltantes, se puede apreciar que 3 de los 4 ratones correspondiente al grupo BayK mostraron menor leucocitosis y expansión del clon tumoral comparado con el grupo control y venetoclax (**Fig. 24 a-b**). Sin embargo, del grupo BayK+Venetoclax, solo 1 ratón respondió al tratamiento, mientras que los otros 2 presentan valores similares al control y al venetoclax. En cuanto al recuento de plaquetas, todos los animales muestran trombocitopenia (valores menores a $400 \text{ plaquetas} \times 10^9/\text{L}$), sin embargo, ésta es más acentuada en los grupos venetoclax y BayK+venetolax (**Fig. 24 c**). Para la semana 16 los

ratones que recibieron (+)-BayK8644 no habían alcanzado la media de sobrevivida, mientras que éste ubicó en 10,7 semanas para el control, 14.71 semanas para el venetoclax y 13.57 semanas para el grupo BayK+venetoclax (**Fig. 24 d**).

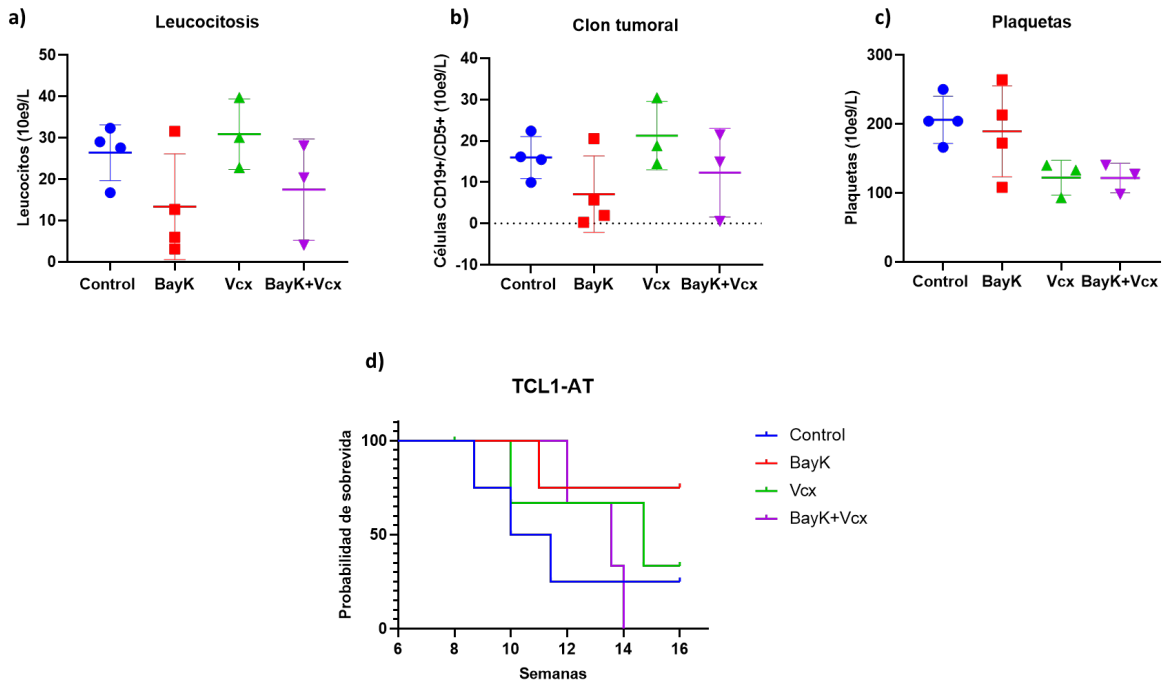


Fig. 24 Respuesta al (+)-BayK8644 y su combinación con Venetoclax tras 10 semanas de seguimiento en el modelo de TCA Eμ-TCL1. **a)** Leucocitosis en los 4 grupos de tratamiento, observándose que 3 de los 4 animales que recibieron (+)-BayK8644 presentaron menor leucocitosis comparado con los grupos control y venetoclax. Sin embargo, al combinar BayK y venetoclax, solo 1 ratón respondió al tratamiento. **b)** La expansión del clon tumoral en SP presenta un comportamiento similar al de la leucocitosis, por lo que la respuesta observada en la cuenta blanca es dependiente de células leucémicas. **c)** El recuento de plaquetas similar en el control y grupo BayK, mientras que e los grupos Vcx y BayK+Vcx esta fue menor **d)** Gráfica de Kaplan-Meier, tras 16 semanas de seguimiento, se aprecia que el grupo control presenta una menor sobrevivida, con una media de 10.71 semanas. Por su parte, la media de sobrevivida para el grupo venetoclax y BayK+Venetoclax se ubicó en 14.71 y 13.57 semanas, respectivamente. Mientras que, aquellos ratones que recibieron BayK más del 50% se encuentran vivos en la semana 16. Es importante destacar que, si bien todos los grupos iniciaron con un número de 4 animales, hay 2 ratones censurados que fallecieron a causa del sangrado, 1 correspondiente al grupo Venetoclax y el otro al BayK+Venetoclax.

Al evaluar el grupo BayK a lo largo de las semanas, se aprecia que la presencia de una leucocitosis más baja en este grupo no se debe solamente a menor expansión de linfocitos B leucémicos, sino también a una disminución del clon tumoral una vez expandido. En la **Fig. 25.a** se muestran gráficos de punto de un ratón representativo de este grupo, donde se aprecia aumento de células CD19+CD5+ en SP en la semana 4. Sin embargo, en la semana 8 del tratamiento, ésta se ubica en valores similares al determinado pre TCA. Disminución del clon tumoral se observó en todos los ratones tratados con BayK a lo largo del tratamiento, aunque no todos respondieron de la misma manera ni en la misma semana (**Fig. 25.c-d**).

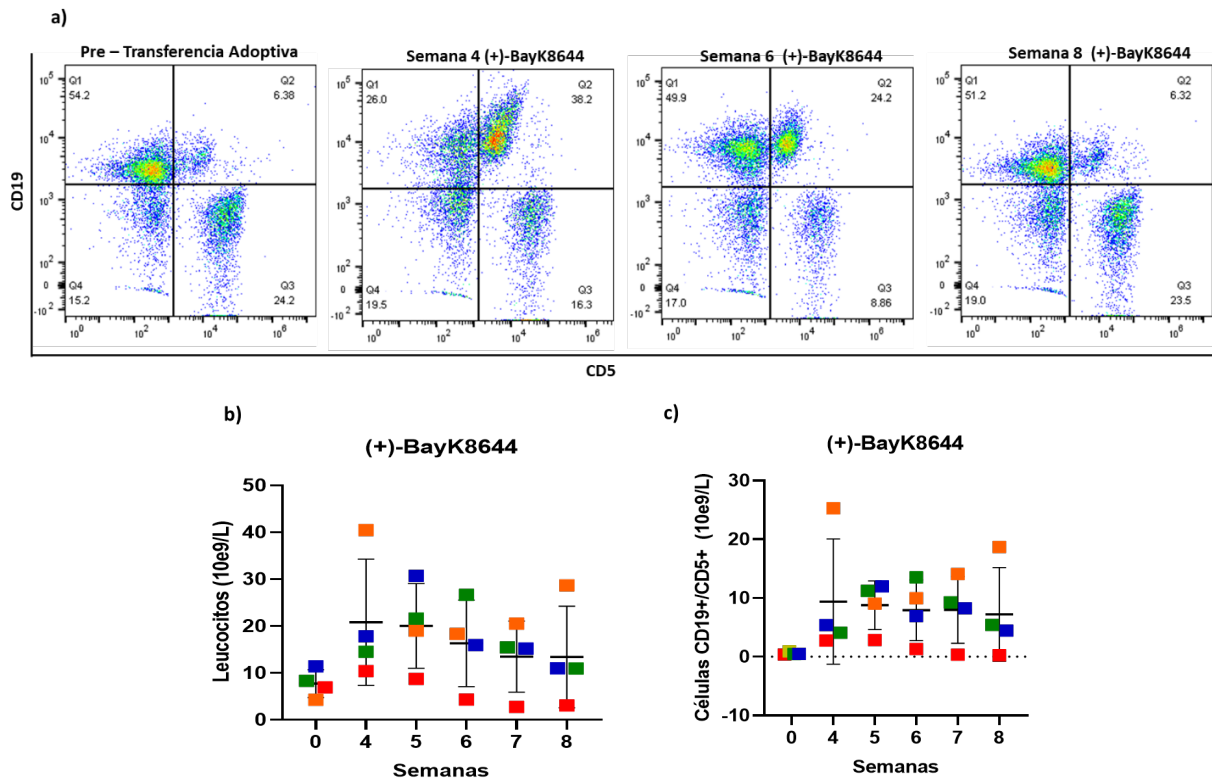
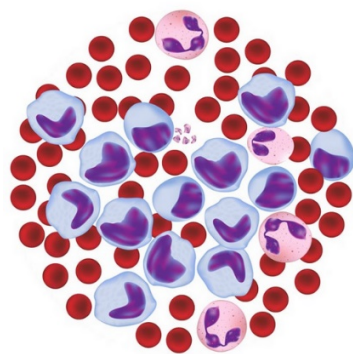


Fig. 25 Efecto del (+)-BayK8644 sobre el clon tumoral en el modelo de transferencia adoptiva Eμ-TCL1. a) Se muestran gráficos de punto, correspondiente a resultados de citometría de células CD19+/CD5+ de un ratón representativo del grupo tratado con (+)-BayK8644, donde se aprecia expansión del clon tumoral en la semana 4, a pesar de recibir tratamiento. Sin embargo, en la semana 6 ocurre disminución del porcentaje de células leucémicas, alcanzando en la semana 8 valores similares a los observados antes de la transferencia adoptiva. **b)** Cada ratón del grupo está representado por un color distinto, apreciándose que además de disminuir el porcentaje de células leucémicas, ocurre también un descenso de la leucocitosis evaluado por hemograma usando el equipo Mindray- BC 5000. Si bien, no todos los ratones presentan esta respuesta al mismo tiempo, en la semana 8 todos los animales han experimentado disminución con estabilización de la cuenta blanca, a excepción del ratón naranja que es el único que progresa después de mostrar respuesta al (+)-BayK8644. **c)** Resultados de los 4 ratones del grupo BayK, correspondiente al clon tumoral expresado en valores absolutos.



Discusión y Conclusiones

La LLC es una enfermedad con una evolución clínica heterogénea, en la cual algunos pacientes cursan con una patología estable sin requerir tratamiento, mientras que otros desarrollan una leucemia más agresiva. A pesar de los enormes avances terapéuticos, en la actualidad la LLC es considerada una neoplasia incurable. Por lo que, la identificación de los mecanismos implicados en la progresión de la enfermedad sigue siendo un foco de interés y una necesidad en esta leucemia.

En este sentido, en la LLC ha sido descrita la presencia LB tumorales con una alta capacidad proliferativa. Un desbalance entre la fracción quiescente y proliferante existentes dentro del clon tumoral de cada paciente podría estar determinando el curso de la enfermedad (Messmer et al., 2005). En el 2010 nuestro grupo identificó una fracción de LB leucémicos específicamente en pacientes no mutados y progresores. Esta subpoblación mostraba un activo cambio de clase, una alta expresión de la enzima mutagénica AID, y del marcador de proliferación celular KI-67 (Palacios et al., 2010). Posteriormente, los trabajos publicados de manera independiente por Patten y Huemer, muestran que AID también es expresada en la FP CXCR4^{low}/CD5^{high} (Patten et al., 2011), así como en la CD86 (Huemer et al., 2014). Todos estos resultados sugieren que la interacción del LB leucémico con un microambiente tumoral activado estaría promoviendo la expresión de esta enzima en las células de LLC.

AID es de vital importancia para la ejecución de una correcta respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, debido a su acción mutagénica la expresión de esta enzima ha sido vinculada con la generación de translocaciones en linfomas de células B (Duquette et al., 2005; Pérez-Durán et al., 2007; Robbiani et al., 2009). Acorde con esto, Ramiro y col. demostraron que en ausencia de AID la translocación *C-MYC/IGH*, característica del linfoma de Burkitt, no ocurre en ratones transgénicos para IL-6 (Ramiro et al., 2004). En el mismo sentido en el modelo murino BCL6 la deficiencia de AID previno la formación de linfomas No Hodgkin (Pasqualucci et al., 2008). Específicamente en el caso de la LLC, diversos trabajos describen una asociación entre la expresión AID y la presencia de deleciones cromosómicas de mal pronóstico (Heintel et al., 2004; Leuenberger et al., 2010; Patten et al., 2012; Gelmez et al., 2014), así como con la presencia de posibles mutaciones puntuales de oncogenes o genes supresores de tumor (Montamat-Sicotte D et al., 2013).

Teniendo en cuenta estos datos, decidimos evaluar en una cohorte más grande de pacientes si la FP mostrando un proceso activo de cambio de isotipo estaría asociada a una enfermedad más agresiva, demostrando así la importancia de conocer la existencia de fracciones proliferantes en sangre periférica de pacientes con LLC. Los resultados muestran que existe una asociación entre un alto porcentaje de la FP IgM^{pos}/IgG^{pos}, y la presencia de un perfil IgVH No Mut o estadíos de Binet avanzados. En el mismo sentido nuestros resultados sugieren que la progresión de la enfermedad va acompañada de la expansión de la FP en SP. Otro dato importante es que individuos con presencia de células proliferantes >2% en SP al momento del

debut de la enfermedad, requirieron tratamiento antes que aquellos que tenían un porcentaje menor. Todos estos datos sugieren que la determinación temprana de la subpoblación tumoral IgM^{pos}/IgG^{pos} podría predecir el TFT, dejando así abierta una nueva perspectiva de trabajo destinada a evaluar esta hipótesis en un mayor número de pacientes.

Resultados similares, pero con otra FP fueron presentados por el grupo del Dr. Chiorazzi, quienes al mismo tiempo que se estaba desarrollando este proyecto publicaron un estudio similar. En dicho trabajo, Murphy y col. muestran que una alta tasa de proliferación en etapas tempranas de la enfermedad es un factor pronóstico robusto de progresión clínica y de TFT más cortos (Murphy et al., 2017).

En la LLC la incidencia de alteraciones citogenéticas es alta, ocurriendo en aproximadamente un 80% de los casos (Döhner et al., 2000). Entre éstas, la del13q es la más frecuente, y se asocia a un pronóstico favorable. Por su parte, la del-*TP53* y la del-*ATM* han sido asociadas al desarrollo de una LLC más agresiva y resistencia a la CIT (Döhner et al., 2000; Stilgenbauer et al., 2002; Hallek et al., 2010). La frecuencia de ambas aberraciones cromosómicas aumenta en etapas más avanzadas de la enfermedad (Foá et al., 2013). Por lo que, la identificación de una nueva delección en *TP53* o *ATM* puede ocurrir por una expansión progresiva de un clon que inicialmente presentaba una de estas alteraciones citogenéticas, o la adquisición de ésta con el paso del tiempo. Con este razonamiento y tomando en cuenta la expresión constitutiva de AID en la FP, decidimos comparar la incidencia de la del-*ATM* y del-*TP53* en la FP y la FQ a lo largo de la evolución de la enfermedad

Para este análisis la muestra fue constituida por pacientes AID positivos con un perfil IgVH No Mut. Los resultados muestran que, al momento del diagnóstico de la enfermedad todos los individuos presentaron un FISH negativo para la del-*ATM* en la FQ. Sin embargo, al evaluar la FP, 5 de los 7 pacientes presentaron pérdida de *ATM*. De manera interesante, al comparar estos resultados con las muestras obtenidas de los mismos individuos durante la progresión de la enfermedad, se determinó que todos aquellos que presentaron núcleos con pérdida de *ATM* en la FP al debut de la enfermedad, ahora también presentan positividad en la FQ. Estos datos sugieren, que un estudio de FISH específico sobre la FP al momento del debut de la enfermedad podría identificar con anticipación a aquellos pacientes que desarrollarán la del-*ATM* durante la evolución de la LLC. El mismo análisis se aplicó para evaluar la del-*TP53*. Sin embargo, solo se evidenció una tendencia similar a la encontrada para la del-*ATM* en dos pacientes. Lo cual en parte es esperable dado que la del-*TP53* es un fenómeno menos frecuente en la LLC.

Si bien diferentes trabajos han demostrado una asociación entre la expresión de AID y la presencia de aberraciones cromosómicas de mal pronóstico en la LLC (Heintel et al., 2004; Leuenberger et al., 2010; Patten et al., 2012; Gelmez et al., 2014), éste es el primer estudio evaluando la citogenética de la FP a lo largo de la evolución del tumor en el mismo paciente.

Nuestros datos sugieren que al menos en algunos casos, la FP expresando AID es capaz de adquirir inicialmente la delección del gen *ATM* y que el resto del clon tumoral parece adquirirla después. Aunque la expresión de AID y la coexistencia de alteraciones cromosómicas en la misma población celular no demuestra un fenómeno de causa y efecto, este trabajo aporta más información relacionada a la fuerte asociación entre esta enzima y la generación de mayor inestabilidad genómica en la LLC. El conjunto de estas observaciones deja abiertas algunas preguntas que podrían tener relevancia directa en la evaluación pronóstica en esta leucemia, por ejemplo: ¿La evaluación por FISH con sondas *ATM* y *TP53* en la FP y en la FQ al debut de la enfermedad podría predecir la progresión del paciente con LLC? ¿El hallazgo temprano de delecciones *TP53* y/o *ATM* en las FP es indicio de progresión tumoral? En todo caso para responder dichas preguntas se debe de confirmar estos datos en una cohorte mayor de pacientes.

Dado la importancia que tiene la interacción del LB tumoral con su microambiente, a lo largo de los años se han desarrollado un conjunto de inhibidores enfocados en bloquear la señalización del BCR. Entre los que mejor respuesta clínica han tenido y que han sido aprobados por la FDA, se encuentran el idelalisib, un bloqueante de la isoforma delta de la enzima PI3K (Zirlik and Veelken, 2018); e ibrutinib, un inhibidor irreversible de la BTK (Burger et al., 2014). Experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que ibrutinib es capaz de bloquear la proliferación celular (Herman et al., 2014; Burger et al., 2017). Sin embargo, el efecto directo de esta droga sobre las poblaciones proliferantes no había sido estudiado aún. Por lo tanto, en colaboración con el laboratorio del Dr. Jan Burger en el MD Anderson Cancer Center decidimos evaluar la existencia y el porcentaje de las FP del clon tumoral, así como la expresión de AID, antes y después del tratamiento con ibrutinib en muestras de pacientes que recibieron esta terapia en el marco del estudio clínico NCT02007044 (ClinicalTrials.gov).

Este análisis muestra que interesantemente ocurre una disminución significativa de las FP posterior al ibrutinib. Además, al evaluar el estado de fosforilación de la vía AKT/PKB en la FP CXCR4/CD5 se evidenció que ocurre un aumento en la desfosforilación de moléculas asociadas a la progresión de la LLC, tales como SYK, JAK1, y AKT1 después del tratamiento. Todos estos datos sugieren que ibrutinib tiene un impacto directo en el estado de fosforilación de las FP y que este efecto podría ser el responsable de la disminución de la tasa de proliferación observado en esta subpoblación tumoral.

Previo a nuestro trabajo, Compagno y col. reportaron que ibrutinib incrementa la expresión de la enzima AID en la línea celular MEC-1 de LLC y en otras líneas celulares de linfoma de células B (Compagno et al., 2017). Además, los autores observaron un incremento en la formación de tumores dependiente de AID en ratones tratados con Idelalisib o ibrutinib. Esto generó preocupación en el área hemato-oncológica, ya que, ibrutinib es una terapia que se administra por tiempo indefinido y la descripción de un aumento de la enzima AID como potencial mutágeno dejaba entrever un posible riesgo de mayor inestabilidad genómica y

refractoriedad terapéutica (Fruman & O'Brien, 2017). Sin embargo, los datos publicados hasta ese momento no habían descrito el desarrollo de neoplasias secundarias asociadas al tratamiento con ibrutinib a larga data (Burger et al., 2015), encontrándose de esta manera hipótesis contrarias en la biología de la LLC durante los años 2017-2018. Teniendo en cuenta estas observaciones, decidimos evaluar la expresión de AID a nivel proteico en las FP IgM^{pos}/IgG^{pos} y CXCR4^{low}/CD5^{high}, obtenidas a partir de SP de pacientes tratados con Ibrutinib.

Nuestros resultados muestran una disminución en la expresión de la enzima AID en el clon tumoral, así como también una disminución del número de células leucémicas expresando esta enzima. Debido a lo descrito en el trabajo de Compagno y col., evaluamos también la acción del ibrutinib sobre la línea celular de LLC MEC-1. En este caso, al igual que los autores evidenciamos un aumento de AID posterior al tratamiento *in-vitro* con Ibrutinib. Finalmente, estos resultados muestran que, si bien las líneas celulares son una gran herramienta para el estudio de muchas patologías tumorales. En el caso de la línea MEC-1, ésta no siempre traduce lo que está ocurriendo en las células primarias de pacientes con LLC.

En vías de discernir los mecanismos moleculares de acción del ibrutinib sobre la expresión de AID, también evaluamos el perfil de expresión de esta enzima en células primarias de LLC estimuladas con CD40L+IL-4 incubadas en presencia o no de la droga. Nuestros datos muestran que el ibrutinib es capaz de inhibir la proliferación celular y la expresión de AID a pesar del estímulo generado por CD40L+IL-4. Dado que la activación con IL-4 promueve la fosforilación del factor de transcripción STAT6 para su posterior translocación al núcleo con la consecuente expresión de AID (Dedeoglu et., 2004), decidimos también evaluar el estado de fosforilación de STAT6 y la expresión de AID por WB después de la activación con CD40L+IL-4+ibrutinib. Interesantemente pudimos observar que en presencia de la droga ocurre una disminución de la fosforilación de la Tyr641 de STAT6, y que esta desfosforilación se asocia a disminución en la expresión de AID. De manera interesante, en las células MEC-1 no se evidencia fosforilación de STAT6 en la condición control ni con el tratamiento, sugiriendo así que las diferencias observadas entre la línea celular y los LB tumorales de pacientes con LLC podría ser explicada a través de este mecanismo.

A modo de resumen, podemos concluir que las FP así como la expresión de AID disminuyen tras el tratamiento con ibrutinib. Y que, además esta reducción de AID pareciera ser dependiente de una acción de la droga sobre la vía IL-4/JAK/STAT6. Describimos así un nuevo mecanismo del ibrutinib en la inhibición de señales provenientes del microambiente y sumando datos sobre la seguridad de su uso en el tratamiento de la LLC, como se plantea en (Slupsky, 2019). Parte de estos resultados fueron realizados en el marco de esta tesis y el total de ellos, fueron publicados por nuestro grupo el año pasado en la revista Blood (Morande & Sivina et al., 2019).

Más allá de la señalización generada a través del BCR, la interacción del LB tumoral con su microambiente es bastante compleja, observándose una paradójica regulación del sistema inmune en la LLC. Ha sido descrito que en aproximadamente 10% de los pacientes ocurre una respuesta inmunológica exacerbada que conlleva al desarrollo de citopenias autoinmunes (Mauro et al., 2000; Hamblin, 2006; Moreno et al., 2010). Sin embargo, la alta incidencia de complicaciones infecciosas ha sido atribuida a una respuesta inmune ineficiente en esta patología (Forconi and Moss, 2015). Por lo que, la mayor o menor contribución de un ambiente inflamatorio en la fisiopatología de la LLC ha sido objeto de discusión y estudio a lo largo de los años. Se sabe que en los centros proliferantes la interacción del LB leucémico con células no B lleva a la activación de vías proinflamatorias a través de factores de transcripción como NF- κ B y STAT3 (Cuní et al., 2004, Herishanu et al., 2011; Rozovski et al., 2013). Además, la respuesta clínica obtenida con agentes anti-inflamatorios, tales como glucocorticoides (Greenstein et al., 2000), lenalidomida (Chen et al., 2011; Badoux et al., 2011) e ibrutinib (Burger et al., 2015; Ahn et al., 2018) deja en evidencia la importancia de un microambiente inmunológicamente activado en la supervivencia del clon tumoral. A pesar de todos estos datos, no se puede obviar que en la LLC ocurre también un defecto funcional en las células T, NK, así como también del linaje mieloide que resulta en disminución de la respuesta humoral y celular (Dearden, 2008; Hanna et al., 2017). En este sentido, el grupo de Gribben ha descrito ampliamente que, a pesar del incremento de células CD4^{pos} y CD8^{pos} en la progresión de la enfermedad, éstos muestran un deterioro funcional (Görgün et al., 2005; Ramsay et al., 2008; Riches & Gribben, 2013; Ramsay et al., 2013) y expresión de marcadores de agotamiento celular (Brusa et al., 2013; Riches et al., 2013). De igual manera, ha sido reportado que bajos niveles de componentes del complemento se asocia con una LLC más avanzada (Schlesinger et al., 1996). Estos resultados parecerían sugerir, que la regulación negativa de la respuesta inmune innata y adaptativa podrían tener un rol en la progresión de la enfermedad.

Entre los mecanismos de la respuesta inmune innata, se encuentra el inflammasoma, cuya activación lleva a la secreción de IL-1 β e IL-18, así como a la muerte celular por piroptosis (Sborgi, 2016). En la LLC, la información relacionada acerca del rol del inflammasoma es escasa. Por lo que, en colaboración con el Laboratorio de Inmunorregulación e Inflamación del Institut Pasteur de Montevideo, decidimos explorar en esta neoplasia la función de las proteínas TMEM176A y TMEM176B, durante la progresión de la enfermedad y su asociación con la activación del inflammasoma en pacientes de mal pronóstico clínico. Recientemente Segovia, Russo y Col. describieron que TMEM176B es capaz de inhibir el inflammasoma NLRP3 a través del control del calcio citosólico (Segovia & Russo et al., 2019). Además, la sobreexpresión de estas proteínas ha sido asociada al desarrollo tumoral. Cuajungco y col. mostraron que la expresión de TMEM176A, así como de TMEM176B se encuentra elevada en linfomas, pero no en tejidos normales, y que TMEM176A por si solo está incrementado en carcinoma de pulmón (Cuajungco et al., 2012). Por

otro lado, en cáncer gástrico bajos niveles de ARNm de TMEM176A y TMEM176B han sido correlacionados con mejor supervivencia (Sun et al., 2018).

Resultados previos de esta colaboración enmarcados en la tesis de Maestría de la Lic. Rammauro muestran que pacientes con LLC progresora presentan una mayor expresión de TMEM176A comparado con pacientes indolentes (Rammauro, Tesis de maestría, 2018). Además, de esta observación, resultados en esta tesis lograron correlacionar la sobreexpresión de TMEM176A con una menor activación de la Casp.1. En el mismo sentido, estudios involucrando ARN de interferencias muestran que el *knockdown* de TMEM176A en LB leucémicos promueve la activación de Casp.1 (Rammauro, Tesis de maestría, 2018).

Siguiendo esta línea de investigación, en el presente trabajo de tesis mostramos que una mayor expresión de TMEM176A se correlaciona con menor clivaje de GSDM-D. Por lo que, al producirse menos del fragmento N-terminal de la GSDM-D se estaría previniendo la liberación de citoquinas proinflamatorias y la generación de piroptosis. Estos resultados en conjunto sugieren que, la sobreexpresión de TMEM176A en pacientes progresores se asocia a menor activación del inflammasoma y resistencia a la muerte celular por piroptosis. Estos datos concuerdan con publicaciones previas, donde se describe que pacientes con LLC avanzada presentan menor producción de IL-1 β , mientras que en aquellos con enfermedad estable los valores de IL-1 β son cercanos a los normales (Aguilar-Santelises et al., 1989; Yan et al., 2011; Garley et al., 2016).

La activación del inflammasoma ocurre en dos pasos, el primero conlleva a la transcripción y expresión de NLRP3, pro IL-1 β y pro IL-18 a través de la vía NF- κ B, los cuales se mantienen inactivos en el citoplasma hasta que ocurre el segundo estímulo (Liu et al., 2017). Entre los mecanismos descritos responsable de la activación final del inflammasoma se encuentra el flujo de iones (Moosavi et al., 2018), por lo que TMEM176A al disminuir el calcio citosólico, estaría inhibiendo el ensamblaje del multicomplejo. Si bien resultados previos de nuestro laboratorio (Prieto, Sotelo, Seija et al., 2017) y de otros (Herishanu et al., 2011) ponderan el rol pro-activo de la activación de la vía de señalización NF- κ B en la proliferación tumoral de pacientes con LLC, nuestros resultados sugieren que independientemente de esta activación constitutiva de la vía NF- κ B, la menor liberación de IL-1 β y menor generación de piroptosis observada en los pacientes progresores podría estar siendo explicada en parte por una regulación río abajo a la señalización dada por NF- κ B.

Como se ha venido mencionando reiteradamente, las señales provenientes del microambiente tumoral son esenciales en la supervivencia y proliferación del LB leucémico. Ha sido demostrado que la interacción con NLCs, células estromales y LT conlleva a la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas en el clon tumoral. Además, cuando las células de LLC son puestas en

cultivo sin señales de sobrevida externas éstas no son capaces de proliferar y experimentan muerte celular en un periodo de tiempo corto (Panayiotidis et al., 1996; Burger et al., 2000; Caligaris-Cappio et al., 2003). Tomando en consideración lo anterior decidimos evaluar si la piroptosis desempeña un rol en este fenómeno. Nuestros resultados muestran que ocurre un aumento del fragmento N-terminal de la GSDM-D y de la liberación de LDH tanto a las 24 como a las 48 horas post cultivo. Se aprecia también un incremento del fragmento de GSDM-D de 43 kDa, el cual ha sido descrito de ser producido por las casp3/7 para inactivar a la proteína durante la apoptosis (Taabazuing et al., 2017). Dicho análisis sugiere que, además de la apoptosis, la piroptosis podría estar involucrada en la muerte celular espontánea *in vitro* que experimentan las células de LLC. Además, observamos por inmunofluorescencia que ocurre una colocalización de NLRP3 y Casp.1 activa durante este proceso, por lo que NLRP3 podría ser el sensor involucrado en el ensamblaje del inflamasoma en células de LLC. Este dato concuerda con una publicación realizada en el año 2016 por Salaro y col., quienes describieron que un aumento en la expresión de NLRP3 en células de LLC causa acelerada muerte celular, mientras que bajos niveles de NLRP3 están asociados a una mayor proliferación (Salaro et al., 2016).

La relación entre la piroptosis y el desarrollo tumoral es ambigua, y varía de acuerdo con el tejido involucrado. Por un lado, puede inhibir la ocurrencia y desarrollo de tumores, pero al ser un tipo de muerte celular proinflamatoria puede proporcionar un microambiente adecuado para el crecimiento tumoral. Así, por ejemplo, en NSCLC alta expresión de GSDM-D ha sido asociada con tumores más grandes, estadios avanzados de la clasificación TNM y sobrevidas más cortas (Gao et al., 2018). De igual manera, en melanoma, mama y tumores escamosos de cabeza y cuello se ha demostrado que el inflamasoma NLRP3, IL-1 β e IL-18 promueve el crecimiento tumoral, invasión y metástasis (Ahmad et al., 2013; Weichand et al., 2017; Bae et al., 2017). Sin embargo, la disminución en la expresión de GSDM-D promueve la proliferación celular en cáncer gástrico (Wang et al., 2018). Además, Wei y col. demostraron que la expresión del inflamasoma NLRP3 está disminuido e incluso completamente ausente en hepatocarcinoma, y que hay una correlación negativa entre su expresión y el grado clínico-patológico de la enfermedad (Wei et al., 2014). Basados en los resultados del presente estudio, la LLC pareciera formar parte de este segundo grupo oncológico en donde la inhibición de la piroptosis podría promover la sobrevida del LB tumoral.

Se debe mencionar además que, la inducción de la piroptosis está considerada como un tratamiento potencial en cáncer (Xia et al., 2019). Acorde con esto, Segovia, Russo y col. identificaron al (+)-BayK8644 como un compuesto capaz de activar el inflamasoma a través de la inhibición de TMEM176A y TMEM176B, cuyo mecanismo de acción es dependiente del flujo de Na⁺ y con afectación mínima de células negativas para TMEM176A/B (Segovia & Russo et al., 2019). Igualmente, los autores mostraron que el tratamiento con (+)-BayK8644 controló el

crecimiento tumoral *in vivo* e incrementó la supervivencia en ratones *wild type* portadores de tumores, pero no así en ratones TMEM176B^{-/-} (Segovia & Russo et al., 2019). De manera interesante, cuando este tratamiento es combinado con anti-CTLA-4 o anti-PD-1, mejora la inmunidad antitumoral generada por los inhibidores de punto de control inmunológico (Segovia & Russo et al., 2019).

Considerando que en la LLC los pacientes más progresores presentan un incremento de la expresión de TMEM176A, decidimos evaluar la respuesta al (+)-BayK8644 en células primarias de LLC. Nuestros resultados muestran que ocurre un incremento de la permeabilidad celular, así como de la activación de Casp.1 y del clivaje de GSDM-D cuando las células son cultivadas en presencia de la droga. Sugiriendo así, que la modulación farmacológica de TMEM176A dada por el (+)-BayK8644 podría convertirse en una herramienta terapéutica en la LLC.

Dado que el mecanismo de acción del (+)-BayK8644 implica la activación del inflammasoma con la consecuente muerte celular compatible con piroptosis hipotetizamos que, al combinar este compuesto con el venetoclax, una droga que tiene como blanco la proteína anti-apoptótica BCL-2 podríamos potenciar el efecto de ambos inhibidores. Los resultados muestran que, el (+)-BayK8644 mejoró la acción del venetoclax, y viceversa en células primarias de LLC. De igual manera, evaluamos la acción conjunta de las drogas en cultivo celular utilizando esplenocitos aislados de ratones E μ -TCL1. Para ello, decidimos confirmar primero que en nuestro modelo murino se expresa TMEM176A. Si bien se realizó esta confirmación a nivel de ARNm, por razones metodológicas no fue posible determinar la expresión a nivel proteico. Lo cual sería lo ideal dado que ha sido descrito que la expresión de TMEM176A está regulada, al menos en parte, a nivel postranscripcional en algunas líneas y tejidos tumorales (Wang et al., 2017; Gao et al., 2017). Los resultados muestran que similar a lo encontrado en humanos, en esplenocitos de ratones E μ -TCL1 la combinación de (+)-BayK8644 y venetoclax generó una mejor respuesta que cada inhibidor por separado. Estos resultados nos sugieren que podríamos estar frente a un nuevo compuesto que sería complementario a otras drogas aprobadas actualmente para el tratamiento de la LLC.

Vale destacar que, si bien ocurre un incremento de la muerte celular al combinar ambas drogas, el efecto *in vitro* observado tanto en ratones como en humanos es de tipo sumatorio, y no sinérgico como esperábamos en un principio. Esto podría ser explicado, porque el venetoclax no solo está promoviendo la muerte celular por apoptosis, sino que también ocurre un incremento en la activación de Casp.1 y clivaje de GSDM-D, lo cual sugiere que el mecanismo de acción del venetoclax podría involucrar también la piroptosis, convergiendo de esta manera ambas drogas sobre una vía común. Es probable que el efecto del venetoclax en la activación del inflammasoma sea dado porque este compuesto al unirse a BCL-2 promueve la oligomerización de BAX/BAK, los cuales producen permeabilización de la membrana externa mitocondrial con la

consiguiente liberación de citocromo c, así como de ADN mitocondrial y especies reactivas de oxígeno, siendo estos últimos capaces de activar el inflamasoma NLRP3 (Zhou et al., 2010; Nakahira et al., 2010; Shimada et al., 2012). En concordancia con esto, Vince y col. demostraron que la señalización mediada por BAX/BAK culmina en activación de IL-1 β a través del ensamblaje del inflamasoma NLRP3. Además, los autores mostraron que el ABT-737, otro BH3 mimético que se une con alta afinidad a las proteínas BCL-XL, BCL-2 y BCL-W, en combinación con cicloheximida induce el clivaje de GSDM-D en BMDCs (Vince et al., 2018). Estas observaciones, demuestran que la apoptosis y la piroptosis son dos vías que están altamente interconectadas y reguladas entre sí.

Posteriormente, decidimos evaluar la respuesta al (+)-BayK8644, y su combinación con el venetoclax en el modelo de transferencia adoptiva E μ -TCL1. Para este modelo experimental el tratamiento fue iniciado en el día 8 posterior a la transferencia adoptiva con la finalidad de obtener un mayor margen terapéutico, y además de tratar ratones que no estuviesen con una enfermedad muy avanzada. Posterior a 4 semanas de tratamiento, los 4 grupos de animales (Control, BayK, Venetoclax, BayK-Venetoclax) presentaron un aumento de la leucocitosis y del clon tumoral con valores similares entre ellos, lo cual confirmó que las células transferidas se expandieron en los ratones receptores y hasta esa fecha no se observaba diferencias entre los grupos de tratamiento.

No obstante, entre la semana 5 y 7 el grupo BayK presentó un descenso en la media del recuento absoluto de glóbulos blancos, así como del clon tumoral, manteniéndose este valor estable a lo largo del experimento. En efecto, el análisis de los resultados muestra que de los 4 animales que conforman este grupo, a la semana 10 de seguimiento, 3 mantienen valores inferiores a 10×10^9 células tumorales/Litro, mientras que 1 solo presenta un recuento de LB leucémico similar al grupo control. Este aumento de la sensibilidad al (+)-BayK8644 en este grupo a partir de la semana 5 podría ser explicado, ya sea por un efecto de la cinética de la droga o porque los linfocitos tumorales una vez que comienzan a expandirse en los OLS estarían recibiendo señales del microambiente que podrían llevar, entre otras cosas, a la sobreexpresión de TMEM176A y así promover la supervivencia del clon leucémico, pero al ser éste nuestro blanco terapéutico, incrementaría entonces la sensibilidad a la droga.

Por su parte, los ratones que recibieron solo venetoclax presentaron un incremento de la leucocitosis y del clon tumoral acentuado al pasar de las semanas, lo cual concuerda con publicaciones previas que demuestran que los ratones E μ -TCL1 son resistente al venetoclax, dado probablemente por la alta expresión de BCL-XL y MCL1 en este modelo murino como se describe en (Carter et al., 2017; Patel et al., 2018; Ten Hacken et al., 2018). Pese, a los resultados exitosos obtenidos con el (+)-BayK8644 como monoterapia, solo 1 ratón del grupo BayK-venetoclax presentó un recuento absoluto de células tumorales bajo. Mientras que, los otros 2 tuvieron un

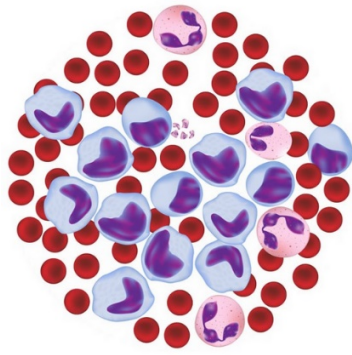
comportamiento similar al grupo control y venetoclax. En cuanto a la sobrevida para la semana 16, el 75% de los ratones tratados con BayK se encontraban aún vivos, mientras que la media de sobrevida se ubicó en 10.7 semanas para el grupo control, y en 14.71 y 13.57 semanas para los grupos Venetoclax y BayK+Venetoclax, respectivamente.

Es importante destacar que el número de animales conformando cada grupo es pequeño, por lo que estos resultados son preliminares y deberían de ser confirmados en nuevos experimentos evaluando su reproducibilidad y en una cohorte mayor de animales para fortalecer la estadística del modelo. Además, sería interesante evaluar el comportamiento del clon tumoral en bazo y MO, así como la expansión o no de otras poblaciones celulares, por ejemplo, determinar el perfil de células T posterior al tratamiento.

Conclusiones

Esta tesis de maestría se centró en identificar nuevos mecanismos asociados a la proliferación y muerte celular que pudiesen estar favoreciendo el desarrollo de una enfermedad más agresiva y la resistencia al tratamiento. En este sentido, los resultados han aportado al conocimiento general de la biología de la LLC de la siguiente manera:

1. Muestran por primera vez que las FP con alta expresión de la enzima AID adquieren primero la del(11q22-23), aportando así más información relacionada a la asociación entre esta enzima y la generación de una mayor inestabilidad genómica del clon leucémico.
2. Sugieren que la medición del porcentaje de la FP al diagnóstico de la enfermedad podría ser usado como un factor pronóstico, dado que ésta parece predecir el TFT y anticipar a aquellos individuos con del(11q22-23).
3. Parte de este trabajo de tesis ayudó a describir por primera vez que el ibrutinib disminuye las FP y la expresión de AID en pacientes tratados con esta droga. Además, se identificó un nuevo mecanismo de acción para el ibrutinib que parecería tener su efecto sobre el clon tumoral a través de la modulación de la vía IL-4/JAK/STAT6.
4. Muestran que la sobre expresión de la proteína TMEM176A se asocia a menor activación del inflammasoma y resistencia a la muerte celular. Sugiriendo así que la piroptosis podría ser otro tipo de muerte celular implicada en la LLC.
5. Sugieren que la modulación farmacológica de TMEM176A a través del compuesto (+)-BayK8644 podría convertirse en una nueva herramienta terapéutica en esta leucemia.



Agradecimientos

Agradecimientos

A Pablo Opezzo, por darme la oportunidad de hacer ciencia y guiarme durante estos casi 4 años.

A Pablo Morande, mi co-tutor, quien presencialmente y en la distancia colaboró en mi crecimiento profesional.

A los miembros del Tribunal, por haber aceptado evaluar este trabajo.

A las agencias financiadoras: ANII, CAP y a quienes de forma anónima hacen posible la Beca Dra. Paulina Luisi.

A todos mis compañeros del laboratorio: Agustín Correa, Catalina Berca, Cecilia Abreu, Chloé Lescale, Claudia Ortega, Daniel Prieto, Francine Potrich, Jorge González, María E. Márquez, Noé Seija y Sandra Sernbo. No solo por ser un eje central en mi formación, sino también por la amistad y el cariño brindado.

A todos los miembros del LIRI. En especial a Marcelo Hill por las discusiones científicas y ser una guía en el mundo del inflammasoma. Y a Florencia Rammauro, por todo el apoyo durante el desarrollo de esta tesis, no pude haber tenido una mejor compañera de camino.

A la plataforma de Citometría de Flujo del Institut Pasteur de Montevideo. Principalmente a Paula Céspedes, por el soporte dado con los citómetros y el *cell sorting*, además su amistad forma parte de los resultados más lindos de esta maestría.

A los integrantes de la plataforma de microscopía del Institut Pasteur de Montevideo, en especial a Marcela Díaz y a Tabaré de los Campos.

A todos los integrantes de la UATE, quienes realizan una labor excepcional para que en el instituto podamos desarrollar experimentación animal de calidad y con ética.

A Faride Uturbey y Analía Sanguinetti del Laboratorio de Citogenética del Hospital Maciel, por toda la colaboración brindada con la realización de los FISH.

A los médicos hematólogos del grupo uruguayo de investigación en LLC.

A todos mis compañeros del Institut Pasteur de Montevideo, que ya sea con un aporte científico o simplemente con su amistad estuvieron ahí mientras daba mis primeros pasos por la ciencia, haciendo este transitar más ameno y fructífero.

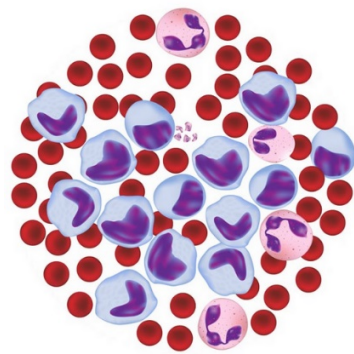
A Uruguay, por las oportunidades brindadas y porque tanto dentro como fuera de esta institución siempre me sentí en casa.

A mi familia, a mi madre y mi padre que son los responsables de la mujer que soy hoy, a mis hermanas que son el motor que me impulsa a seguir siempre hacia adelante. Y por supuesto,

Agradecimientos

a Enyer, mi compañero de vida. Sin tu apoyo nada hubiese sido posible, gracias por comprender que esto más que una carrera es una pasión y por acompañarme hacia nuevas aventuras.

A Dios, por ser mi guía en todo momento.



Bibliografía

- Aguilar-Santelises, M. et al. (1989) 'Low Il-1 beta production in leukemic cells from progressive b cell chronic leukemia (B-CLL).', *Leukemia*, 13(10), pp. 937-942. doi: 10.1016/0145-2126(89)90048-9.
- Ahmad, I. et al. (2013) 'Thymoquinone suppresses metastasis of melanoma cells by inhibition of NLRP3 inflammasome.', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270(1), pp. 70–6. doi: 10.1016/j.taap.2013.03.027.
- Ahn, I. et al. (2018) 'Depth and durability of response to ibrutinib in CLL: 5-year follow-up of a phase 2 study.', *Blood*, 131(21), pp. 2357-2366. doi: 10.1182/blood-2017-12-820910.
- Albesiano, E. et al. (2003) 'Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone', *Blood*, 102(9), pp. 3333–3339. doi: 10.1182/blood-2003-05-1585.
- Allen, I. C. et al. (2010) 'The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer.', *Journal of Experimental Medicine*, 207(5), pp. 1045–1056. doi: 10.1084/jem.20100050.
- Anderson, M.A. et al. (2016) 'The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism.', *Blood*, 127(25), pp. 3215–3224. doi: 10.1182/blood-2016-01-688796.
- Badoux, X.C. et al. (2011) 'Lenalidomide as initial therapy of elderly patients with chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 118(13), pp. 3489–98. doi: 10.1182/blood-2011-03-339077.
- Bae, J. et al. (2017) 'P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome activation in head and neck cancer.', *Oncotarget*, 8(30), pp. 48972-48982. doi: 10.18632/oncotarget.16903.
- Bai, H. et al. (2018) 'Cathepsin B links oxidative stress to the activation of NLRP3 inflammasome.', *Experimental Cell Research*, 362(1), pp. 180–187. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.11.015.
- Balatti, V. et al. (2012) 'NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12.', *Blood*, 119(2), pp. 329–331. doi: 10.1182/blood-2011-10-386144.
- Baliakas, P. et al. (2014) 'Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data.', *American Journal of Hematology*, 89(3), pp. 249–255. doi:10.1002/ajh.23618.
- Bianchi, S. et al. (2010) 'Immunoglobulin heavy chain V-D-J gene rearrangement and mutational status in Uruguayan patients with chronic lymphocytic leukemia', *Leukemia & Lymphoma*, 51(11), pp. 2070–2078. doi: 10.3109/10428194.2010.522283.
- Bichi, R. et al. (2002) 'Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression.', *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(10), pp. 6955–6960. doi: 10.1073/pnas.102181599.
- Billard, C. (2013) 'Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia.', *Oncotarget*, 5(2), pp. 309-325. doi: 10.18632/oncotarget.1480.
- Binet, J. et al. (1981) 'A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis.', *Cancer*, 48(1), pp. 198-206. doi: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1198::aid-cnrcr2820480131>3.0.co;2-v.

- Blombery, P. et al. (2019) 'Acquisition of the recurrent Gly101Val mutation in BCL2 confers resistance to venetoclax in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia.', *Cancer Discovery*, 9(3), pp. 342–353. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1119.
- Bock, F. and Tait, S. (2019) 'Mitochondria as multifaceted regulators of cell death.', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(2), pp. 85-100. doi: 10.1038/s41580-019-0173-8.
- Broz, P. and Dixit, V. (2016) 'Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling', *Nature Reviews Immunology*, 16(7), pp. 407-420. doi: 10.1038/nri.2016.58.
- Brusa, D. et al. (2013) 'The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia.', *Haematologica*, 98(6), pp. 953–963. doi: 10.3324/haematol.2012.077537.
- Burger, J.A, Burger, M. and Kipps, T.J. (1999) 'Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells.', *Blood*, 94(11), pp.3658– 3667. Available on: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10572077/> (Accessed: 14 May 2020).
- Burger, J. A. et al. (2000) 'Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1.', *Blood*, 96(8), pp. 2655–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023495> (Accessed: 15 March 2020).
- Burger, J.A. et al. (2009) '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*, 113(13), pp. 3050–3058. doi: 10.1182/blood-2008-07-170415.
- Burger, J.A. et al. (2009) 'The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies.', *Blood*, 114(16), pp. 3367–3375. doi: 10.1182/blood-2009-06-225326.
- Burger, J.A. et al. (2015) 'Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia.', *New England Journal of Medicine*, 373(25), pp. 2425-2437. doi: 10.1056/NEJMoa1509388.
- Burger, J.A. et al. (2017) 'Leukemia cell proliferation and death in chronic lymphocytic leukemia patients on therapy with the BTK inhibitor ibrutinib.', *JCI*, 2(2):e89904. doi: 10.1172/jci.insight.89904.
- Bürkle, A. and Niedermeier, M. (2007) 'Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B cell chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 110(9), pp. 3316–3325. doi: 10.1182/blood-2007-05-089409.
- Caligaris-Cappio, F. (2003) 'Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia.' *Br J Haematol*, 123 (3), pp. 380-388. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04679.x.
- Calin G.A, et al. (2002) 'Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99(24), pp. 15524-15529. doi: 10.1073/pnas.242606799.
- Calissano, C. et al. (2009) 'In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 114(23), pp. 4832-4842. doi: 10.1182/blood-2009-05-219634.

- Calissano, C. et al. (2011) 'Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells.', *Molecular medicine*, 17(11-12), pp. 1374–1382. doi: 10.2119/molmed.2011.00360.
- Carter, M. et al. (2017) 'PI3K δ inhibition elicits anti-leukemic effects through Bim-dependent apoptosis.', *Leukemia*, 31(6), pp. 1423-1433. doi: 10.1038/leu.2016.333.
- Charalambous, A., Schwarzbich, M.A., Witzens-Harig, M. (2018) 'Ibrutinib.', *Recent results in cancer research*, 212, 133-168. doi: 10.1007/978-3-319-91439-8_7.
- Chen, C.I. et al. (2011) 'Single-agent lenalidomide in the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia.', *J Clin Oncol.*, 29(9), pp. 1175–81. doi: 10.1200/JCO.2010.29.8133.
- Cheng, E. et al. (2001) 'BCL-2, BCL-XL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX and BAK mediated mitochondrial apoptosis.', *Molecular Cell*, 8(3), pp. 705–711. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00320-3.
- Choudhary, G.S. et al. (2015) 'MCL-1 and BCL-xL dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies.', *Cell Death Discovery*, 6(1), pp. e1593. doi: 10.1038/cddis.2014.525.
- Choudhary, M. et al. (2017) 'AID Biology: A pathological and clinical perspective.', *International Reviews of Immunology.*, 37(1), pp. 37-56. doi: 10.1080/08830185.2017.1369980.
- Cimmino, A. et al. (2005) 'miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102(39), pp. 13944-13949. doi: 10.1073/pnas.0506654102.
- Compagno, M. et al. (2017) 'Phosphatidylinositol 3-kinase delta blockade increases genomic instability in B cells.', *Nature*, 542(7642), pp. 489-493. doi: 10.1038/nature21406.
- Condamine, T. et al. (2010) 'Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells.', *Journal of Leukocyte Biology*, 88(3), pp. 507-515. doi: 10.1189/jlb.1109738.
- Cotter, F. (1997) 'Antisense Therapy for Lymphomas.', *Hematological Oncology*, 15(1), pp. 3-11. doi: 10.1002/(sici)1099-1069(199702)15:1<3::aid-hon583>3.0.co;2-s.
- Cuajungco, M.P. et al. (2012) 'Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology.', *Acta Histochem*, 114(7), pp. 705–12. doi: 10.1016/j.acthis.2011.12.006.
- Cuní, S. et al. (2004) 'A sustained activation of PI3K/NF- κ B pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells.', *Leukemia*, 18(8), pp. 1391-1400. doi: 10.1038/sj.leu.2403398.
- Damle, R. N. et al. (1999) 'Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 94(6), pp. 1840–7. Available on: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477712> (Accessed: 13 January 2020).
- Damle, R.N. et al. (2007) 'CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells.', *Blood*, 110(9), pp.3352–3359. doi: 10.1182/blood-2007-04-083832.

- Davids, M.S. and Burger, J.A. (2012) 'Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia.', *Open journal of hematology*, 3(S1), pp.1–4. doi: 10.13055/ojhmt_3_s1_03.120221.
- De Toter, D. et al. (2006) 'Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells.', *Blood*, 107(9), pp.3708–3715. doi: 10.1182/blood-2005-09-3535.
- Deaglio, S. et al. (2005) 'CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival.', *Blood*, 105(8), pp. 3042-3050. doi:10.1182/blood-2004-10-3873.
- Deaglio, S. et al. (2010) 'CD38/CD31 Interactions Activate Genetic Pathways Leading to Proliferation and Migration in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells.', *Molecular medicine*, 16(3-4), pp. 87-91. doi: 10.2119/molmed.2009.00146.
- Dearden, C. (2008) 'Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia.' *Hematology*, 2008(1), pp. 450-456. doi: 10.1182/asheducation-2008.1.450.
- Dedeoglu, F. et al. (2004) 'Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB.', *International immunology*, 16(3), pp: 395-404. doi: 10.1093/intimm/dxh042.
- Delbridge, A. et al. (2016) 'Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies.', *Nature Reviews Cancer*, 16(2), pp. 99-109. doi: 10.1038/nrc.2015.17.
- Dighiero, G. (2003) 'Unsolved issues in CLL biology and management.', *Leukemia*, 17(12), pp.2385-91. doi: 10.1038/sj.leu.2403154.
- Dighiero, G. and Hamblin, T. J. (2008) 'Chronic lymphocytic leukaemia.', *Lancet*, 371(9617), pp. 1017–29. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60456-0.
- Ding, J. et al. (2016) 'Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family.' *Nature*, 535(7610), pp. 111–6. doi: 10.1038/nature18590.
- Döhner, H. et al. (2000) 'Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia.', *New England Journal of Medicine*, 343(16), pp: 1910–1916. doi: 10.1056/NEJM200012283432602.
- Dominguez-Fernandez, R. et al. (2017) 'The Intracellular Chloride Channel Proteins CLIC1 and CLIC4 Induce IL-1 β Transcription and Activate the NLRP3 Inflammasome.', *The Journal of Biological Chemistry*, 292(29), pp. 12077-12087. doi: 10.1074/jbc.M117.797126.
- Drujont, L. et al. (2016) 'ROR γ t+ cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus.', *Scientific Report*, 6(23682), pp. 1-13. doi: 10.1038/srep23682.
- Dupaul-Chicoine, J. et al. (2010) 'Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases.', *Immunity*, 32(3), pp. 367-378. doi: 10.1016/j.immuni.2010.02.012.
- Duquette, M. et al. (2005) 'AID binds to transcription-induced structures in c-MYC that map to regions associated with translocation and hypermutation', *Oncogene*, 24(38), pp. 5791-5798. doi: 10.1038/sj.onc.1208746.

- Eon Kuek, L. et al. (2016) 'The MS4A family: counting past 1, 2 and 3.', *Immunology Cell Biol*, 94(1), pp. 11–23. doi: 10.1038/icb.2015.48.
- Felts, J. et al. (1975) 'The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very lipoproteins and remnants—A new theory.', *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 66(4), pp. 1467–1475. doi: 10.1016/0006-291x(75)90524-0.
- Fischer, K. et al. (2016) 'Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial.', *Blood*, 127(2), pp. 208-215. doi: 10.1182/blood-2015-06-651125.
- Fischer, K. et al. (2019) 'Venetoclax and obinutuzumab in patients with CLL and coexisting conditions.' *New England Journal of Medicine*, 380(23), pp. 2225–2236. doi: 10.1056/NEJMoa1815281.
- Flinn, I. et al. (2019) 'Phase 1b study of venetoclax-obinutuzumab in previously untreated and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 133(26), pp. 2765–2775. doi: 10.1182/blood-2019-01-896290.
- Foá, R. et al. (2013) 'Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia.', *Haematologica*, 28(5), pp. 675-685. doi: 10.3324/haematol.2012.069369.
- Forconi, F. & Moss, P. (2015) 'Perturbation of the Normal Immune System in Patients With CLL.', *Blood*, 126(5), pp. 573-81. doi: 10.1182/blood-2015-03-567388.
- Fruman, D. & O'Brien, S. (2017) 'A Targeted Treatment With Off-Target Risks.', *Nature*, 542(7642), pp. 424-425. doi: 10.1038/nature21504.
- Furman, R.R. et al. (2000) 'Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells.', *J Immunol*, 164(4), pp. 2200–6. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.2200.
- Fürstenau, M., Hallek, M., and Eichhorst, B. (2019) 'Sequential and combination treatments with novel agents in chronic lymphocytic leukemia.', *Haematologica*, 104(11), pp. 2144-2154. doi: 10.3324/haematol.2018.208603.
- Galluzzi, L. et al (2018) 'Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.', *Cell death and differentiation*, 25(3), pp. 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
- Gao, D. et al. (2017) 'Methylation of TMEM176A is an independent prognostic marker and is involved in human colorectal cancer development.', *Epigenetics*, 12(7), pp. 575–83. doi: 10.1080/15592294.2017.1341027.
- Gao, J.W. et al. (2018) 'Downregulation of GSDMD attenuates tumor proliferation via the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway and inhibition of EGFR/Akt signaling and predicts a good prognosis in non-small cell lung cancer.', *Oncology Reports*, 40 (4), pp. 1971-1984. doi: 10.3892/or.2018.6634.
- Garley, M. et al. (2016) 'Expression of IL-1 and IL-6 and their natural regulators in leukocytes of B-cell chronic lymphocytic leukaemia patients.', *Advances in Medical Sciences*, 61(2), pp. 187-192. doi: 10.1016/j.advms.2015.12.006.

- Gelmez, M.Y. et al. (2014) 'Analysis of activation-induced cytidine deaminase mRNA levels in patients with chronic lymphocytic leukemia with different cytogenetic status.', *Leukemia & lymphoma*, 55(2), pp.326–30. doi: 10.3109/10428194.2013.803225.
- Ghia, P. et al. (2006) 'ERIC Recommendations on IGHV Gene Mutational Status Analysis in Chronic Lymphocytic Leukemia.', *Leukemia*, 21(1), pp. 1-3. doi: 10.1038/sj.leu.2404457.
- Ghia, P. et al. (2008) 'Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation.', *J Intern Med.*, 264(6), pp.549-562. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.02030.x.
- Görgün, G. et al. (2005) 'Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells.', 115(7), pp.1797–1805. doi: 10.1172/JCI24176.
- Greenstein, S. et al. (2002) 'Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies.' *Clin Cancer Res.*, 8(6), pp. 1681–94. Available on: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/8/6/1681.long> (Accessed June, 2020).
- Guieze, R. et al. (2019) 'Mitochondrial Reprogramming Underlies Resistance to BCL-2 Inhibition in Lymphoid Malignancies.', *Cancer Cell*, 36, pp. 1-16. doi: 10.1016/j.ccell.2019.08.005.
- Hallek, M. et al. (1999) 'Serum β 2-Microglobulin and Serum Thymidine Kinase are Independent Predictors of Lymphocytic Leukemia and Immunocytoma.', *Leukemia & Lymphoma*, 22(5-6), pp. 439-447. doi: 10.3109/10428199609054782.
- Hallek, M. et al. (2010) 'Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial.', *Lancet*, 376(9747), pp. 1164–1174. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61381-5.
- Hallek, M. et al. (2018) 'iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL.', *Blood*, 131(25), pp. 2745-2760. doi: 10.1182/blood-2017-09-806398.
- Hallek, M. (2019) 'Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment.', *American Journal of Hematology*, 94(11), pp. 1266-1287. doi: 10.1002/ajh.25595.
- Hamblin, T.J. et al. (1999) 'Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia', *Blood*, 94(6), pp.1848–1854. doi: 10.1182/blood.V94.6.1848.
- Hamblin, T. (2006) 'Autoimmune Complications of Chronic Lymphocytic Leukemia.', *Seminars in Oncology*, 33(2), pp. 230-9. doi: 10.1053/j.seminoncol.2006.01.011.
- Hamblin, T.J. (2007) 'Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia.', *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 20(3), pp. 455-468. doi:10.1016/j.beha.2007.02.001.
- Hanada, M. et al. (1993) 'Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 82(6), pp. 1820–8. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8104532/> (Accessed 28 March 2020).
- Hanna, B. et al. (2017) 'Beyond bystanders: Myeloid cells in chronic lymphocytic leukemia.', *Molecular Immunology*, 110, pp. 77-87. doi: 10.1016/j.molimm.2017.11.014.

- Heinig, K. et al. (2014) 'Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation.', *Cancer discovery*, 4(12), pp. 1448–1465. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0096.
- Heintel, D. et al. (2004) 'High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia', *Leukemia*, 18(4), pp. 756–762. doi: 10.1038/sj.leu.2403294.
- Herishanu, Y. et al. (2011) 'The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 117(), pp. 563–574. doi: 10.1182/blood-2010-05-284984.
- Herman, S. et al. (2014) 'Ibrutinib inhibits BCR and NF-kappaB signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL.', *Blood*, 123(21), pp. 3286–3295. doi: 10.1182/blood-2014-02-548610.
- Hewamana, S. et al. (2008) 'The NF-kappaB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target.' *Blood*, 111(9), pp. 4681–9. doi: 10.1182/blood-2007-11-125278.
- Hou, J. et al. (1994) 'An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat.', *Science*, 265(5179), pp: 1701-1706. doi: 10.1126/science.8085155.
- Huemer, M. et al. (2014) 'AID induces intraclonal diversity and genomic damage in CD86 + chronic lymphocytic leukemia cells.', *European Journal of Immunology*, 44(12), pp.3747–3757. doi: 10.1002/eji.201344421
- Ibrahim, S. et al. (2001) 'CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 98(1), pp. 181-186. doi: 10.1182/blood.v98.1.181.
- International CLL IPI working group (2016) 'An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data.', *Lancet Oncology*, 2045(16), pp. 779-790. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30029-8.
- James, D. and Kipps, T. (2011) 'Rituximab in Chronic Lymphocytic Leukemia.', *Adv. Ther.*, 28(7), pp. 534-554. doi:10.1007/s12325-011-0032-2.
- Jayappa, K. et al. (2017) 'Microenvironmental agonists generate de novo phenotypic resistance to combined ibrutinib plus venetoclax in CLL and MCL.', *Blood Advance*, 1(14), pp. 933–946. doi: 10.1182/bloodadvances.2016004176.
- Katsnelson, M. et al. (2015) 'K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling.', *Journal of Immunology*, 194(8), pp. 3937–52. doi: 10.4049/jimmunol.1402658.
- Kerr, J. (1972) 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.', *British Journal of Cancer*, 26(4), pp. 239–57. doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- Kim, D.H. et al. (2017) 'Effect of Betaine on Hepatic Insulin Resistance Through FOXO1-induced NLRP3 Inflammasome.', *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 45, pp. 104-114. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.04.014.

- Kinoshita, K. and Nonaka, T. (2006) 'The dark side of activation-induced cytidine deaminase: relationship with leukemia and beyond.', *International journal of hematology*, 83(3), pp. 201–207. doi: 10.1532/IJH97.06011.
- Kipps, T. J. et al. (2017) 'Chronic lymphocytic leukaemia', *Nature Reviews Disease Primers*, 3(CII), p. 17008. doi: 10.1038/nrdp.2017.8.
- Kitada, S. et al. (1999) 'Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia.', *British Journal of Haematology*, 106(4), pp. 995–1004. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01642.x.
- Klein, L. et al. (2011) 'Translocation-capture Sequencing Reveals the Extent and Nature of Chromosomal Rearrangements in B Lymphocytes.', *Cell*, 147(1), pp. 95–106. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.048.
- Kurtova, A.V. et al. (2009) '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*, 114(), pp. 4441–4450. doi: 10.1182/blood-2009-07-233718.
- Lagneaux, L. et al. (1998) 'Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells.', *Blood*, 91(7), pp. 2387–2396. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9516138/> (Accessed: 14 May 2020).
- Lanham, S. et al. (2003) 'Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 101(3), pp. 1087–1093. doi: 10.1182/blood-2002-06-1822.
- Lee, G.S. et al. (2012) 'The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP.', *Nature*, 492(7427), pp. 123–127. doi: 10.1038/nature11588
- Lennert, K. et al. (1978) 'Malignant Lymphomas Other than Hodgkin's Disease.', Springer-Verlag, pp.119-129.
- Lessene, G. et al. (2008) 'BCL-2 family antagonists for cancer therapy.' *Nature Review Drug Discovery*, 7(12), pp. 989–1000. doi: 10.1038/nrd2658.
- Leuenberger, M. et al. (2010) 'AID protein expression in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma is associated with poor prognosis and complex genetic alterations', *Modern Pathology*. Nature Publishing Group, 23(2), pp. 177–186. doi: 10.1038/modpathol.2009.156.
- Li, H. et al. (2018) 'Epigenetic silencing of TMEM176A activates ERK signaling in human hepatocellular carcinoma.', *Clinical Epigenetics*, 10(1), pp. 137. doi: 10.1186/s13148-018-0570-4.
- Lin, T. et al. (2008) 'Highly purified CD38+ sub-populations show no evidence of preferential clonal evolution despite having increased proliferative activity when compared with CD38– sub-populations derived from the same chronic lymphocytic leukaemia patient.', *British Journal of Haematology*, 142(4), pp. 595–605. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07236.x.
- Liu, J. et al. (2019) 'FoxO1-Induced Inflammation Contributes to the Development of Diabetic Vascular Remodeling.', *The FASEB Journal*, 33(1). Available on: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/action/doSearch?AllField=FoxO1Induced+Inflammation+Contribut>

es+to+the+Development+of+Diabetic+Vascular+Remodeling&SeriesKey=15306860 (Accessed: May 16 2020).

Liu, X. et al. (2016) 'Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores.', *Nature*, 535(7610), pp. 153–158. doi: 10.1038/nature18629.

Longo, P.G. et al. (2008) 'The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells.', *Blood*, 111(2), pp. 846–855. doi: 10.1182/blood-2007-05-089037.

Louvet, C. et al. (2005) 'Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRIbeta family overexpressed in tolerated allografts.', *American Journal of Transplantation*, 5(9), pp. 2143–2153. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.01007.x.

Lyer, S.S. et al. (2013) 'Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation.', *Immunity*, 39(2), pp. 311–23. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.001.

Maffei, R. et al. (2014) 'Endothelin-1 Promotes Survival and Chemoresistance in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells through ETA Receptor.', *PloS one*, 9(6), e98818. doi: 10.1371/journal.pone.0098818.

Man, S.M. and Kanneganti, T. (2016) 'Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity.', 16(1), pp. 7-21. doi: 10.1038/nri.2015.7.

Marasca, R. et al. (2013) 'Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone.', *Hematological Oncology*, 31(2), pp. 88–95. doi:10.1002/hon.202.

Marquez, M.E. et al. (2015) 'Bone marrow stromal mesenchymal cells induce down regulation of CD20 expression on B-CLL: implications for rituximab resistance in CLL.', *British journal of haematology*, 169(), pp. 211–218. doi: 10.1111/bjh.13286.

Mauro, F.R. et al. (2000) 'Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features.', *Blood*, 95(9), pp. 2786-2792. doi: 10.1182/blood.V95.9.2786.009k30_2786_2792.

McCarthy, H. et al. (2003) 'Chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients with unmutated immunoglobulin VH genes express high levels of activation-induced cytidine deaminase (AICD) mRNA and splice variants.', *Blood*, 101(12), pp. 4903-4908. doi: 10.1182/blood-2002-09-2906.

Messmer, B.T. et al. (2005) 'In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells.', *Journal of Clinical Investigation*, 115(3), pp.755–764. doi: 10.1172/JCI23409.

Mirshahi, P. et al. (2006) 'Malignant hematopoietic cells induce an increased expression of VEGFR-1 and VEGFR-3 on bone marrow endothelial cells via AKT and mTOR signaling pathways.' *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349 (3), pp. 1003–1010. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.08.132.

Montamat-Sicotte, D. et al. (2013) 'Origins and Consequences of AID Expression in Lymphoid Neoplasms.', *Current Immunology*, 9(2), pp. 72-85. doi: 10.2174/15733955113099990007.

- Moossavi, M. et al. (2018) 'Role of the NLRP3 inflammasome in cancer', *17(158)*, pp. 1-13. doi: 10.1186/s12943-018-0900-3.
- Morabito, F. et al. (2001) 'Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia.', *Leukemia Research*, 25(11), pp. 927-932. doi: 10.1016/s0145-2126(01)00049-2.
- Morande, P. and Sivina, M. (2019) 'Ibrutinib therapy downregulates AID enzyme and proliferative fractions in chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 133(19), pp. 2056-2068. doi: 10.1182/blood-2018-09-876292.
- Morande, P. et al. (2019) 'Analyzing the mutational landscape of two CLL mouse models overexpressing AID identifies proliferative fraction-associated tumor genes involved in leukemic development and progression', iwCLL2019, Edinburgh – Scotland.
- Moreno, C. et al. (2010) 'Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance.', *Blood*, 116(23), pp. 4771-4776. doi: 10.1182/blood-2010-05-286500.
- Moreno, C. et al. (2019) 'Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first line treatment of chronic lymphocytic (iLLUMINATE): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial.', *Lancet Oncology*, 20(1), pp. 43-56. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30788-5.
- Moro, I. et al. (2009) 'Primer registro nacional de leucemias.' Paper presented at XI Uruguayan Hematology Congress, 19–21 November 2009. Punta del Este, Uruguay
- Muñoz-Planillo, R. et al. (2013) 'K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter.', *Immunity*, 38(6), pp. 1142–1153. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.016.
- Murakami, T. et al. (2012) 'Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109(28), pp. 11282–7. doi: 10.1073/pnas.1117765109.
- Muramatsu, M. et al. (2000) 'Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme', *Cell*, 102(5), pp. 553–563. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00078-7.
- Murphy, E.J. et al. (2017) 'Leukemia-cell proliferation and disease progression in patients with early stage chronic lymphocytic leukemia.', *31(6)*, pp. 1348-1354. doi: 10.1038/leu.2017.34.
- Nakahira, K. et al. (2010) 'Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome.', *Nature immunology*, 12(3), pp. 222-230. doi: 10.1038/ni.1980.
- O'Brien, S. et al. (2009) '5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen.', *Journal of Clinical Oncology*, 27(), pp. 5208–5212. doi: 0.1200/JCO.2009.22.5748.

- Oppezzo, P. et al. (2003) 'Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation.', *Blood*, 101(10), pp.4029–4032. doi: 10.1182/blood-2002-10-3175.
- Oppezzo, P. and Dighiero, G. (2005) 'What Do Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination Teach Us About Chronic Lymphocytic Leukaemia Pathogenesis?.', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 294, pp. 71-89. doi: 10.1007/3-540-29933-5_5.
- Oppezzo, P. et al. (2005) 'The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 106(2), pp. 650–657. doi: 10.1182/blood-2004-08-3344.
- Otsubo, T. et al. (2014) 'Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells.', *Cancer Sciences*, 105(5), pp. 560–567. doi: 10.1111/cas.12394.
- Palacios, F. et al. (2010) 'High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: Link with an activated microenvironment in CLL disease.', *Blood*, 115(22), pp.4488–4496. doi: 10.1182/blood-2009-12-257758.
- Palacios, F. et al. (2014) 'Dissecting chronic lymphocytic leukemia microenvironment signals in patients with unmutated disease: microRNA-22 regulates phosphatase and tensin homolog/AKT/FOXO1 pathway in proliferative leukemic cells.', *Leukemia & Lymphoma*, 56(5), pp. 1–6. doi: 10.3109/10428194.2014.990900.
- Panayiotidis, P. et al. (1996) 'Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro', *British Journal of Haematology*, 92(1), pp. 97–103. doi: 10.1046/j.1365-2141.1996.00305.x.
- Parikh, S. et al. (2016) 'Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia.', *Seminars in Oncology*, 43(2), pp. 233-240. doi: 10.1053/j.seminoncol.2016.02.009.
- Patel, V.K. et al. (2019) 'Pharmacodynamics and Proteomic Analysis of Acalabrutinib Therapy: Similarity of On-Target Effects to Ibrutinib and Rationale for Combination Therapy.', *Leukemia*, 32(4), pp. 920-930. doi: 10.1038/leu.2017.321.
- Paterson, A. et al. (2012) 'Mechanisms and clinical significance of BIM phosphorylation in chronic lymphocytic leukaemia.', *Blood*, 119(7), pp. 1726–1736. doi: 10.1182/blood-2011-07-367417.
- Patten, P.E.M. et al. (2012) 'IGHV-unmutated and IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia cells produce activation-induced deaminase protein with a full range of biologic functions.', *Blood*, 120(24), pp. 4802–4811. doi: 10.1182/blood-2012-08-449744.
- Pasqualucci, L. et al. (2008) 'AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis.', *Nature Genetics*, 40(1), pp. 108–112. doi: 10.1038/ng.2007.35.
- Pedersen, I.M. et al. (2002) 'Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1.', *Blood*, 100(5), pp. 1795–1801. doi: 10.1182/blood.V100.5.1795.h81702001795_1795_1801.

- Pepper, C. et al. (2007) 'Highly purified CD38+ and CD38- sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin.', *Leukemia*, 21(4), pp.687–696. doi: 10.1038/sj.leu.2404587.
- Pepper, C. et al. (2008) 'Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers.', *Blood*, 112(9), pp. 3807–3817. doi: 10.1182/blood-2008-05-157131.
- Pérez-Durán, P. et al. (2007) 'Oncogenic events triggered by AID, the adverse effect of antibody diversification.', *Carcinogenesis*, 28(12), pp.2427–2433. doi: 10.1093/carcin/bgm201.
- Perini, G. et al. (2018) 'BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies.', *Journal of Hematology and Oncology*, 11(1), pp. 1-15. doi: 10.1186/s13045-018-0608-2.
- Perkarsky, Y. et al. (2016) 'The Long Journey of TCL1 Transgenic Mice: Lessons Learned in the Last 15 Years.', *Gene Expr.*, 16(3), pp. 129-135. doi: 10.3727/105221615X141814383562.
- Petlickovski, A. et al. (2005) 'Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells.', *Blood*, 105(12), pp. 4820–7. doi: 10.1182/blood-2004-07-2669.
- Petros, A.M. et al. (2006) 'Discovery of a potent inhibitor of the antiapoptotic protein Bcl-xL from NMR and parallel synthesis.', *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(2), pp. 656–663. doi: 10.1021/jm0507532.
- Prieto, D., Sotelo, N., Seija, N. et al. (2017) 'S100-A9 protein in exosomes from chronic lymphocytic leukemia cells promotes NF-κB activity during disease progression.', *Blood*, 130(6), pp. 777-789. doi: 10.1182/blood-2017-02-769851.
- Prieto, D. et al. (2018) 'LPL protein in Chronic Lymphocytic Leukaemia have different origins in Mutated and Unmutated patients. Advances for a new prognostic marker in CLL.', *British journal of haematology*, 182(4), pp. 521-525. doi: 10.1111/bjh.15427.
- Purroy, N. et al. (2015) 'Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG and promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo.', *Oncotarget*, 6(), pp. 7632–7643. doi: 10.18632/oncotarget.2939.
- Rai, K. et al. (1975) 'Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 46(2), pp. 219-234. doi: 10.1182/blood.V46.2.219.219.
- Ramiro, A. et al. (2004) 'AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo.', *Cell*, 118(4), pp. 431–438. doi: 10.1016/j.cell.2004.08.006.
- Rammauro, F. (2018) 'Contribución a la caracterización de las moléculas inmunoreguladoras TORID-1 y TORID-2.' (Tesis de Maestría en Biología Celular y Molecular). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Ramsay, A.G. et al. (2008) 'Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug.', *The Journal of Clinical Investigation*, 118(7), pp. 2427-37. doi: 10.1172/JCI35017.

- Ramsay, A.G. et al. (2013) 'Chronic lymphocytic leukemia cells induce defective LFA-1-directed T-cell motility by altering Rho GTPase signaling that is reversible with lenalidomide.', *Blood*, 121(14), pp. 2704–2714. doi: 10.1182/blood-2012-08-448332.
- Rawstron, A. et al. (2018) 'Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: an European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) harmonization project.', *Cytometry B Clin Cytom.*, 94(1), pp. 121-128. doi: 10.1002/cyto.b.21595.
- Reinisch, W. et al. (1994) 'Soluble CD23 reliably reflects disease activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia.' *Journal of Clinical Oncology*, 12(10), pp. 2146-2152. doi: 10.1200/JCO.1994.12.10.2146.
- Riches, J.C. et al. (2013) 'T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production.', *Blood*, 21(9), pp. 1612–1621. doi: 10.1182/blood-2012-09-457531.
- Riches J.C. & Gribben J.G. (2013) 'Understanding the immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia: potential clinical implications.', *Hematol Oncol Clin North Am*, 27(2), pp. 207–235. doi: 10.1016/j.hoc.2013.01.003.
- Robbiani, D.F. et al. (2009) 'AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations.' *Molecular Cell*, 36(4), pp. 631–641. doi: 10.1016/j.molcel.2009.11.007.
- Roberts, A. et al. (2016) 'Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia.', *New England Journal of Medicine*, 374(4), pp. 311-322. doi: 10.1056/NEJMoa1513257.
- Rombout, A. et al. (2016) 'Lipoprotein lipase in chronic lymphocytic leukemia: function and prognostic implications.', *European Journal of Haematology*, 97(5), pp. 409–415. doi: 10.1111/ejh.12789.
- Rozovski, U. et al. (2013) 'Targeting inflammatory pathways in chronic lymphocytic leukemia.', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 88(3), pp. 655-666. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.07.011.
- Ryan C. and Davids M. (2019) 'BCL-2 Inhibitors, Present and Future.', *The Cancer Journal*, 25(6), pp. 401-409. doi: 10.1097/PPO.0000000000000408.
- Salaro, E. et al. (2016) 'Involvement of the P2X7-NLRP3 axis in leukemic cell proliferation and death.', *Scientific Report*, 6, pp. 1-13. doi: 10.1038/srep26280.
- Sborgi, L. et al. (2016) 'GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death', *The EMBO Journal*, 35(16), pp. 1766–1778. doi: 10.15252/embj.201694696.
- Schlesinger, M. et al. (1996) 'The complement system is defective in chronic lymphatic leukemia patients and in their healthy relatives.', *Leukemia*, 10(9), pp. 1509-13. Available on: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8751471/> (Accessed June, 2020)
- Schroeder, H.W. and Dighiero, G. (1994) 'The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire.', *Immunology Today*, 15(6), pp. 288–294. doi: 10.1016/0167-5699(94)90009-4.
- Segovia, M. et al. (2014) 'Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation.', *American Journal of Transplantation*, 14(5), pp. 1021–1031. doi: 10.1111/ajt.12708.

- Segovia, M. and Russo, S. et al. (2019) 'Targeting TMEM176B enhances antitumor immunity and augments the efficacy of immune checkpoint blockers by unleashing inflammasome activation.', *Cancer Cell*, 35(5), pp. 767–781. doi: 10.1016/j.ccell.2019.04.003.
- Segovia, M. et al. (2020) 'Role of inflammasome activation in tumor immunity triggered by immune checkpoint blockers.', *Clinical and Experimental Immunology*, 200(2), pp. 155-162. doi: 10.1111/cei.13433.
- Seiffert, M. et al. (2010) 'Soluble CD14 is a novel monocyte-derived survival factor for chronic lymphocytic leukemia cells, which is induced by CLL cells in vitro and present at abnormally high levels in vivo.', *Blood*, 116 (20),pp. 4223-4230. doi: 10.1182/blood-2010-05-284505.
- Seiffert, M. et al. (2012) 'Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia.', *Leukemia and Lymphoma*, 53(6), pp. 1023-1031. doi: 10.3109/10428194.2011.631638.
- Seymour, J. et al (2018) 'Venetoclax-rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia.', *New England Journal of Medicine*, 378(12), pp. 1107-1120. doi: 10.1056/NEJMoa1713976.
- Shachar, I. and Haran, M. (2011) 'The secret second life of an innocent chaperone: the story of CD74 and B cell/chronic lymphocytic leukemia cell survival.', *Leukemia & lymphoma*, 52(8), pp.1446–1454. doi: 10.3109/10428194.2011.565437.
- Shanafelt, T.D. et al. (2019) 'Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia', *The New England Journal of Medicine*, 381(5), pp. 432-443. doi: 10.1056/NEJMoa1817073.
- Shi, Y. (2002) 'Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.', *Molecular Cell*, 9(3), pp. 459–470. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00482-3.
- Shimada, K. et al. (2012) 'Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis.', *Immunity*, 36(3), pp. 401–14. doi: 10.1016/j.immuni.2012.01.009.
- Siegel R., Miller K and Jemal A. (2020) 'Cancer Statistics, 2020', CA: A Cancer Journal for Clinicians. American Cancer Society, 70(1), pp. 7-30. doi: 10.3322/caac.21590.
- Sivina, M. et al. (2012) 'Stromal cells modulate TCL1 expression, interacting AP-1 components and TCL1-targeting micro-RNAs in chronic lymphocytic leukemia.', *Leukemia*, 26(8), pp.1812–1820. doi: 10.1038/leu.2012.63.
- Slupsky, J (2019) 'Ibrutinib is safer than we think.', *Blood*, 133(19), pp. 2006-2007. doi: 10.1182/blood-2019-03-901009.
- Smoley, S. (2010) 'Standardization of fluorescence in situ hybridization studies on chronic lymphocytic leukemia (CLL) blood and marrow cells by the CLL Research Consortium.', *Cancer genetics and cytogenetics*, 203(2), pp. 141-148. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2010.08.009.
- Souers, A. et al. (2013) 'ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets.', *Nature Medicine*, 19(2), pp. 202–8. doi: 10.1038/nm.3048.
- Stacchini, A. et al. (1999) 'MEC1 and MEC2: Two New Cell Lines Derived From B-chronic Lymphocytic Leukaemia in Prolymphocytoid Transformation.', *Leukemia*, 23(2), pp. 127-36. doi: 10.1016/s0145-2126(98)00154-4.

- Starczynski, J. et al. (2005) 'Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival.', *Journal of Clinical Oncology*, 23(7), pp. 1514–1521. doi: 10.1200/JCO.2005.02.192.
- Stilgenbauer, S. et al. (2002) 'Genetics of Chronic Lymphocytic Leukemia: Genomic Aberrations and V(H) Gene Mutation Status in Pathogenesis and Clinical Course.' *Leukemia*, 16(6), pp. 993–1007. doi: 10.1038/sj.leu.2402537.
- Stilgenbauer, S. et al. (2016) 'Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study.', *Lancet Oncology*, 17(6), pp. 768–778. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30019-5.
- Sun, L. et al. (2018) 'Distinct expression and prognostic value of MS4A in gastric cancer.', *Open Med*, 13, pp. 178–88. doi: 10.1515/med-2018-0028.
- Tam, C.S. et al. (2007) 'Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in situ hybridization in 510 patients.', *British Journal of Haematology*, 141, pp. 36–40. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07012.
- Tang, T. et al. (2017) 'CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation.', *Nature communications*, 8(1):202. doi: 10.1038/s41467-017-00227-x.
- Tausch, E. et al. (2019) 'Venetoclax resistance and acquired BCL2 mutations in chronic lymphocytic leukemia.', *Haematologica*, 104(9), pp. e434–e437. doi: 10.3324/haematol.2019.222588.
- Ten Hacken, E. and Burger, J.A. (2017) 'Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: implications for disease pathogenesis and treatment.', *Biochim Biophys Acta*, 1863(3), pp. 401–413. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.07.009.
- Ten Hacken, E. (2018) 'Splicing modulation sensitizes chronic lymphocytic leukemia cells to venetoclax by remodeling mitochondrial apoptotic dependencies.', *JCI Insight*, 3(19):e121438. doi: 10.1172/jci.insight.121438.
- Thompson, P. et al. (2016) 'Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 127(3), pp. 303–309. doi: 10.1182/blood-2015-09-667675.
- Tse, C. et al. (2008) 'ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor.', *Cancer Research*, 68(9), pp. 3421–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5836.
- Tsukada, N. et al. (2002) 'Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 99(3), pp. 1030–1037. doi: 10.1182/blood.V99.3.1030.
- Van Kooten, C. and Banchereau, J. (2000) 'CD40-CD40 ligand.', *Journal of leukocyte biology*, 67(1), pp. 2–17. doi: 10.1002/jlb.67.1.2.
- Vasconcelos, Y et al. (2005) 'Gene expression profiling of chronic lymphocytic leukemia can discriminate cases with stable disease and mutated Ig genes from those with progressive disease and unmutated Ig genes.', *Leukemia*, 19(11), pp. 2002–2005. doi: 10.1038/sj.leu.2403865.

- Vince, J. et al. (2018) 'The Mitochondrial Apoptotic Effectors BAX/BAK Activate Caspase-3 and -7 to Trigger NLRP3 Inflammasome and Caspase-8 Driven IL-1 β Activation.', *Cell Reports*, 25(9), pp. 2339-2353. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.103.
- Visone, R. et al. (2011) 'miR-181b is a biomarker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 118(11), pp. 3072–9. doi: 10.1182/blood-2011-01-333484.
- Wang, Y. et al. (2017) 'Epigenetic silencing of TMEM176A promotes esophageal squamous cell cancer development.', *Oncotarget*, 8(41), pp. 70035–48. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5642535/> (Accessed: 20 March 2020).
- Wang, W.J. et al. (2018) 'Downregulation of gasdermin D promotes gastric cancer proliferation by regulating cell cycle-related proteins.', *Journal of Digestive Diseases*, 19 (2), pp. 74-83. doi: 10.1111/1751-2980.12576.
- Wang, J. (2020) 'Mechanism and regulation of pyroptosis-mediated in cancer cell death.', *Chemico-Biological Interactions*, 25;323:109052. doi: 10.1016/j.cbi.2020.109052.
- Wei, Q. et al. (2014) 'Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression.', *Laboratory Investigation*, 94(1), pp. 52-62. doi: 10.1038/labinvest.2013.126.
- Weichand, B. et al. (2017) 'S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1 β .', *Journal of Experimental Medicine*, 214(9), pp. 2695–2713. doi: 10.1084/jem.20160392.
- Willimott, S. et al. (2007) 'CD154 induces a switch in pro-survival Bcl-2 family members in chronic lymphocytic leukaemia.', *British Journal of Haematology*, 138(6), pp. 721–732. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06717.x.
- Wilson, W. et al. (2010) 'Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity.' *Lancet Oncology*, 11(12), pp. 1149–1159. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70261-8.
- Witthuhn, B.A. et al. (1994) 'Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells.', *Nature*, 370(6485), pp: 153-157. doi: 10.1038/370153a0.
- Woyach, J. et al. (2018) 'Ibrutinib regimens versus chemoimmunotherapy in older patients with untreated CLL.', *New England Journal of Medicine*, 379(26), pp. 2517- 2528. doi: 10.1056/NEJMoa1812836.
- Xia, X. et al. (2019) 'The role of pyroptosis in cancer : pro-cancer or pro- “ host ”?', *Cell Death and Disease*, 10(650), doi: 10.1038/s41419-019-1883-8.
- Yan, X.J. et al. (2006) 'B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia.', *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(31), pp. 11713–8. doi: 10.1073/pnas.0604564103.
- Yan, X.J. et al. (2011) 'Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia.', *Blood*, 118(19), pp. 5201-5210. doi: 10.1182/blood-2011-03-342436.

Bibliografía

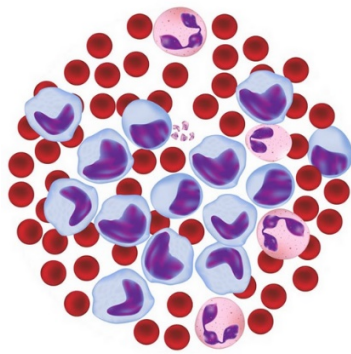
Zheng, Z. and Li, G. (2020) 'Mechanisms and Therapeutic Regulation of Pyroptosis in Inflammatory Diseases and Cancer', *International Journal of Molecular sciences*, 21(4), 1456 . doi: 10.3390/ijms21041456.

Zhou, Ch. et al. (2003) 'Human Activation-Induced Cytidine Deaminase Is Induced by IL-4 and Negatively Regulated by CD45: Implication of CD45 as a Janus Kinase Phosphatase in Antibody Diversification.', *The Journal of Immunology*, 170(4), pp. 1887-93. doi: 10.4049/jimmunol.170.4.1887.

Zhou, R. et al. (2010) 'A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation.', *Nature*, 469(7329), pp. 221-225. doi: 10.1038/nature09663.

Zhu, D.X. et al. (2012) 'miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes.', *Carcinogenesis*, 33(7), pp. 1294–1301. doi: 10.1093/carcin/bgs179.

Zirlik, K. and Veelken, H. (2018) 'Idelalisib.', *Recent results in cancer research*, 212, pp. 243-264. doi: 10.1007/978-3-319-91439-8_12.



Anexos

LYMPHOID NEOPLASIA

Ibrutinib therapy downregulates AID enzyme and proliferative fractions in chronic lymphocytic leukemia

Pablo Elías Morande,^{1,*} Mariela Sivina,^{2,*} Angimar Uriepero,¹ Noé Seija,¹ Catalina Berca,¹ Pablo Fresia,³ Ana Inés Landoni,⁴ Javier M. Di Noia,^{5,6} Jan A. Burger,^{2,†} and Pablo Oppezzo^{1,†}

¹Research Laboratory on Chronic Lymphocytic Leukemia, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; ²Department of Leukemia, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX; ³Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; ⁴Hospital Maciel, Administración de los Servicios de Salud del Estado, Ministerio de Salud, Montevideo, Uruguay; ⁵Division of Immunity and Viral Infections, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, QC, Canada; and ⁶Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

KEY POINTS

- AID protein expression and proliferative fractions are decreased during ibrutinib therapy in patients with CLL.
- Downregulation of AID and proliferative subsets are associated with decrease of AKT and JAK1/STAT6 signaling after ibrutinib therapy.

Activation-induced cytidine deaminase (AID) initiates somatic hypermutation and class switch recombination of the immunoglobulin genes. As a trade-off for its physiological function, AID also contributes to tumor development through its mutagenic activity. In chronic lymphocytic leukemia (CLL), AID is overexpressed in the proliferative fractions (PFs) of the malignant B lymphocytes, and its anomalous expression has been associated with a clinical poor outcome. Recent preclinical data suggested that ibrutinib and idelalisib, 2 clinically approved kinase inhibitors, increase AID expression and genomic instability in normal and neoplastic B cells. These results raise concerns about a potential mutagenic risk in patients receiving long-term therapy. To corroborate these findings in the clinical setting, we analyzed AID expression and PFs in a CLL cohort before and during ibrutinib treatment. We found that ibrutinib decreases the CLL PFs and, interestingly, also reduces AID expression, which correlates with dampened AKT and Janus Kinase 1 signaling. Moreover, although ibrutinib increases AID expression in a CLL cell line, it is unable to do so in primary CLL samples. Our results uncover a differential response to ibrutinib between

cell lines and the CLL clone and imply that ibrutinib could differ from idelalisib in their potential to induce AID in treated patients. Possible reasons for the discrepancy between preclinical and clinical findings, and their effect on treatment safety, are discussed. (*Blood*. 2019;133(19):2056-2068)

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a mature B-cell malignancy typically diagnosed in elderly patients¹ based on the detection of mature monoclonal CD5⁺/CD23⁺ B cells in the peripheral blood (PB), bone marrow (BM), and secondary lymphoid organs.^{2,3} Historically, CLL has been described as a disease caused by the accumulation of quiescent clonal B cells, arrested in the G0 phase of the cell cycle. However, more recently, small fractions of the CLL clone were found to proliferate constitutively, and the relative size of the proliferative compartment has been linked to disease progression.^{4,5} As a consequence, they have been termed proliferative fractions (PFs).^{4,6-8} CLL cell proliferation occurs primarily in the secondary lymphoid organs within proliferation centers⁹ that resemble lymphoid follicles ("pseudofollicles"). In these areas, CLL cells are activated by signals from the microenvironment, especially activation of B-cell receptor (BCR) signaling,⁹ along with triggering costimulatory molecules such as CD40 and toll-like receptors,¹⁰ among others,¹¹ that collectively result in cell proliferation and survival. CLL cell activation and proliferation are

associated with the expression of activation-induced cytidine deaminase (AID),¹² a B-cell-restricted enzyme that creates point mutations in the genomic DNA of the immunoglobulin (Ig) genes to initiate somatic hypermutation and class switch recombination.¹³ AID can also exhibit promiscuous activity outside the Ig locus, resulting in off-target mutations that have been linked to genomic instability^{14,15} and tumor progression in acute lymphoblastic leukemia¹⁶ and in diffuse large B-cell lymphoma.¹⁷ In CLL, AID expression is restricted to the subset of proliferating leukemia cells^{4,5,7,18} and can be detected in PB from patients with CLL with poor prognostic features, such as unmutated *IGHV*, extensive lymphocytosis, and short survival.^{4,19-21} This observation indicates that PFs and AID activity play an important role in the natural history of this disease.

Kinase inhibitors targeting BCR signaling have significantly improved the outcome of patients with CLL, especially those with high-risk CLL, and now are widely used in clinical practice.^{22,23} The BTK inhibitor ibrutinib induces high rates of durable remissions in patients with CLL with untreated and or refractory

Table 1. Patient's characteristics: clinical and biological features of the cohort of patients used in this study

CLL number	Age, y	Sex	FISH	TP53 mutations	Mutational status	Rai stage	Zap-70 (IHC)	CD38% (BM flow)	WBC (K/uL), baseline	Lymphocyte percentage	ABS LYMPH (K/ μ L), baseline
13-US	61	F	13q (59%)	c.402T>G p.F134L	Unmut	III	Pos	30.1	121.8	95	115.73
16-US	53	M	17p (57.5%), 13q (48.5%)	N/D	Unmut	I	Pos	0.7	9.9	79	3.19
21-US	53	F	Negative	N/D	Unmut	II	Pos	7.0	41.4	95	35.63
22-US	72	F	17p (92%)	c.743G>A p.R248Q	Unmut	III	Neg	74.7	131	81	124.47
32-US	48	F	17p (85%)	N/D	Unmut	I	Pos	89.6	7.4	93	5.8
36-US	63	M	13q (33.5% single, 43% both)	N/D	Unmut	II	N/D	9.4	2.9	85	0.7
45-US	79	M	11q (92.5%), 13q (88.5% single, 3% both)	No mutations	Unmut	IV	Pos	7.0	4.7	96	2.61
46-US	48	F	17p (92%), 13 (89.5%)	No mutations	Unmut	IV	Pos	40.7	12.7	93	6.75
3-US	74	M	11q (88%), 13q (36% single, 46.5% both)	No mutations	Unmut	IV	Pos	93.8	140.4	95	131.93
113-US	59	M	11q (84.5%), 13q (84%)	No mutations	Unmut	I	Pos	66.0	23.2	85	19.02
252 UY	58	M	11q (62%), 13q (86%)	No mutations	Unmut	II	N/D	45.7	120	82	110.08
279 UY	53	F	17p (46%)	N/D	Unmut	II	N/D	44	130	89	92.65
422 UY	49	M	17p (72%)	No mutations	Unmut	IV	N/D	83	100	95	99.57
450 UY	57	F	Negative	N/D	Unmut	I	N/D	10.5	50	89	49.9
451 UY	87	M	Negative	N/D	Unmut	II	N/D	N/D	111	92	102
456 UY	59	F	17p (72%)	c.659A>G p.Y220C	Unmut	III	N/D	56.8	107	90	95
457 UY	52	M	Tris 12	No mutations	Unmut	IV	N/D	32.5	75.4	87	68.7
458 UY	61	F	Negative	No mutations	Unmut	I	N/D	8.7	14.7	72	12

ABS LYMPH, absolute lymphocytosis; FISH, fluorescence in situ hybridization; IHC, immunohistochemistry; N/D, no determined; Neg, negative; Pos, positive; US, American cohort; UY, Uruguayan cohort used in in vitro studies; WBC, whole blood count.

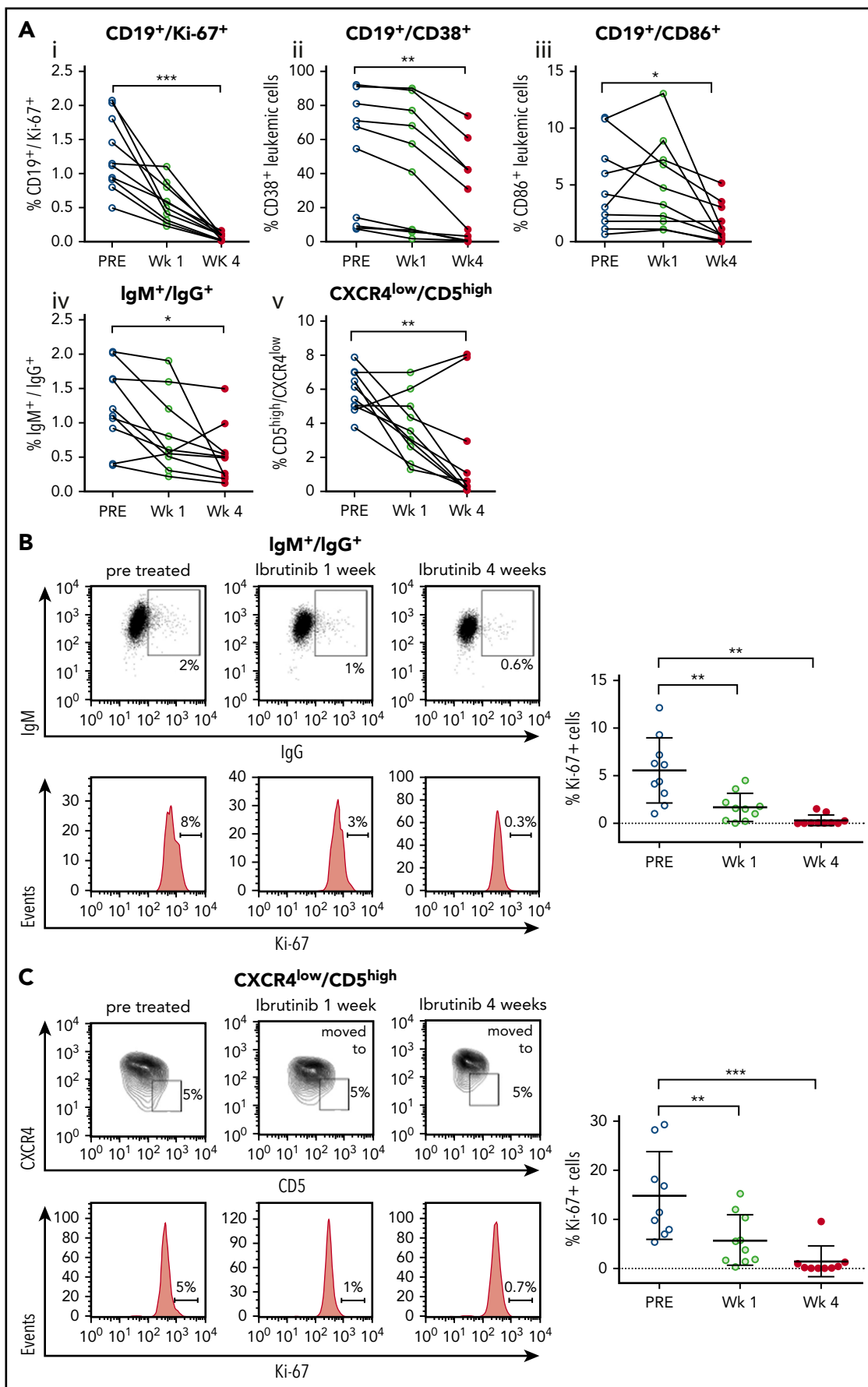


Figure 1.

CLL.^{24,25} Ibrutinib abrogates CLL cell proliferation, both in vitro, judged by reduced Ki-67⁺ cells,²⁶ and in vivo, based on abolished deuterium incorporation into the DNA of CLL cells in patients.²⁷ Compagno et al recently reported that BCR signaling inhibition with either the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) δ inhibitor idelalisib or ibrutinib increased AID protein expression in murine B cells and human B-cell lymphoma lines, along with increased genomic instability and tumor formation.²⁸ These findings by Compagno et al raise concerns about a potential mutagenic risk in patients receiving long-term therapy because of AID overexpression. However, according to the available clinical data, continuous therapy with the PI3K δ inhibitor idelalisib²⁹ and with ibrutinib^{24,25} have not been associated with an increased risk of developing secondary cancers. Nonetheless, AID expression levels in idelalisib- or ibrutinib-treated patients with CLL have not previously been reported. Therefore, we analyzed AID expression and the percentage of the proliferative CLL cell fractions in serial CLL cell samples obtained before and during ibrutinib therapy. In addition, we also evaluated the phosphorylation status of PI3K/protein kinase B (PKB) pathway of the PF CXCR4^{low}/CD5^{high} and studied AICDA mRNA and AID protein expression in ibrutinib-treated primary CLL cells, and in MEC-1 cells, a CLL-derived cell line.³⁰ Collectively, our data, in contrast with recent preclinical data,²⁸ demonstrate that ibrutinib therapy results in a profound reduction in both AID expression and proliferative leukemic fractions in patients with CLL.

Methods

Patient selection

All patients fulfilled clinical and immune-phenotypic criteria for CLL and were enrolled in a clinical trial approved and conducted in accordance with the Institutional Review Board of the University of Texas MD Anderson Cancer Center guidelines and with the principles of the Declaration of Helsinki (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02007044). Patients were treated at MD Anderson Cancer Center with ibrutinib 420 mg daily. After obtaining informed consent, PB samples were collected before and after the initiation of ibrutinib therapy. PB mononuclear cells (PBMCs) were isolated with Ficoll/Hypaque density-gradient centrifugation, purification of B cells was obtained by negative selection using EasySep Human B cell enrichment kit (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), and purified B cells were cryopreserved with fetal bovine serum (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with 10% dimethylsulphoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and stored in vapor-phase liquid nitrogen until further use.

Flow cytometry analysis, in vitro cultures, and polymerase chain reaction analysis

Briefly, 1×10^6 blood purified B cells were incubated with the corresponding mixture of antibodies or isotype controls for 30 minutes at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cells were washed twice in PBS 0.5% bovine serum albumin before acquisition. For intracellular protein detection, 1×10^6 PBMCs were fixed in PBS, paraformaldehyde 4%, washed twice in PBS, and then permeabilized in PBS containing 0.5% saponin and 5% FBS (PermB) after the addition of the specific antibody. For Ki-67 staining, conjugated anti-human Ki-67 was incubated for 30 minutes on ice. For intracellular AID staining, primary antibody was incubated 1:500 in PermB for 1 hour on ice and subsequently incubated for 30 minutes with secondary conjugated anti-rat. Methodology and antibodies used for phenotypic surface analysis of leukemic B cells are provided in supplemental Data 1, available on the Blood Web site.

AKT/PKB phospho array

Fluorescence-activated cell sorter isolation of the leukemic cell populations CD19⁺CXCR4^{low}CD5^{high} (PF) and CD19⁺CXCR4^{high}CD5^{low} (quiescent fraction [QF]) in samples from patients with CLL treated with ibrutinib treatment was performed with the use of the Atrios cell sorter (Beckman Coulter, Brea, CA) and the FACS Aria II cell sorter (BD Bioscience). Detailed information is provided in supplemental Data 1. Purity of sorted PF and QP populations was greater than 98% in all the cases. Cell pellets were obtained by cold centrifugation and delivered to Full Moon BioSystems (Sunnyvale, CA) for the development of the AKT/PKB phosphoarray. We used AKT/PKB Phospho Antibody Array with 216 highly specific antibodies related to the PI3K/PKB/AKT pathway designed for protein phosphorylation profile in cell and tissue human samples. (Catalog No: PAB216; <https://www.fullmoonbio.com/product/akt-pkb-phospho-antibody-array>).

Cell lines and in vitro cultures

MEC-1 cell line was a kind gift of F. Caligaris-Cappio (Milano, Italy). For evaluation of ibrutinib effects on AID expression in vitro, MEC-1 cells were incubated in RPMI Medium 1640 (Gibco, Thermo Fisher) supplemented with 10% FBS (Gibco, Thermo Fisher) in the presence of ibrutinib (MedKoo Biosciences, Morrisville, NC) or Idelalisib (MedKoo Biosciences) at 0.1 or 1 μ M for 24 or 48 hours. In vitro cultures with CD40L and interleukin (IL)-4 were performed as described in Palacios et al.³¹

Figure 1. Studies of proliferative CLL subsets during ibrutinib treatment of patients with CLL. Peripheral blood samples from patients with CLL before and after 1 and 4 weeks postibrutinib treatment were centrifuged in Ficoll gradient, and total MCs obtained were next analyzed by flow cytometry, using the different markers detailed here. Leukemic cells were discriminated by gating lymphocytes and by labeling CD19 plus CD5. (A) Ki-67⁺ (i), CD38 (ii), CD86 (iii), or CXCR4 (v) surface expression was evaluated in the 3 points depicted. Results are shown as percentages of CD19⁺/CD5⁺/Ki-67⁺ cells (i), CD19⁺/CD5⁺/CD38⁺ cells (ii), CD19⁺/CD5⁺/CD86⁺ cells (iii), or CD19⁺/CXCR4^{low}/CD5^{high} cells (v) by fixing the gate at the pretreated condition. (iv) Intracellular labeling of IgM plus IgG was performed where percentages of CD19⁺/IgM⁺/IgG⁺ cells before and after treatment is shown. As depicted for CD19⁺/Ki-67⁺, CD19⁺/CD38⁺, CD19⁺/CD86⁺, IgM⁺/IgG⁺, and CXCR4^{low}/CD5^{high}, the P values were $P \leq .0001$, $P = .001$, $P = .011$; $P = .016$, and $P = .005$; respectively (n = 10). Each dot represents a single patient sample (* $P < .05$; ** $P < .005$; 2-tailed, Student paired t test). (B) Intracellular staining of Ki-67 was developed in CD19⁺/IgM⁺/IgG⁺ cells. Shown are representative dot plots and Ki-67 histograms in a representative patient (left) and the statistical analysis of the entire cohort evaluated (right part), where each dot represents a single patient sample. Pretreated IgM⁺/IgG⁺/Ki67⁺ was 5.6% vs 1.7% at 1 week (mean difference, 3.9; 95% confidence interval [CI], 1.5-6.3; $P = .0013$), whereas at 4 weeks, it was 0.3% (mean difference, 3.9; 95% CI, 2.9-7.6; $P \leq .0001$; n = 10; 1-way ANOVA, multiple comparisons test). (C) Intracellular staining of Ki-67 was developed in CD19⁺CD5^{high}/CXCR4^{low} cells. Shown are representative dot plots and Ki-67 histograms in a representative patient (left part) and the statistical analysis of the entire cohort (right part), where each dot represents a single patient sample. For CXCR4^{low}/CD5^{high}, the mean proportion of cells expressing Ki-67 at pretreatment is 14.9% vs 5.8% at week 1 (mean difference, 9.1; 95% CI, 2.4-15.7; $P = .042$); and for week 4, 1.36%, with a mean difference of 13.5 (95% CI, 6.7-20.3; $P = .017$; n = 10; 1-way ANOVA, multiple comparisons test).

Western blot and immunodetection

After harvesting, cells were lysed with RIPA buffer (50 mM TRIS-HCl at pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% NP-40) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). Samples were heated at 95°C for 5 minutes, and a total of 50 µg/well were loaded onto 12% Tris-glycine acrylamide gel. Electrophoresis and immunoblot methodology, as well as antibodies used, are detailed in supplemental Data 1.

RNA extraction and AID transcripts analysis

RNA extraction was performed from 1×10^6 to 5×10^6 purified CD19⁺ CLL cells, using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), and cDNA was synthesized as described in Palacios et al,⁴ using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) with ribonuclease inhibitor RNasin (Promega, Madison, WI). Standard and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) amplification was performed as described in Palacios et al.⁴ AID and GAPDH primers are provided in the supplemental Data 1.

Statistical analyses

Percentages of CD38⁺ PF, CD86⁺ PF, IgM⁺/IgG⁺ PF, and CXCR4^{low}/CD5^{high} PF during ibrutinib treatment, as well as Ki-67- and AID-positive cells within the subsets, were compared with the use of 2-tailed paired Student *t* test. One-way analysis of variance (ANOVA) multiple comparison test was used in cases in which more than 2 conditions were evaluated. Variables with *P* < .05 were considered to be significant. All analyses were performed using GraphPad Prism 7 software version 7.0c (GraphPad, San Diego, CA).

Results

Ibrutinib treatment diminishes proliferative CLL fractions

The 4 distinct CLL PFs^{4,6-8} were quantified in PB samples from patients with CLL (*n* = 10) before and after 1 and 4 weeks of ibrutinib therapy. Clinical and laboratory characteristics are provided in Table 1, and the flow cytometry strategy for characterization of PFs is described in supplemental Figure 1. Our analyses demonstrated that the distinct CLL PFs, CD19⁺/Ki-67⁺ (I), CD19⁺/CD38⁺ (II), CD19⁺/CD86⁺ (III), IgM⁺/IgG⁺ (IV), and CXCR4^{low}/CD5^{high} (V), were significantly decreased after 4 weeks of ibrutinib treatment (Figure 1A). In addition, the proportion of proliferating CLL cells was reduced at 1 and 4 weeks after ibrutinib administration, as shown by the significant decrease in the proportion of leukemic cells expressing Ki-67, a marker for cell proliferation, in IgM⁺/IgG⁺ and CXCR4^{low}/CD5^{high} CLL cells. The mean proportion of IgM⁺/IgG⁺ cells expressing Ki-67 was 5.6% pretreatment vs 1.7% and 0.3% at weeks 1 and 4 post-treatment, respectively (*P* < .0001; 1-way ANOVA test). For CXCR4^{low}/CD5^{high}, the mean proportion of cells expressing Ki-67 decreased from 14.9% pretreatment to 5.8% and 1.36% at weeks 1 and 4 posttreatment, respectively (*P* < .0001; 1-way ANOVA test; Figure 1B-C). Altogether, these results support and expand previous works from Herman et al,³² confirming the effect of ibrutinib on CLL proliferating cells.

Ibrutinib therapy modifies the phosphorylation status of AKT/PKB in the CXCR4^{low}/CD5^{high} PF

Taking into account different studies demonstrating the importance of PI3K/AKT signaling during CLL progression,^{23,31,33,34}

we analyzed the phosphorylation status of the AKT/PKB pathway during ibrutinib treatment. To accomplish this task, we isolated the CXCR4^{low}/CD5^{high} PF from patients CLL3, CLL16, and CLL36 by cell sorting before and during ibrutinib treatment, and analyzed these samples using a phospho-array platform. The full data set of this experiment is provided in supplemental Data 2. Analysis of the 3 patients allowed us to identify significant changes in the phosphorylation status of different proteins involved in cancer progression after ibrutinib treatment. From a total of 94 protein variants (44 genes), 63 had no significant differences. In contrast, 31 protein variants (25 genes, 57%) were significantly dephosphorylated (*n* = 12) or phosphorylated (*n* = 19) after ibrutinib treatment (Figure 2A-B). Between these significant changes, we found increased dephosphorylation of important molecules-pathways implicated in B-cell activation and proliferation, such as spleen tyrosine kinase,³⁵ GSK3-α,^{36,37} Janus Kinase 1 (JAK1),³⁸ or AKT/PI3K³⁹ (Figure 2B-C). Specifically, dephosphorylation in the Tyrosine 1022 residue of JAK1 has been reported as a key modification needed for the deactivation of the catalytic center of this kinase.⁴⁰⁻⁴² Furthermore, spleen tyrosine kinase and JAK1 have been previously reported to be involved in CLL progression.^{43,44} Interestingly, we also found a significant dephosphorylation of serine/threonine kinase AKT1 protein in residues associated with activation of this pathway, such as Ser473⁴⁵ and Thr72.⁴⁶ In line with these observations, we found an increased phosphorylation of protein phosphatase 2A, which constitutes an AKT deactivating phosphatase,⁴⁷ and AKT1S1, which is an inhibitor of mTORC2, the main activating kinase of AKT^{39,48} (Figure 2B-C). Finally, there was increased phosphorylation in key residues in the P53 protein (Ser392, Ser37, Ser46, and Thr18), as well as of other important proteins related with survival such as BAD (Ser134), Cidine D1 (Thr-286), and FOXO1 (Thr24/32), among others (Figure 2C). Altogether, these data show how ibrutinib therapy directly affects the phosphorylation status of the PFs.

AID expression is downregulated after ibrutinib treatment in CLL proliferative fractions

Reduction of CLL PFs during ibrutinib treatment and dephosphorylation of key pathway molecules involved in control of AID expression, such as IL-4/JAK1/STAT6⁴⁹⁻⁵³ and/or PI3K/AKT,³¹ lead us to evaluate the effects of ibrutinib therapy on AID expression in patients with CLL. Therefore, we assessed AID protein in the PFs by flow cytometry, as previously described.⁵ CLL cells stimulated with CD40L and IL-4 for 5 days served as positive controls. Such CLL cells demonstrated increased cell size by FSC/SSC and AID positivity that ranged from 18% to 55% of the whole CLL clone on the 3 patients analyzed (supplemental Figure 2). AID is primarily expressed in the PFs.^{4,8,18} Accordingly, we observed a higher proportion of AID-positive CLL cells in the CXCR4^{low}/CD5^{high} and IgM⁺/IgG⁺ populations when compared with the fraction of AID⁺ cells in the entire CLL cell population (CD19⁺/CD5⁺). Mean percentage of AID⁺ cells was 7.2% ± 0.7% and 10% ± 1.7%, for IgM⁺/IgG⁺ and CXCR4^{low}/CD5^{high}, respectively, vs 1.8% ± 0.1% for the whole clone (Figure 3 A-B; supplemental Figure 2B). When we evaluated the effect of ibrutinib therapy within the IgM⁺/IgG⁺ and CXCR4^{low}/CD5^{high} PFs, the proportion of AID⁺ leukemic cells were clearly decreased at 1 and 4 weeks after treatment, reaching statistical significance for both the CXCR4^{low}/CD5^{high} and IgM⁺/IgG⁺ subsets at the 4-week point (Figure 3A-B). For IgM⁺/IgG⁺, the

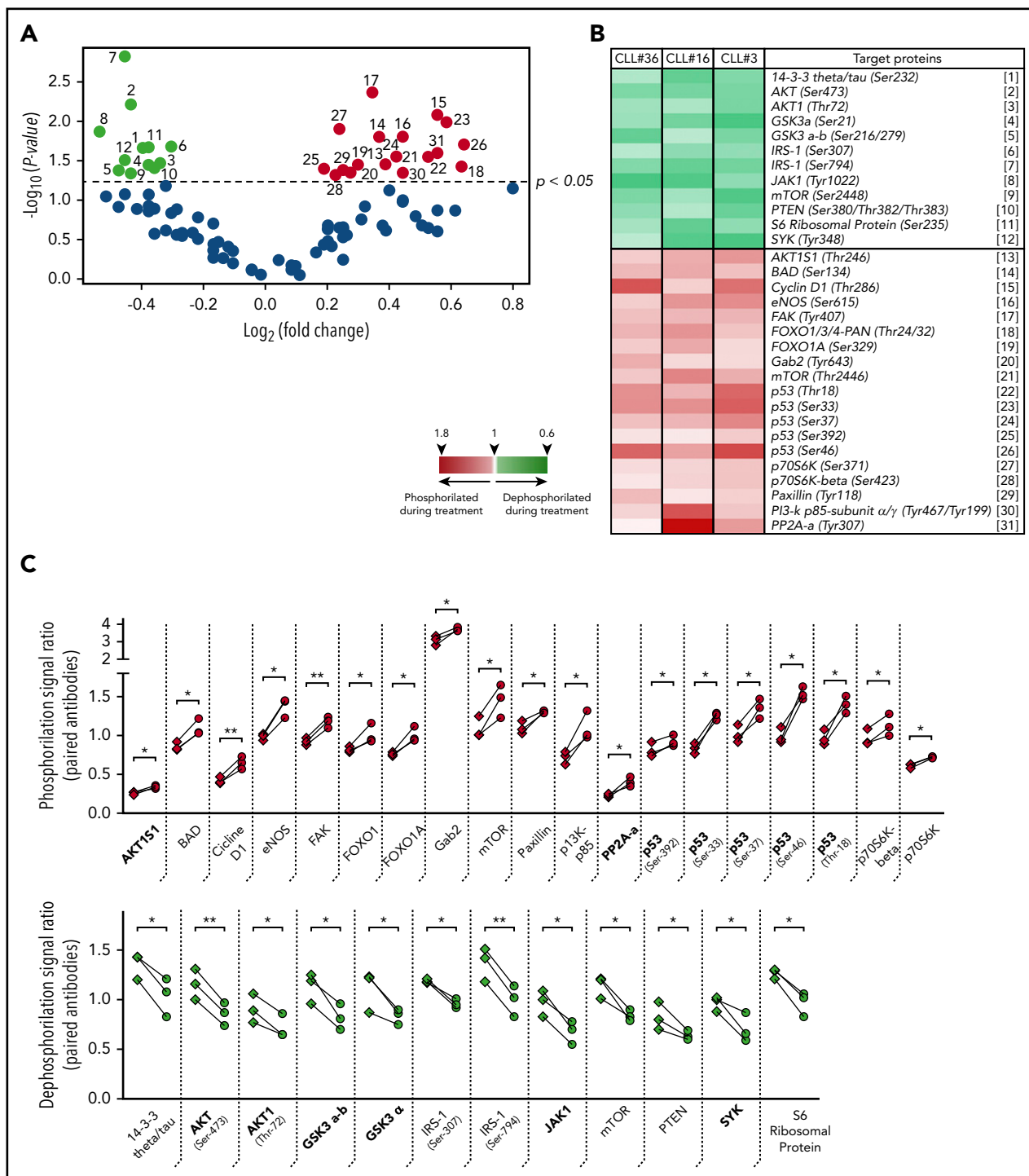


Figure 2. Phosphorylation profile of CD5^{high}/CXCR4^{low} leukemic cells in patients with CLL treated with ibrutinib. Cell sorting purified CD19⁺/CD5^{high}/CXCR4^{low} cells obtained from PBMC of 3 patients with CLL before and after 4 weeks of ibrutinib therapy were used to perform a phosphoarray analysis. (A) Volcano plot showing the fold change vs the P value obtained for each evaluated phosphorylation site. Black dots refer to sites that did not change after treatment (63 phosphorylation sites). Depicted in color are the sites that were significantly dephosphorylated (green dots, 12 sites) or phosphorylated (red dots, 19 sites) during therapy ($P < .05$; $n = 3$; 2-tailed paired Student t test). The reference for each numbered dot is depicted in panel B. (B) Heat map showing the targeted proteins with their corresponding phosphorylation sites in 3 CLL patient samples. Heat map scale is shown at the bottom. (C) Statistically significant changes in phosphorylation rate (red, upper panel) or dephosphorylation rate (green, lower panel) during ibrutinib administration are shown. Each square represents the signal ratio of the antibody against the unphosphorylated form of the site before and after treatment, connected with the round dot for the signal ratio of the phosphorylated form ($P < .05$; $n = 3$; 2-tailed paired Student t test). Relevant proteins associated with inactivation of PI3K/AKT, JAK/STAT, and p53 pathway are indicated in bold at the x axes.

corresponding values were 7.2% pre- and 2.5% at week 4 posttreatment ($n = 9$; $P = .0007$), whereas for CXCR4^{low}/CD5^{high}, subset percentages were 10% pre- and 1.13% at week 4 ($n = 5$;

$P = .0016$; 1-way ANOVA, multiple comparisons test). It was possible that AID-positive cells were more sensitive to the treatment, and therefore preferentially lost in the treated

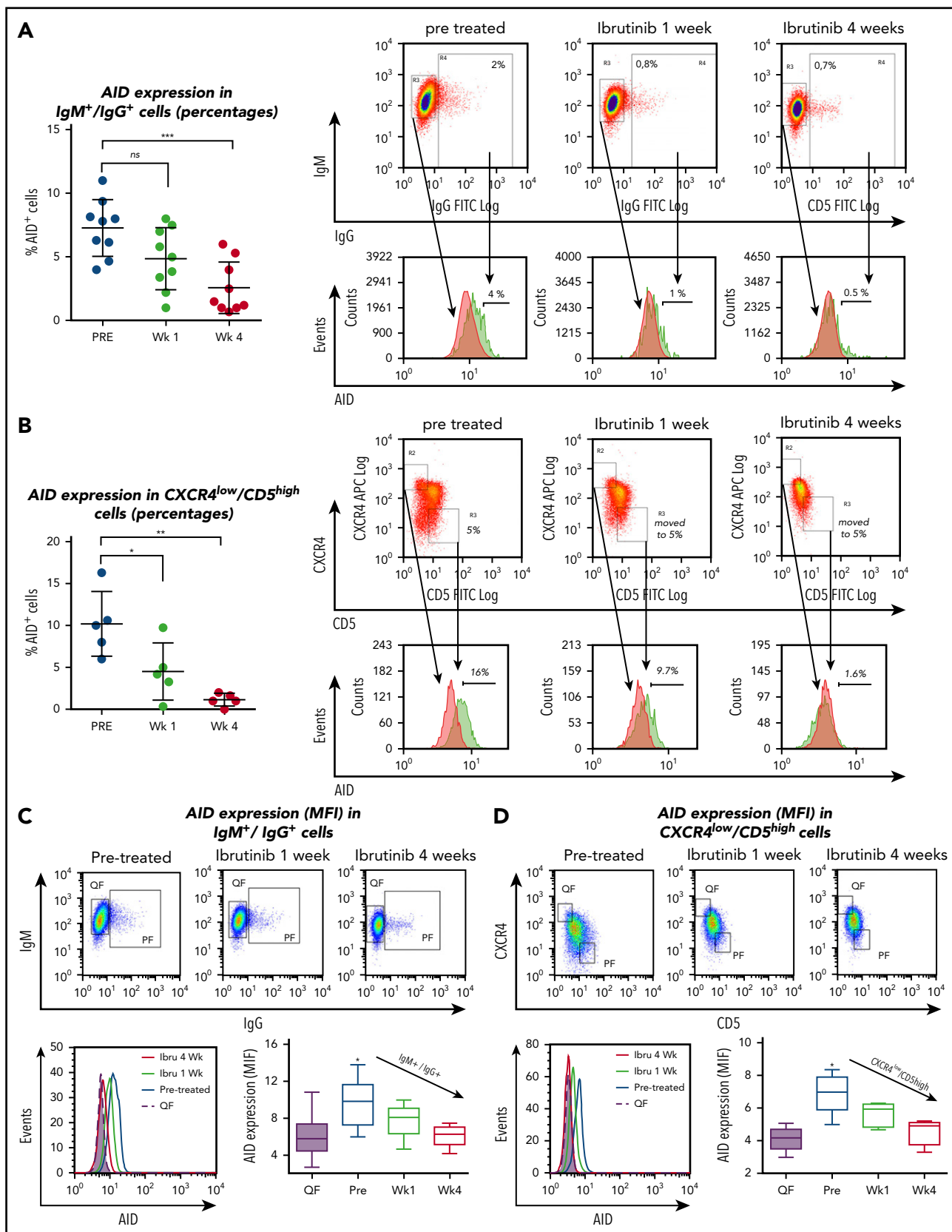


Figure 3. Analysis of AID expression in B cells from ibrutinib-treated patients with CLL. PBMC samples from patients with CLL before and after 1 and 4 weeks of ibrutinib in vivo therapy were studied by flow cytometry to measure intracellular AID protein. Leukemic cells were discriminated by gating lymphocytes and by labeling CD19 plus CD5. Expression of AID as percentage of positive cells in the proliferative $CD19^+/IgM^+/IgG^+$ subset compared with IgM^+/IgG^+ quiescent cells or from proliferative $CD19^+/CD5^{high}/CXCR4^{low}$ vs $CD19^+/CD5^{low}/CXCR4^{high}$ quiescent cells for treatment at 3 times. (A) Results for the IgM^+/IgG^+ subset in the whole group of patients evaluated (left graphic) and 1 representative cytometry data (right graphic). The corresponding median values were 7.2% pre- and 2.5% at week 4 posttreatment (mean difference, 4.7%; 95% CI, 2.3-7.2;

samples. If this were the case, AID might not be decreased in the leukemic cells, but instead, CLL cells expressing AID might die after ibrutinib treatment. To test this hypothesis, we quantified AID protein levels in the QF of patients with CLL ($n = 30$) and in CXCR4^{low}CD5^{high} and IgM⁺/IgG⁺ PFs of treated samples ($n = 10$), using mean fluorescence intensities (MFIs) before and during ibrutinib therapy. Our results showed that AID MFI levels are significantly decreased in these subsets after ibrutinib treatment. The mean of cells expressing AID in IgM⁺/IgG⁺ PF at pretreatment was 9.7 MFI vs 6.0 MFI at week 4 (mean differences, 3.7; 95% CI, 1.4-6.0; $P = .0004$; $n = 10$). For CXCR4^{low}CD5^{high} PF, pretreatment was 7.0 MFI vs 4.5 MFI for week 4 (mean differences, 2.4; 95% CI, 1.0-3.7; $P = .0004$; $n = 5$; 1-way ANOVA, multiple comparisons test). These data confirm that downregulation of AID cannot be solely explained by the disappearance of AID-positive CLL cells (Figure 3A-B), but most likely by a decrease of AID expression on individual CLL cells evidenced by MFI differences (Figure 3C-D). Altogether, our results show that AID expression is decreased in the IgM⁺/IgG⁺ and CXCR4^{low}/CD5^{high} subsets within the leukemic clone after ibrutinib therapy.

AID downregulation in CLL cells by ibrutinib is associated with dephosphorylation of the transcription factor STAT6

Compagno et al reported that inhibition of BTK by ibrutinib increased AID expression in vitro in human lymphoma and leukemia cell lines,²⁸ which was different from our results using primary CLL cells from patients treated with ibrutinib. Because different technical approaches (flow cytometry and immunoblot) were used in each laboratory and to corroborate our findings, we first evaluated AID expression in the MEC-1 CLL cell line by both techniques. Our results using immunoblot confirm those previously obtained by Compagno et al, showing upregulation of AID after incubation with ibrutinib and idelalisib in MEC-1 cells, which additionally allowed us to further validate the flow cytometry technique that we used to assess AID expression (Figure 4A). We then used the same strategy to analyze patient-derived CLL cell cultures. PBMC from 5 different patients with CLL were incubated with ibrutinib at 0.3 and 1 μ M for 24 and 48 hours, and AID expression was evaluated by qPCR and immunoblot. Despite the fact that ibrutinib increased AID protein levels in MEC-1 cells, no differences in AID expression were noted in primary CLL cell cultured with ibrutinib. As depicted in Figure 4B, no differences of AID expression were detected when comparing control samples with those incubated with ibrutinib. As positive controls, we used samples from primary CLL cells cultured with CD40L+IL4 as stimuli, or MEC-1 cells incubated with different concentrations of ibrutinib, both of which induced AID expression. Two representative patients of this experiment are shown (Figure 4A-B).

Taking into account that different proliferation rates exist between MEC-1 cell line and CLL cells from PB, and knowing that a direct correlation exists between AID and proliferation,⁵⁴ we investigated the profile of AID expression in primary CLL samples stimulated with CD40L+IL-4 and subsequently incubated with ibrutinib. Our results show a significant decrease of proliferation in the leukemic clone activated with CD40L+IL-4+ ibrutinib, whereas CLL cell survival appears to be not affected (Figure 4C, upper panels). Interestingly, proliferation decrease is accompanied by downregulation of AID at mRNA and protein levels (Figure 4C, lower panels). Concerning the MEC-1 cell line, our results shown that proliferation is not significantly affected by ibrutinib at 24, 48, 72, or 96 hours (Figure 4A, lower panel), whereas AID protein is increased, as it has been previously demonstrated by Compagno et al²⁸ (Figure 4A,D).

IL-4 is a common origin of the 2 pathways (PI3K/AKT and JAK1) that appear to be modulated by ibrutinib in the PF CXCR4^{low}/CD5^{high}.^{53,55} After IL-4 stimulation, cytoplasmic STAT6 monomers are phosphorylated by JAK1 and JAK3,^{56,57} and the homodimers translocated to the nucleus^{57,58} with the consequent AID expression.⁵¹ To further investigate the role of ibrutinib and its effect on AID expression in proliferative CLL cells, we evaluated the phosphorylation status of the transcription factor STAT6 and AID expression in in vitro experiments after CD40L+IL-4 activation. Our results show that phosphorylation of STAT6 is diminished after in vitro activation of CD40L+IL-4 of CLL cells incubated with ibrutinib, and that dephosphorylation of Tyr641 is associated with decreased AID expression (Figure 4D). Interestingly, the MEC-1 cell line appears to be unable to phosphorylate Tyr641 of STAT6 after ibrutinib, independent of its expression (Figure 4D). Altogether, our results suggest that IL-4/JAK1/STAT6 could be the axis responsible for ibrutinib AID-downregulation in the leukemic clone, and that different regulation mechanisms could account for AID expression between MEC-1 cell line and CLL cells.

Discussion

CLL treatment has rapidly evolved over the last few years because of the increased availability and use of novel agents that target BCR signaling and other microenvironment-derived signals.² Specifically, kinase inhibitors targeting the BCR-related kinases BTK and PI3K δ , ibrutinib and idelalisib, are increasingly replacing chemotherapy-based treatment in patients with CLL.^{2,59} The key mechanism of action of these agents is to disrupt cross-talk between CLL cells and their supportive tissue microenvironment, which promote CLL cell survival and proliferation.^{60,61} One of the consequences of CLL cell microenvironment interactions is increased expression of the mutagenic enzyme AID in CLL cells,^{5,62}

Figure 3 (continued) $P = .0007$, 1-way ANOVA, multiple comparisons test). Nonsignificant differences were found between pre- and 1 week posttreatment samples ($P = .810$). Right panel shows representative dot plots of the gates constructed to select the subsets and from where the histograms of AID expression were obtained. PF and QF are depicted in green and red, respectively. (B) Results for the CXCR4 low/CD5 high fraction in the whole group of patients evaluated (left graphic) and 1 representative cytometry data (right graphic). Significant differences were found comparing pre-treatment mean (10%) vs mean posttreatment at week 1, 4.5%; (mean difference, 5.68%; 95% CI, 0.91-10.45; $P = .278$) and vs week 3, 1.13% (mean difference, 9.5%; 95% CI, 4.3%-13.8%; $P = .0016$ by 1-way ANOVA, multiple comparisons test). PF and QF are depicted in green and red, respectively. (C-D) MFI AID expression on the quiescent and proliferative subsets CD19⁺IgM⁺IgG⁺ compared with IgM⁺/IgG⁺ quiescent cells or from proliferative CD19⁺/CD5^{high}/CXCR4^{low} vs CD19⁺/CD5^{low}/CXCR4^{high} quiescent cells, at the points indicated. Intracellular staining of AID as MFI was evaluated. Shown are representative dot plots and gate criteria (higher graphics), as well as AID histograms of cytometric MFI shifts with treatment (lower left graphic) for a single patient. The statistics of the whole cohort evaluated are shown in the lower right graphics. The mean of cells expressing AID in IgM⁺/IgG⁺ PF at pretreatment was 9.7 MFI vs 6.0 MFI at week 4 (mean differences, 3.7; 95% CI, 1.4-6.0; $P = .0004$; $n = 10$). For CXCR4^{low}CD5^{high} PF pretreatment, 7.0 MFI vs 4.5 at week 4 MFI (mean differences, 2.4; 95% CI, 1.0-3.7; $P = .0004$; $n = 5$). One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test was used in all cases ($***P < .0005$).

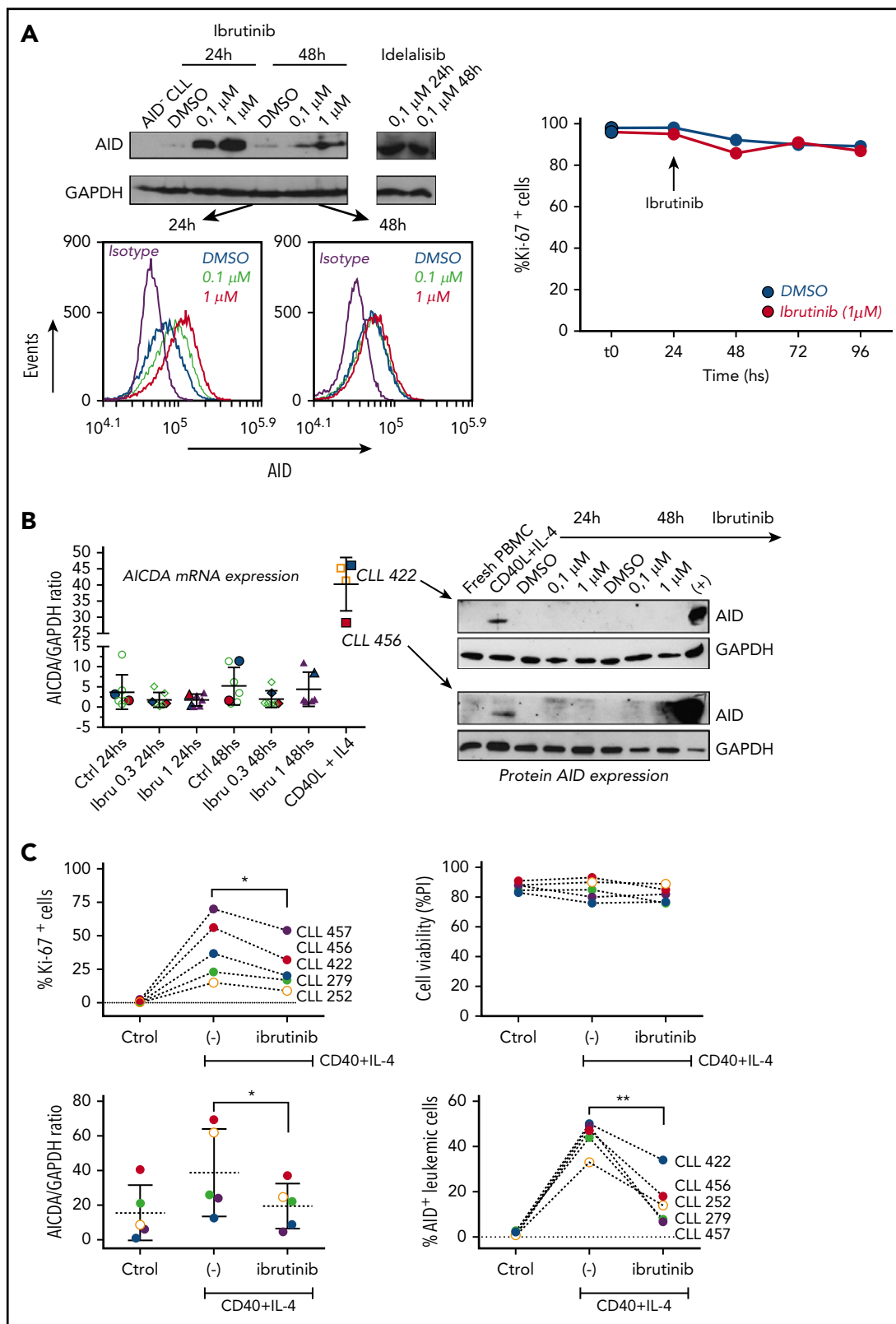


Figure 4. Analysis of AID expression in CLL cells treated in vitro with ibrutinib. (A) MEC-1 cell line was cultured in the presence of ibrutinib at 0.1 and 1 μM for 24 and 48 hours, or in DMSO as control. AID expression at the protein level was evaluated by immunoblotting and flow cytometry techniques. Shown are representative immunoblots (upper graphic) and mean fluorescence cytometry histograms (lower panels), where increasing AID levels are detected for all treated conditions. Proliferation measured by Ki-67 expression was performed at baseline and after 24 and 48 hours of ibrutinib treatment (right graphic). (B) PB CLL cells were incubated in the presence of ibrutinib at 0.3 and 1 μM. DMSO was used as basal control, and CD40L+IL-4 stimulation to induce AID expression was used as positive control (n = 5). AICDA mRNA and protein expression was evaluated at 24 and 48 hours, as indicated in the x-axis. Shown are the results from the whole cohort of patients studied by quantitative qPCR (left graphic) and the immunoblot obtained when studying the 2 patients colored in red and blue (right graphic). AID increase was detected only in the CD40L+IL-4 activated condition for both mRNA and protein

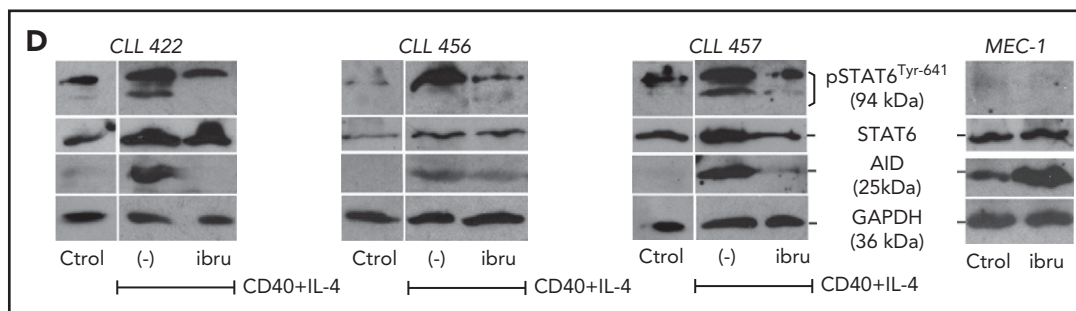


Figure 4. (continued) determinations. (C) PBMC from 5 patients with CLL were incubated with CD40⁺IL-4 or CD40⁺IL-4+ibrutinib 1 μ M, and then cultured for 5 days. Proliferation was evaluated by Ki-67 expression, and viability of cells was analyzed by propidium iodide as a life/death marker (upper graphics). As previously described by Slinger et al,⁴⁴ maximum inhibition of proliferation was achieved after 24 hours. *AICDA* mRNA levels and AID protein were tested by qPCR and immunoblotting, respectively, at the different times and conditions (lower graphics). Significance was calculated comparing stimulated condition (CD40⁺IL-4) with stimulated condition + ibrutinib by 2-tailed, paired t-test (**P* < .05; ***P* < .01). (D) PBMC from 3 patients with CLL were incubated in the presence of CD40L⁺IL-4 in the same conditions as mentioned here. Samples without treatment (RPMI+FBS 10%+DMSO -ctrl-), samples treated with CD40L⁺IL-4 and samples treated with CD40L⁺IL-4+1 μ M of ibrutinib were tested. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (load control); AID; STAT6 and p-STAT6^{Tyr641} proteins expression were evaluated at day 5. Immunoblots depict the effect of ibrutinib on AID expression and STAT6 phosphorylation. Whereas AID and p-STAT6^{Tyr641} decrease during ibrutinib treatment, the nonphosphorylated form of STAT-6 remains unchanged. The same proteins were analyzed in the MEC-1 cell line after incubation with ibrutinib (ibru) or DMSO as control (Ctrl). As depicted, p-STAT6^{Tyr641} was undetectable in neither condition, whereas the nonphosphorylated STAT-6 form remains unchanged. As previously described,²⁸ AID expression increased when MEC1 cells are cultured in presence of ibrutinib.

which remains restricted to the PFs of the leukemic clone.^{4,5,63} Our results confirm these data at protein level in CLL, showing that AID expression in peripheral blood of pretreated patients is either undetectable or only detected in a very low proportion (up to 2%) of the entire leukemic clone. In contrast, AID expression is readily detectable in a relatively large proportion of the CLL PFs defined as IgM⁺/IgG⁺ fraction (4%-10%) or CXCR4^{low}/CD5^{high} subset (12%-28%).

An intriguing set of recent preclinical data suggested that ibrutinib and idelalisib can increase AID expression in vitro.²⁸ This observation had not been tested in human patients. Here, we analyzed serial CLL samples from patients receiving ibrutinib, finding that this therapy substantially reduced, rather than increased, AID expression in the PFs. Because we have to rely on flow cytometry to detect AID protein in the small PFs in patients with CLL, we validated our findings in vitro by AID immunoblotting detection using MEC-1 and primary CLL cells, treated with ibrutinib, or activated with CD40L/IL-4. In vitro treatment of MEC-1 cells with ibrutinib resulted in an increase in AID expression, as previously described.²⁸ However, we were unable to detect AID upregulation by immunoblot or flow cytometry after ibrutinib treatment in primary CLL cell samples, despite AID being readily induced by CD40/IL4 stimulation. We cannot exclude the possibility of minimal changes in AID expression by ibrutinib below the detection level of our methods. To explore this, we performed quantitative PCR analyses evaluating AID expression changes in CLL cells expressing or not *AICDA* mRNA at baseline and treated or not with ibrutinib. qPCR data confirm that, in all cases, *AICDA* mRNA levels were not increased after ibrutinib treatment. Collectively, these results demonstrate that in primary CLL cells, *AICDA* mRNA and protein levels are not increased by ibrutinib treatment in vitro or in vivo and, on the contrary, are decreased in the PFs in ibrutinib-treated patients.

Ibrutinib also decreases CLL cell proliferation in vitro^{32,64} and in vivo.²⁷ Accordingly, in this study, we demonstrate that ibrutinib therapy significantly decreases CLL PFs after 1 month of treatment, corroborating previous data from Herman et al.³² Knowing

that proliferative differences should go hand in hand with molecular changes at the transcriptional and posttranscriptional levels, we interrogated the phosphorylation status of the PF CXCR4^{low}/CD5^{high} before and during ibrutinib treatment, focusing on the phosphorylation profile of AKT/PKB pathway. Our results uncover changes in p53 phosphorylation in the PF during treatment. Considering the importance of the TP53 gene function in the progression and refractoriness of CLL, this could be an interesting observation suggesting the relevance of post-translational modifications of p53 in CLL after ibrutinib treatment. Furthermore, phospho-array analysis also shows that in the PF, the AKT1 and JAK1 proteins become dephosphorylated after treatment. The phosphorylated forms pAKT^{Thr308} and pJAK1^{Tyr1022/Tyr1023} are hallmarks of the PI3K/AKT and JAK1 pathway activation, respectively.^{40,41,65} These observations suggest a role for ibrutinib in the regulation of these 2 pathways in vivo and support our previous work postulating a key role of PI3K/AKT pathway in the generation and/or maintenance of the CLL IgM⁺/IgG⁺ PF.³¹ PI3K/AKT and JAK1 pathways are important drivers of cell proliferation and cell survival, most notably in cells that are responding to growth-factor-receptor engagement in tumor microenvironments.^{65,66} Interestingly, a common activation stimulus of these 2 axes is IL-4, which in synergism with CD40L are responsible to promote B-cell proliferation and activation of CSR to IgG₁ and IgE immunoglobulins.^{53,67} The signal transduction used by IL-4 to activate B cells involves tyrosine phosphorylation of the IL-4 receptor and JAK1 and STAT6 proteins.⁶⁸ IL-4 stimulation induces phosphorylation and nuclear translocation of the transcription factor STAT6, which in turn binds the 5' upstream region of AID gene inducing optimal AID expression.⁵¹ Our results show that in CLL cells, phosphorylation of STAT6 is associated with AID expression after CD40L⁺IL-4 activation and suggest that the signaling IL-4/JAK/STAT could be involved in the origin of PFs and AID expression in the leukemic clone. In CLL, activated IL-4 pathway is a key microenvironment signal associated with disease progression that was recently proposed as an indirect target of ibrutinib therapy.⁶⁹⁻⁷¹ Supporting this notion are recent data from Landau et al, who analyzed CLL transcriptome changes during ibrutinib treatment. Their results demonstrate downregulation of the JAK/STAT pathway, as well

as different cytokines such as IL-4, IL-6, and IL-10.⁷² Altogether, these results suggest that reduction of both AID expression and PFs after ibrutinib treatment could have a common mechanistic basis, associated with changes in the phosphorylation status of IL4/JAK/STAT and AKT/PKB pathway.

Compagno et al reported that PI3K δ inhibitors enhanced AID expression and AID off-target sites in CLL and mantle cell lymphoma cell lines.²⁸ This work also described that patients with CLL treated with idelalisib showed increased somatic hypermutation in AID off-target genes. Interestingly, this was not the case for patient samples treated with ibrutinib (see Figure 4D in Stacchini et al³⁰). Our work sheds some light on this difference by showing that, unlike what occurs in the MEC-1 cell line incubated with ibrutinib or with PI3K δ inhibitors, in CLL cells analyzed either freshly from treated patients or after incubation with ibrutinib *ex vivo*, AID expression is in fact downregulated. Taking into account our results, this disparity could be explained by the fact that different activation pathways are involved in the regulation of AID expression. In CLL cells, ibrutinib appears to be responsible of AID diminution via IL-4/JAK/STAT6 pathway, whereas in the MEC-1 cell line, it does not appear to be the case. Moreover, there seems to be an additional difference between the effect to ibrutinib and idelalisib in patients with CLL regarding their ability to induce AID. This difference suggests that these 2 drugs may also differ in their potential to cause additional genomic instability, which should be considered when judging the possible collateral risks of these therapies. Despite the fact that our results propose that PFs and AID expression are downmodulated by ibrutinib via JAK/STAT6 axis, ibrutinib resistance in CLL has been vastly documented.⁷³⁻⁷⁵ Thus, additional axes other than AKT/PKB and JAK/STAT pathways might also be involved during disease progression in CLL. Finally, our results also suggest that although ibrutinib reduce PFs, it does not appear to seriously affect the viability of the CLL cells (Figure 4C and published data of Slinger et al⁴⁴). On the basis of these data, we speculate that not all CLL cells within PFs undergo cell death during treatment with ibrutinib, and consequently, surviving subclones that persist over time can give rise to ibrutinib-refractory clones. Recent data by Primo et al,⁷⁶ demonstrating that approximately 10% of cultured CLL cells still can proliferate *in vitro* in the presence of high ibrutinib concentrations, support this concept.

In summary, we demonstrate that AID expression and CLL PFs are diminished during ibrutinib therapy, both of which are desirable outcomes for this leukemia. This work also emphasizes the importance of the microenvironment signaling

on the regulation of proliferating subsets and AID expression in CLL.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FMV 1_2014_104397 and a Leukemia & Lymphoma Society Scholar Award in Clinical Research (J.A.B.), the CLL Global Research Foundation (J.A.B.), and in part by the Anderson Cancer Center Support Grant CA016672. J.M.D.N. is a Chercheur Boursier Senior of the Fonds de Recherche du Québec.

Authorship

Contribution: J.A.B. and P.O. contributed conception and design; A.I.L., J.A.B., and P.O. provided of study materials and patients samples; P.E.M., M.S., A.U., N.S., and C.B. conducted the experiments; P.E.M., M.S., A.U., N.S., P.F., and P.O. contributed data analysis and interpretation; P.E.M., M.S., J.M.D.N., J.A.B., and P.O. contributed manuscript writing; and all authors read and approved the final manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: J.A.B. has received research support from Gilead and Pharmacyclics. The remaining authors declare no competing financial interests.

The current affiliation for P.E.M. is CONICET-Universidad de Buenos Aires, Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo. Facultad de Farmacia y Bioquímica-Hospital de Clínicas "José de San Martín," Buenos Aires, Argentina.

ORCID profiles: P.F., 0000-0002-8465-476X; P.O., 0000-0003-4194-246X.

Correspondence: Pablo Oppezzo, Institut Pasteur de Montevideo, Research Laboratory on Chronic Lymphocytic Leukemia, Montevideo 11400, Uruguay; e-mail: poppezzo@pasteur.edu.uy; and Jan A. Burger, Department of Leukemia, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd, Houston, TX 77030; e-mail: jaburger@mdanderson.org.

Footnotes

Submitted 24 September 2018; accepted 21 February 2019. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 27 February 2019; DOI 10.1182/blood-2018-09-876292.

*P.E.M. and M.S. contributed equally to this work.

†J.A.B. and P.O. contributed equally as senior authors.

The online version of this article contains a data supplement.

There is a *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

REFERENCES



- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005; 352(8):804-815.
- Burger JA, O'Brien S. Evolution of CLL treatment - from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(8): 510-527.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131(25):2745-2760.
- Palacios F, Moreno P, Morande P, et al. High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood*. 2010;115(22): 4488-4496.
- Patten PE, Chu CC, Albesiano E, et al. IGHV-unmutated and IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia cells produce activation-induced deaminase protein with a full range of biologic functions. *Blood*. 2012;120(24):4802-4811.
- Pepper C, Ward R, Lin TT, et al. Highly purified CD38+ and CD38- sub-clones derived from the same chronic lymphocytic leukemia patient have distinct gene expression signatures despite their monoclonal origin. *Leukemia*. 2007;21(4):687-696.
- Calissano C, Damle RN, Hayes G, et al. *In vivo* intraclonal and interclonal kinetic

heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114(23):4832-4842.

8. Calissano C, Damle RN, Marsilio S, et al. Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1374-1382.
9. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563-574.
10. Caligaris-Cappio F, Bertilaccio MT, Scielzo C. How the microenvironment wires the natural history of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:43-48.
11. Cols M, Barra CM, He B, et al. Stromal endothelial cells establish a bidirectional cross-talk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J Immunol*. 2012;188(12):6071-6083.
12. Pone EJ, Zhang J, Mai T, et al. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-κB pathway. *Nat Commun*. 2012;3(1):767.
13. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):165-196
14. Casellas R, Basu U, Yewdell WT, Chaudhuri J, Robbiani DF, Di Noia JM. Mutations, kataegis and translocations in B cells: understanding AID promiscuous activity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(3):164-176.
15. Robbiani DF, Bunting S, Feldhahn N, et al. AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol Cell*. 2009;36(4):631-641.
16. Feldhahn N, Henke N, Melchior K, et al. Activation-induced cytidine deaminase acts as a mutator in BCR-ABL1-transformed acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med*. 2007;204(5):1157-1166.
17. Kawamura K, Wada A, Wang JY, et al. Expression of activation-induced cytidine deaminase is associated with a poor prognosis of diffuse large B cell lymphoma patients treated with CHOP-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(1):27-36.
18. Huemer M, Rebhandl S, Zaborsky N, et al. AID induces intraclonal diversity and genomic damage in CD86(+) chronic lymphocytic leukemia cells. *Eur J Immunol*. 2014;44(12):3747-3757.
19. Opezzo P, Vuillier F, Vasconcelos Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood*. 2003;101(10):4029-4032.
20. Heintel D, Kroemer E, Kienle D, et al; German CLL Study Group. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2004;18(4):756-762.
21. Leuenerberger M, Frigerio S, Wild PJ, et al. AID protein expression in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma is associated with poor prognosis and complex genetic alterations. *Mod Pathol*. 2010;23(2):177-186.
22. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol*. 2013;34(12):592-601.
23. Cheng S, Ma J, Guo A, et al. BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*. 2014;28(3):649-657.
24. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, et al; RESONATE-2 Investigators. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(25):2425-2437.
25. Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, et al; RESONATE Investigators. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(3):213-223.
26. Herman SE, Niemann CU, Farooqui M, et al. Ibrutinib-induced lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia: correlative analyses from a phase II study. *Leukemia*. 2014;28(11):2188-2196.
27. Burger JA, Li KW, Keating MJ, et al. Leukemia cell proliferation and death in chronic lymphocytic leukemia patients on therapy with the BTK inhibitor ibrutinib. *JCI Insight*. 2017;2(2):e89904.
28. Compagno M, Wang Q, Pighi C, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase δ blockade increases genomic instability in B cells. *Nature*. 2017;542(7642):489-493.
29. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(11):997-1007.
30. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res*. 1999;23(2):127-136.
31. Palacios F, Abreu C, Prieto D, et al. Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia*. 2015;29(1):115-125.
32. Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA, et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF-κB signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood*. 2014;123(21):3286-3295.
33. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, et al. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia*. 2007;21(1):110-120.
34. Palacios F, Prieto D, Abreu C, et al. Dissecting chronic lymphocytic leukemia microenvironment signals in patients with unmutated disease: microRNA-22 regulates phosphatase and tensin homolog/AKT/FOXO1 pathway in proliferative leukemic cells. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(5):1560-1565.
35. Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):387-402.
36. Banerji V, Frumm SM, Ross KN, et al. The intersection of genetic and chemical genomic screens identifies GSK-3α as a target in human acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(3):935-947.
37. Guezguez B, Almakadi M, Benoit YD, et al. GSK3 deficiencies in hematopoietic stem cells initiate pre-neoplastic state that is predictive of clinical outcomes of human acute leukemia. *Cancer Cell*. 2016;29(1):61-74.
38. Meyer SC, Levine RL. Molecular pathways: molecular basis for sensitivity and resistance to JAK kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2014;20(8):2051-2059.
39. Szymonowicz K, Oeck S, Malewicz NM, Jendrossek V. New insights into protein kinase B/Akt Signaling: role of localized Akt activation and compartment-specific target proteins for the cellular radiation response. *Cancers (Basel)*. 2018;10(3):E78.
40. Ravandi F, Talpaz M, Kantarjian H, Estrov Z. Cellular signalling pathways: new targets in leukaemia therapy. *Br J Haematol*. 2002;116(1):57-77.
41. Gordon GM, Lambert QT, Daniel KG, Reuther GW. Transforming JAK1 mutations exhibit differential signalling, FERM domain requirements and growth responses to interferon-γ. *Biochem J*. 2010;432(2):255-265.
42. Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, et al. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*. 2001;409(6818):349-354.
43. Blunt MD, Koehrer S, Dobson RC, et al. The dual Syk/JAK inhibitor cerdulatinib antagonizes B-cell receptor and microenvironmental signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2017;23(9):2313-2324.
44. Slinger E, Thijssen R, Kater AP, Eldering E. Targeting antigen-independent proliferation in chronic lymphocytic leukemia through differential kinase inhibition. *Leukemia*. 2017;31(12):2601-2607.
45. Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA. Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2004;279(39):41189-41196.
46. Li X, Lu Y, Jin W, Liang K, Mills GB, Fan Z. Autophosphorylation of Akt at threonine 72 and serine 246. A potential mechanism of regulation of Akt kinase activity. *J Biol Chem*. 2006;281(19):13837-13843.
47. Kuo YC, Huang KY, Yang CH, Yang YS, Lee WY, Chiang CW. Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J Biol Chem*. 2008;283(4):1882-1892.
48. Yang H, Jiang X, Li B, et al. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*. 2017;552(7685):368-373.

49. Tran TH, Nakata M, Suzuki K, et al. B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress *Aicda* by overcoming the effects of silencers. *Nat Immunol.* 2010;11(2):148-154.
50. Zan H, Casali P. Regulation of *Aicda* expression and AID activity. *Autoimmunity.* 2013;46(2):83-101.
51. Dedeoglu F, Horwitz B, Chaudhuri J, Alt FW, Geha RS. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol.* 2004;16(3):395-404.
52. Zhou C, Saxon A, Zhang K. Human activation-induced cytidine deaminase is induced by IL-4 and negatively regulated by CD45: implication of CD45 as a Janus kinase phosphatase in antibody diversification. *J Immunol.* 2003;170(4):1887-1893.
53. Linehan LA, Warren WD, Thompson PA, Grusby MJ, Berton MT. STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J Immunol.* 1998;161(1):302-310.
54. Rush JS, Liu M, Odegard VH, Unniraman S, Schatz DG. Expression of activation-induced cytidine deaminase is regulated by cell division, providing a mechanistic basis for division-linked class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(37):13242-13247.
55. Pauls SD, Lafarge ST, Landego I, Zhang T, Marshall AJ. The phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in normal and malignant B cells: activation mechanisms, regulation and impact on cellular functions. *Front Immunol.* 2012;3:224.
56. Witthuhn BA, Silvennoinen O, Miura O, et al. Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature.* 1994;370(6485):153-157.
57. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science.* 1994;265(5179):1701-1706.
58. Mikita T, Campbell D, Wu P, Williamson K, Schindler U. Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Mol Cell Biol.* 1996;16(10):5811-5820.
59. Robak T, Stilgenbauer S, Tedeschi A. Front-line treatment of CLL in the era of novel agents. *Cancer Treat Rev.* 2017;53:70-78.
60. Opezzo P, Dighiero G. Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 2013;3(9):e149.
61. Ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(3):401-413.
62. Opezzo P, Dumas G, Lalanne AI, et al. Different isoforms of BSAP regulate expression of AID in normal and chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2005;105(6):2495-2503.
63. Damle RN, Temburni S, Calissano C, et al. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood.* 2007;110(9):3352-3359.
64. Herman SE, Mustafa RZ, Jones J, Wong DH, Farooqui M, Wiestner A. Treatment with ibrutinib inhibits BTK- and VLA-4-dependent adhesion of chronic lymphocytic leukemia cells in vivo. *Clin Cancer Res.* 2015;21(20):4642-4651.
65. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(3):184-192.
66. Oppermann S, Lam AJ, Tung S, et al. Janus and PI3-kinases mediate glucocorticoid resistance in activated chronic leukemia cells. *Oncotarget.* 2016;7(45):72608-72621.
67. Stavnezer J. Antibody class switching. *Adv Immunol.* 1996;61:79-146.
68. Siemasko K, Chong AS, Jäck HM, Gong H, Williams JW, Finnegan A. Inhibition of JAK3 and STAT6 tyrosine phosphorylation by the immunosuppressive drug leflunomide leads to a block in IgG1 production. *J Immunol.* 1998;160(4):1581-1588.
69. Guo B, Zhang L, Chiorazzi N, Rothstein TL. IL-4 rescues surface IgM expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2016;128(4):553-562.
70. Aguilar-Hernandez MM, Blunt MD, Dobson R, et al. IL-4 enhances expression and function of surface IgM in CLL cells. *Blood.* 2016;127(24):3015-3025.
71. Chen SS. IL-4R-IL-4 axis disruption by ibrutinib therapy contributes to the greater vulnerability of U-CLL clones to loss of microenvironmental inputs. XVII International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia; New York, NY; 2017.
72. Landau DA, Sun C, Rosebrock D, et al. The evolutionary landscape of chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib targeted therapy. *Nat Commun.* 2017;8(1):2185.
73. Burger JA, Landau DA, Taylor-Weiner A, et al. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat Commun.* 2016;7(1):11589.
74. Cheng S, Guo A, Lu P, Ma J, Coleman M, Wang YL. Functional characterization of BTK(C481S) mutation that confers ibrutinib resistance: exploration of alternative kinase inhibitors. *Leukemia.* 2015;29(4):895-900.
75. Woyach JA, Furman RR, Liu TM, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med.* 2014;370(24):2286-2294.
76. Primo D, Scarfò L, Xochelli A, et al. A novel ex vivo high-throughput assay reveals anti-proliferative effects of idelalisib and ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget.* 2018;9(40):26019-26031.

LPL protein in Chronic Lymphocytic Leukaemia have different origins in Mutated and Unmutated patients. Advances for a new prognostic marker in CLL

Daniel Prieto,^{1,2}  Noé Seija,^{1,3}
 Angimar Uriepero,¹ Thais Souto-
 Padron,^{4,†} Carolina Oliver,⁵ Victoria
 Irigoien,⁵ Cecilia Guillermo,⁵ Marcelo A.
 Navarrete,⁶ Ana Inés Landoni,⁷
 Guillermo Dighiero,⁷ Raúl Gabus,⁷
 Mirta Giordano⁸ and Pablo Oppezzo¹ 

¹Chronic Lymphocytic Leukaemia Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, ²Department of Developmental Neurobiology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, ³Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁴Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, CCS, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵Cátedra de Hematología, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ⁶School of Medicine, University of Magallanes, Punta Arenas, Chile, ⁷Hospital Maciel, Administración Servicios de Salud del Estado, Ministerio de Salud, Montevideo, Uruguay and ⁸Laboratorio de Inmunología Oncológica, Instituto de Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina

Received 9 February 2018; revised 17 April 2018; accepted for publication 18 April 2018

*Correspondence: Oppezzo Pablo, Institut Pasteur de Montevideo, Research Laboratory on Chronic Lymphocytic Leukaemia, Mataojo 2020, Montevideo 11400, Uruguay.
 e-mail: poppezzo@pasteur.edu.uy

†Deceased 10 July 2017

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is an indolent B cell neoplasm with monoclonal CD5 positive cells that accumulate in lymphoid organs (LO) and bone marrow and move into peripheral blood (PB) (Oppezzo & Dighiero, 2013). A proliferating pool of cells resides in LO, feeding the accumulation pool in the PB (Palacios *et al*, 2010; Calissano *et al*,

Summary

Lipoprotein lipase (*LPL*) mRNA expression in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is associated with an unmutated immunoglobulin profile and poor clinical outcome. We evaluated the subcellular localization of LPL protein in CLL cells that did or did not express *LPL* mRNA. Our results show that LPL protein is differently located in CLL cells depending on whether it is incorporated from the extracellular medium in mutated CLL or generated *de novo* by leukaemic cells of unmutated patients. The specific quantification of endogenous LPL protein correlates with mRNA expression levels and mutational *IGHV* status, suggesting LPL protein as a possible reliable prognostic marker in CLL.

Keywords: Chronic Lymphocytic Leukaemia, LPL, prognostic marker, *IGHV* profile, flow cytometry.

2011). Signalling from the microenvironment regulates this proliferative/quiescent dynamics and is probably one of the major causes of the biological and clinical CLL heterogeneity (Oppezzo & Dighiero, 2013). While the mutational status of immunoglobulin heavy chain variable (*IGHV*) genes is considered a good prognostic marker in CLL (Parikh *et al*,

2016), its heterogeneity justifies further exploration of new biomarkers that can predict therapy response (Rosenquist *et al*, 2013). We described that Unmutated (Um) CLL patients, usually associated with poor clinical outcome, could be differentiated from mutated (Mut) ones by expression of the lipoprotein lipase gene (*LPL*) (Oppezzo *et al*, 2005; Vasconcelos *et al*, 2005). Since then, multiple evidence has confirmed *LPL* mRNA expression as one of the most robust molecular markers in CLL (Rombout *et al*, 2016).

Besides the potential relevance of *LPL* as a prognostic marker, there are still unsolved questions regarding the role of the enzyme it encodes in CLL pathogenesis. Under physiological conditions the main role of *LPL* is related to lipid metabolism and transport. It has been shown that *LPL* expression confers a survival advantage to CLL cells (Rozovski *et al*, 2015), although other work suggests that *LPL* is catalytically inactive in CLL (Mansouri *et al*, 2010; Porpaczy *et al*, 2013). A comprehensive characterization of this protein inside the tumour lymphocyte is essential to confirm the different roles of *LPL* expression in the leukaemic clone. We hereby analysed the sub-cellular localization of *LPL* protein in CLL, comparing leukaemic cells expressing *LPL* mRNA ($LPL^{mRNA/pos}$) or not ($LPL^{mRNA/neg}$). Additionally, our results led us to study whether measuring *LPL* protein content by flow cytometry could become a reliable *IGHV* surrogate.

We studied the PB of 42 patients with a confirmed CLL diagnosis. PB mononuclear cells (PBMC) were isolated and the mutational status and *LPL* mRNA expression performed as described (Oppezzo *et al*, 2005). Clinical and molecular characterization of the patients is depicted in Supplementary Table S1. Full details of the methods used are provided in supplementary data.

CLL cells that expressed *LPL* mRNA-transcripts ($LPL^{mRNA/pos}$) or not ($LPL^{mRNA/neg}$) showed marked differences in *LPL* subcellular localization (Fig 1). Whereas the $LPL^{mRNA/pos}$ group showed a perinuclear *LPL* sub-localization (Fig 1A, white arrows), $LPL^{mRNA/neg}$ patients and B cells from healthy donors, showed lower intensity of *LPL* staining with peripheral localization, (middle and bottom panels, Fig 1A).

Co-immunostaining of *LPL* with the endoplasmic reticulum (ER) cisternae marker calnexin (CLX), and LAMP1, as a marker of late endosomes/lysosomes, showed that *LPL* was associated with ER in $LPL^{mRNA/pos}$ cells, evidenced by overlapping of *LPL* and CLX signals (Fig 1B, arrows in top panels), whereas small quantities of *LPL* protein are associated with LAMP1. In contrast, in $LPL^{mRNA/neg}$ co-localization of *LPL* protein with CLX is barely detected, and the majority of *LPL* overlaps with LAMP1 (Fig 1B, bottom panel, white arrows). These results were validated in six CLL cases of each group ($CLL^{mRNA/pos}$ and $CLL^{mRNA/neg}$) and four samples from healthy donors. Subsequently, these findings were confirmed by immuno-electron microscopy, with immunogold labelling of *LPL* being mainly observed in cisternae of ER in three $LPL^{mRNA/pos}$ samples, whereas in $LPL^{mRNA/neg}$ samples

($n = 3$) labelling was mainly found in vesicles, (Supplementary Fig 1A).

The presence of *LPL* protein inside endosomes of CLL cells that lack *LPL* mRNA expression suggests the incorporation of external protein into tumour cells. To explore this hypothesis, we incubated CLL cells from both groups of patients for 24 h in serum-free medium (SFM) or in autologous plasma and evaluated the presence and localization of *LPL*. Autologous plasma incubation seemed to increase the proportion of *LPL* positive cells as compared to incubation with SFM (Fig 1C). After validation of this finding by flow cytometry and fluorescent microscopy (Supplementary Fig 1B), we tested the subcellular colocalization of *LPL* after incubation with autologous plasma. In the $LPL^{mRNA/pos}$ cells, *LPL* colocalized with CLX and LAMP1 (Fig 1D, top panels, white and red arrows, respectively). In $LPL^{mRNA/neg}$ patients *LPL* appears to be internalized and remains excluded from ER being mainly associated with LAMP1 vesicles (white arrows in Fig 1D, bottom panels).

The incorporation by CLL cells of either human *LPL* from plasma or bovine *LPL* from fetal bovine serum (FBS) represents a challenge for the development of a reliable prognostic method because frozen PBMCs, a usual form of preserving CLL cells, could lead to equivocal results. To overcome this issue, we optimized concentrations, temperatures and times of heparin incubation of CLL PBMCs for removal of cell-surface attached *LPL* (data not shown) and compared this protocol between fresh and frozen PBMCs from the same patients. Our results demonstrated that heparin treatment detaches *LPL* protein from the CLL cell surface, but endogenous *LPL*, either in intracellular vesicles of $LPL^{mRNA/neg}$ cases or in the ER of $LPL^{mRNA/pos}$ group, remains (Fig 2A, white arrows in heparin-treated panels, and representative histograms). These results further confirm that external *LPL* could be incorporated by CLL cells and show that heparin treatment is not enough to achieve an accurate *LPL* measure.

As frozen cells could be a source of unspecific *LPL* immunostaining (Fig 1C) we established the optimal conditions in which *LPL* protein detection displayed the best specificity/sensitivity properties. To this aim we analysed 20 patients, 10 $LPL^{mRNA/neg}$ and 10 $LPL^{mRNA/pos}$ and evaluated different conditions: (i) frozen/thawed PBMCs; (ii) frozen/thawed PBMCs plus heparin; (iii) fresh PBMCs; and (iv) fresh PBMCs plus heparin. Supporting our previous observations, heparin treatment in fresh PBMCs was the best option to improve cytometric detection of *LPL* (Fig 2B, bottom right panel). To confirm these results, *LPL* protein and mRNA expression was analysed in 42 CLL cases using fresh samples. Our results showed that *LPL* protein measurement by flow cytometry had an optimal cut-off value of 25% for *IGHV* mutational status prediction, achieving a sensitivity of 95.24 (95% confidence interval [CI] 76.18–99.88) and a specificity of 100 (95% CI: 83.89–100). Using this strategy, the only discordant case was CLL_37 in which *LPL* expression was 21%. (Fig 2C).

Finally, we explored the potential predictive prognostic power of *LPL* protein measurement using time to first treatment (TTFT) as primary endpoint and compared it with

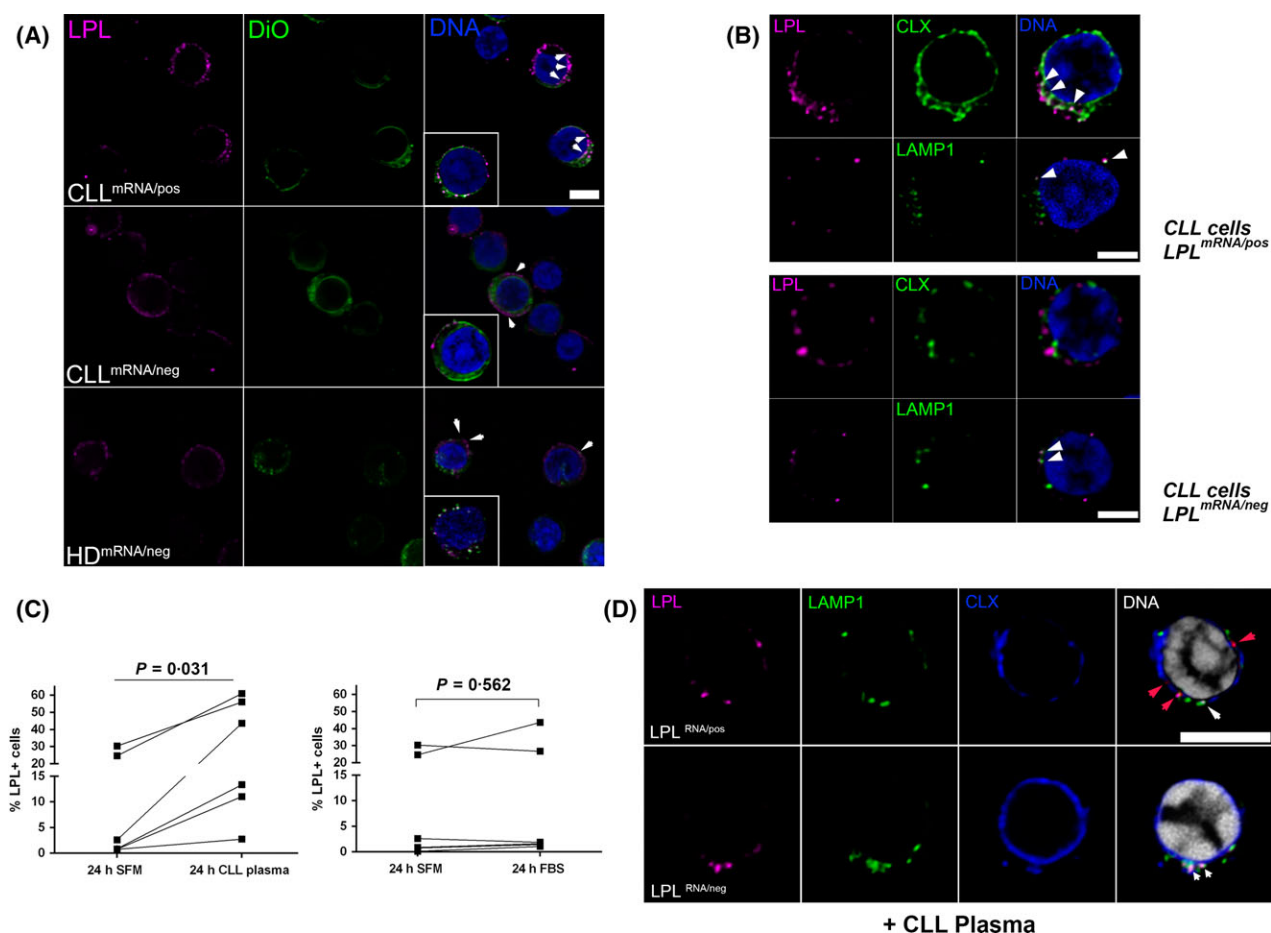


Fig 1. Subcellular localization of LPL and internalization from plasma or FBS of this protein in CLL B-cells. **(A)** Subcellular distribution of LPL immunoreactivity in relation to cellular membranes. LPL signal shows a different pattern in cells from LPL^{mRNA/pos} patients than in those from LPL^{mRNA/neg} patients. A perinuclear membrane localization was found in cells from LPL^{mRNA/pos} patients. Insets show a representative cell with typical LPL distribution in LPL^{mRNA/pos}, LPL^{mRNA/neg} patients cells and B cells from a representative healthy donor (HD) (white arrows). **(B)** Cells from LPL^{mRNA/pos} patients display two different populations of LPL, one localized in the cisternae of the endoplasmic reticulum (ER) - as shown by calnexin (CLX) staining (arrowheads, upper panels), and the other punctually excluded from the ER of which some coincided with LAMP1 positive vesicles (arrowheads, lower panels). LPL immunomarcation was only located in LAMP1 positive vesicles in cells from LPL^{mRNA/neg} patients (white arrows in second panel B). **(C)** Percentage of LPL positive cells measured by flow cytometry after 24-h culture in serum-free medium (SFM) or in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) plasma (left panel). The number of LPL-positive cells increased when cultured in CLL plasma ($P = 0.031$, $n = 6$, Wilcoxon test, two tailed). Cells cultured in fetal bovine serum (FBS) showed a trend to internalization, but this did not reach statistical significance. **(D)** LPL internalization after culturing LPL^{mRNA/pos} (upper panels) or LPL^{mRNA/neg} (lower panels) cells in CLL plasma. In LPL^{mRNA/pos} LPL (top panels), labelling (magenta) is mainly visualized into calnexin-positive zones (Blue), depicted with red arrows, whereas a small amount of LPL protein was located in LAMP1 (green) positive vesicles (white arrows). In bottom panel, LPL^{mRNA/neg} cells display LPL colocalization with LAMP1 positive vesicles (white arrows) but is excluded from calnexin-positive zones. Scale bar B, C: 5 μm . [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

mutational *IGHV* status and *LPL* mRNA expression. Median TTFT for the evaluated cohort ($n = 36$) was 25 months in CLLs displaying Um *IGHV* genes ($P = 0.001$), 20 months in CLLs expressing *LPL* mRNA ($P = 0.005$) and 25 months for CLLs expressing *LPL* protein, ($P = 0.02$). Median TTFT was not reached in Mut CLLs, *LPL* mRNA/negative and *LPL* protein/negative subgroups (Supplementary Fig 2).

This study provides deep insight into the subcellular localization of LPL within different prognostic subgroups of CLL to gain new perspectives about the functional role of this protein. We describe for the first time that two different

origins could account for LPL expression in the leukaemic clone: (i) an internal source from *LPL* mRNA transcription that exists mainly in Um CLL, and (ii) an external source from plasma or FBS from where LPL appears to be taken up in Um and Mut cases, being specifically recognized by the anti-LPL 5D2 monoclonal antibody (mAb), an antibody originally produced against bovine LPL (Peterson *et al*, 1992). These findings support and complement previous results (Heintel *et al*, 2005) explaining why the expression of *LPL* mRNA in leukaemic cells of Um patients does not correlate with a higher expression of LPL protein.

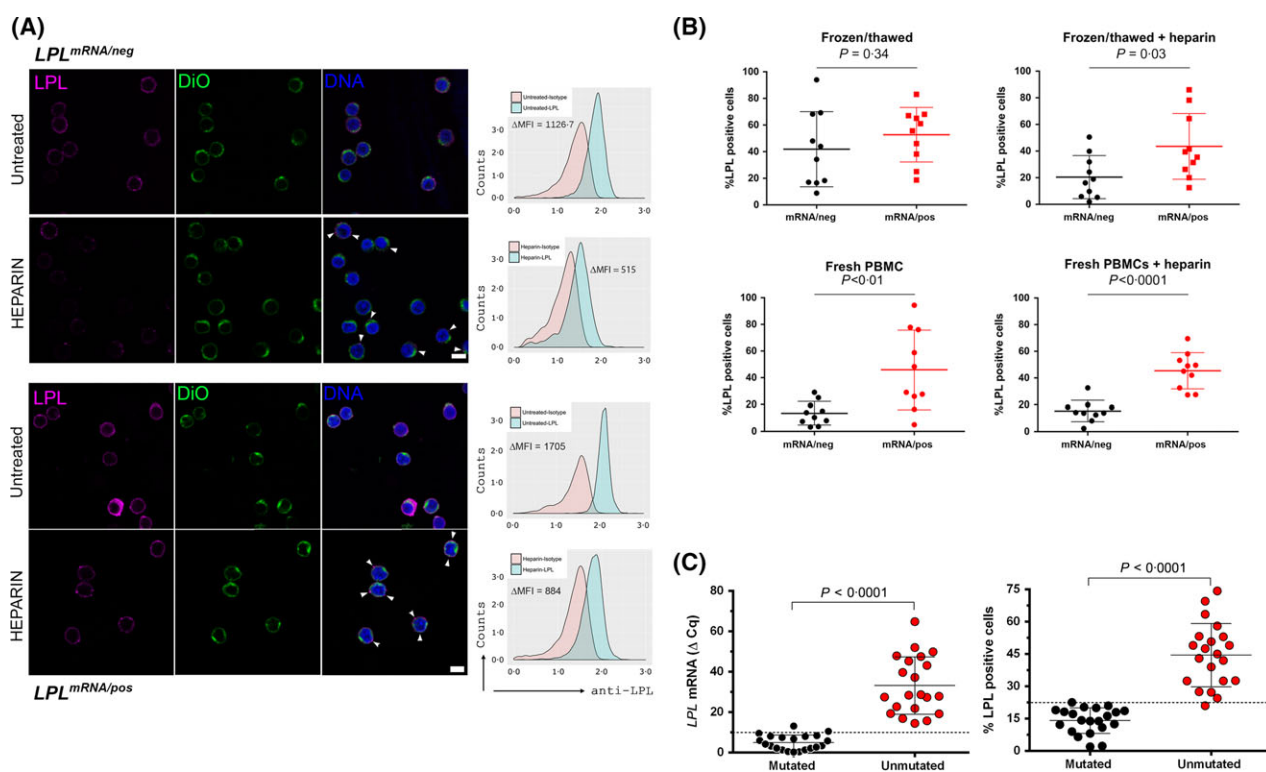


Fig 2. Different protocol conditions to develop a new methodology for measure endogenous LPL protein in CLL. (A) In situ immunolocalization of LPL (magenta) shows staining of both untreated $LPL^{mRNA/neg}$ and $LPL^{mRNA/pos}$ cells (upper panels). A decrease in LPL staining in both subgroups is observed after heparin treatment, uncovering a punctate pattern with noticeable differences between LPL in both subgroups (arrowheads, lower panels). LPL signal was excluded from membrane structures stained by DiOC16 (green). Flow cytometry analysis of median fluorescent staining intensities (MFI) reveals an improvement in LPL protein discrimination. Representative density plots depict MFI differences between anti-LPL labeled cells and its isotype control (delta MFI, right column, log scale). (B) Heparin treatment as previously optimized using frozen PBMC appears not to be enough to obtain a clear cut-off that correctly discriminate $LPL^{mRNA/neg}$ and $LPL^{mRNA/pos}$ (P values = 0.34 and 0.03 for frozen/thawed and frozen/thawed plus heparin respectively, $n = 20$). Freshly collected cells without heparin treatment improve discrimination of $LPL^{mRNA/neg}$ and $LPL^{mRNA/pos}$ cells (right panel, $P = 0.01$, $n = 20$). However best discrimination is obtained with the combination of both variables (heparin treatment and fresh PBMC), as is depicted in the right panel, ($P < 0.0001$, $n = 20$). Each dot represents the percentage of IgM and LPL positive cells from an individual patient. All these conditions were equally tested using the anti-LPL 5D2 mAb in flow cytometry. (C) LPL at the mRNA level by qRT-PCR with a threshold of 10 as previously described in (Heintel *et al*, 2005) discriminated 21/21 Um cases and 19/21 Mut cases. This threshold was confirmed using the Youden index method. LPL at the mRNA level showed a 100% sensitivity with 90% specificity for the identification of Um cases; and 90% sensitivity with 100% specificity for Mut cases. Endogenous LPL protein levels assessed by flow cytometry in freshly collected heparin-treated CLL cells in an expanded cohort show significant differences between $IgVH$ Mut and Um groups ($n = 42$, $P = 0.0001$, unpaired t test with Welch's correction). LPL protein measurement by flow cytometry has an optimal cutoff value for $IgVH$ mutational status prediction of 25%, as assessed by the Youden index. Mutated cases showed a mean of $14.16\% \pm 1.2\%$ LPL positive cells whereas Um cases a mean of $44.51\% \pm 3.1\%$. The mutational status was accurately predicted in 21/21 (100%) Mut and 20/21 (95%) Um cases. The overall concordance was 95%, the two discordant cases, CLL 16 and CLL 11, had values of 13.2 and 10.5 respectively, (Supplementary Table 1). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Secondly, we evaluated whether LPL protein assessment could serve as a possible prognostic tool in CLL, if the necessary conditions are set up. To this aim, we first established the use of fresh CLL cells and heparin surface peeling as optimal conditions for a flow cytometry LPL measurement. Although we show here the feasibility of this technology, there are still some technical challenges to be solved for its widespread application. Note: (i) staining was performed with the 5D2 mAb (Peterson *et al*, 1992) and the performance of commercially available 5D2 mAb remains to be assessed; (ii) While there was a high concordance with the immunoglobulin mutational status and univariate TTFT analysis indicates some potential clinical

value, the prognostic and clinical value of the here proposed methodology should be assessed in a larger prospective cohort.

Finally, our data appear to reinforce the hypothesis that LPL protein in progressive cases could have a catalytic function, providing metabolic survival advantages for the tumour clone. In this case, LPL protein is generated *de novo* and appears to be correctly expressed in a classical ER/Golgi-dependent secretory pathway. Conversely, the hypothesis suggesting that membrane-bound LPL could support proliferation, migration and spread for progressive patients seems unlikely, considering that both Mut and Um patients are able to bind or internalize LPL from plasma indiscriminately.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FMV_2_2011_7323, FMV_1_2014_104397 and FCE_3_2016_1_125765 from ANII, Uruguay, FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund), COF 03/11 and FONDECYT No 11140542, Chile. We wish to specially thank to Dr John D. Brunzell (Division of Metabolism, Endocrinology and Nutrition, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, USA) for kindly provide 5D2 anti-LPL mAb. We also thank the CLL patients who participated in the study.

Authorship contributions

P.D. performed biological studies, collected CLL samples, prepared figures and wrote the paper. U.A.m, S.N. and G.M. performed experiments and collected CLL samples. S.-P.T. supervised electron microscopy analysis. O.C., I.V., C.G., L.A.I. and G.R. performed clinical activities and data collection of CLL patients. N.M. performed data collection of CLL

patients and data analysis. D.G. performed clinical activities and wrote the paper. O.P. designed research, coordinated the study and data analysis and wrote the paper.

Conflicts of interest

The authors declare no competing interest.

Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Figure S1. Subcellular localization of LPL protein in CLL.

Figure S2. Like mRNA levels and *IGHV* mutational status, endogenous LPL protein levels could predict time to first treatment in CLL.

Table S1. Clinical and molecular characterization of CLL patients.

Data S1. Supplementary methods.

References

- Calissano, C., Damle, R.N., Marsilio, S., Yan, X.J., Yancopoulos, S., Hayes, G., Emson, C., Murphy, E.J., Hellerstein, M.K., Sison, C., Kaufman, M.S., Kolitz, J.E., Allen, S.L., Rai, K.R., Ivanovic, I., Dozmorov, I.M., Roa, S., Scharff, M.D., Li, W. & Chiorazzi, N. (2011) Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Molecular Medicine*, **17**, 1374–1382.
- Heintel, D., Kienle, D., Shehata, M., Krober, A., Kroemer, E., Schwarzingler, I., Mitteregger, D., Le, T., Gleiss, A., Mannhalter, C., Chott, A., Schwarzmeier, J., Fonatsch, C., Gaiger, A., Dohner, H., Stilgenbauer, S. & Jager, U. (2005) High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, **19**, 1216–1223.
- Kaderi, M.A., Kanduri, M., Buhl, A.M., Sevov, M., Cahill, N., Gunnarsson, R., Jansson, M., Smedby, K.E., Hjalgrim, H., Jurlander, J., Juliusson, G., Mansouri, L. & Rosenquist, R. (2011) LPL is the strongest prognostic factor in a comparative analysis of RNA-based markers in early chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, **96**, 1153–1160.
- Mansouri, M., Sevov, M., Fahlgren, E., Tobin, G., Jondal, M., Osorio, L., Roos, G., Olivecrona, G. & Rosenquist, R. (2010) Lipoprotein lipase is differentially expressed in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia but displays invariably low catalytical activity. *Leukemia Research*, **34**, 301–306.
- Oppezzo, P. & Dighiero, G. (2013) Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer Journal*, **3**, e149.
- Oppezzo, P., Vasconcelos, Y., Settegrana, C., Jeanne, D., Vuillier, F., Legarff-Tavernier, M., Kimura, E.Y., Bechet, S., Dumas, G. & Brissard, M. (2005) The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **106**, 650–657.
- Palacios, F., Moreno, P., Morande, P., Abreu, C., Correa, A., Porro, V., Landoni, A.I., Gabus, R., Giordano, M., Dighiero, G., Pritsch, O. & Oppezzo, P. (2010) High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood*, **115**, 4488–4496.
- Parikh, S.A., Strati, P., Tsang, M., West, C.P. & Shanafelt, T.D. (2016) Should *IGHV* status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis. *Blood*, **127**, 1752–1760.
- Peterson, J., Fujimoto, W.Y. & Brunzell, J.D. (1992) Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies. *Journal of Lipid Research*, **33**, 1165–1170.
- Porpaczy, E., Tauber, S., Bilban, M., Kostner, G., Gruber, M., Eder, S., Heintel, D., Le, T., Fleiss, K., Skrabs, C., Shehata, M., Jager, U. & Vanura, K. (2013) Lipoprotein lipase in chronic lymphocytic leukaemia - strong biomarker with lack of functional significance. *Leukemia Research*, **37**, 631–636.
- Rombout, A., Verhasselt, B. & Philippe, J. (2016) Lipoprotein lipase in chronic lymphocytic leukemia: function and prognostic implications. *European Journal of Haematology*, **97**, 409–415.
- Rosenquist, R., Cortese, D., Bhoi, S., Mansouri, L. & Gunnarsson, R. (2013) Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leukemia & Lymphoma*, **54**, 2351–2364.
- Rozovski, U., Grgurevic, S., Bueso-Ramos, C., Harris, D.M., Li, P., Liu, Z., Wu, J.Y., Jain, P., Wierda, W., Burger, J., O'Brien, S., Jain, N., Ferrajoli, A., Keating, M.J. & Estrov, Z. (2015) Aberrant LPL Expression, Driven by STAT3, Mediates Free Fatty Acid Metabolism in CLL Cells. *Molecular Cancer Research*, **13**, 944–953.
- Vasconcelos, Y., De Vos, J., Vallat, L., Reme, T., Lalanne, A.I., Wanherdrick, K., Michel, A., Nguyen-Khac, F., Oppezzo, P., Magnac, C., Maloum, K., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Troussard, X., Leporrier, M., Klein, B., Dighiero, G. & Davi, F. (2005) Gene expression profiling of chronic lymphocytic leukemia can discriminate cases with stable disease and mutated Ig genes from those with progressive disease and unmutated Ig genes. *Leukemia*, **19**, 2002–2005.