



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



## **Tesis de Grado**

### **Licenciatura en Ciencias Biológicas**

Diferenciación y caracterización de células  
Nurse-Like a partir de monocitos de sangre  
periférica provenientes de pacientes con  
Leucemia Linfoide Crónica

Bach. Patricia Noelia Opiolo de Arteaga

Tutora: PhD María Elena Márquez

Montevideo, Uruguay

Enero 2025

## **Agradecimientos**

A María Elena, por su apoyo constante y todo el conocimiento compartido. Por su disposición y ánimos aun cuando las cosas no iban tan bien. Gracias por la confianza.

Al laboratorio de iLLC que me abrió las puertas. Juli, Euge, George, Flor, Rita, por siempre estar dispuestos, y hacer las jornadas más entretenidas.

A Papá y Mamá, quienes confiaron en mí desde el principio y alientan mis sueños. Por ser los primeros en estar listos para celebrar cada logro y acompañarme en cada paso. Gracias por sus abrazos que me hacen sentir invencible. Son mi motor.

A Magui, Checho y Toto: mis hermanitos. Gracias por siempre estar incondicionalmente, incluso a la distancia. Por ser mi inspiración, apoyo y fortaleza. Por hacerme creer capaz de lograrlo, ¡ya dándome sus libros desde el jardín! Gracias por todo su amor.

A mi Canelita, que me acompañó en cada día y noche de estudio haciéndolo más llevadero. Por siempre llenarme de energía, pelitos y amor. No pudo haber compañera mejor.

A Guille, por ser tan buen compañero, por su paciencia y palabras justas. Gracias por siempre alentarme y animarme a ir por más, haciéndome sentir capaz de enfrentar todo lo que venga.

A mis amigos y amigas, que siempre están presentes, haciéndome sentir acompañada en este camino. Gracias por ser mi red de apoyo, por sus consejos, las charlas y risas interminables.

A las amigas de oro que me dejó la Fcien, por siempre estar dispuestas a ayudar y hacer cada curso más divertido, entre experimentos, risas y resúmenes.

Cada uno de ustedes ha sido fundamental para mí en este camino, por lo que ¡este logro también es suyo!

## Resumen

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es una neoplasia maligna de células B. Se caracteriza por la acumulación de pequeños linfocitos B monoclonales de apariencia madura en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides secundarios. Actualmente, es la leucemia en adultos más frecuente en países occidentales. Sin embargo, a pesar de los avances en nuevas estrategias terapéuticas, la LLC sigue siendo una enfermedad incurable.

Clínicamente la presentación de la enfermedad y la respuesta al tratamiento son sumamente heterogéneas, en parte determinado por la compleja relación que tienen las células leucémicas con el microambiente circundante. Uno de los componentes claves de este microambiente tumoral son las nurse-like cells (NLC), que generan nichos específicos potenciando la supervivencia de las células cancerosas y la resistencia a los tratamientos. No obstante, la obtención de estas células *in vitro* no ha sido bien estandarizada, y por lo tanto los mecanismos moleculares que inducen su diferenciación aún no se comprenden completamente.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar una metodología para la diferenciación de NLC *in vitro*, permitiendo posteriormente su caracterización fenotípica. A partir del aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) provenientes de muestras de pacientes con LLC se evaluó el desarrollo de NLC. Logrando finalmente generar un protocolo de cultivo de referencia para su obtención. Este hecho permitió confirmar que el número de NLC diferenciadas varía considerablemente entre muestras de distintos pacientes. Mediante técnicas de microscopía confocal y citometría de flujo caracterizamos las células diferenciadas, detectando una heterogeneidad en la expresión de marcadores típicos de NLC (CD68, CD163, CD206) y de marcadores inmunosupresores en pacientes con distinto perfil clínico. A su vez, pude demostrar el efecto positivo de las NLC sobre la viabilidad de las células leucémicas.

Con el fin de solventar la marcada variación en el desarrollo de NLC, evalué la línea celular THP-1 como modelo representativo de NLC. Verificando que las mismas, una vez diferenciadas, son similares morfológica y fenotípicamente a las NLC. Adicionalmente, comprobé que en condiciones de co-cultivo THP-1 también fue capaz de interactuar con las células leucémicas, contribuyendo a disminuir la apoptosis espontánea.

Por tanto, los resultados de esta investigación conforman una sólida base que permitirá en futuros estudios explorar el potencial biológico de las NLC como un nuevo blanco terapéutico en el tratamiento de la LLC.

## Tabla de contenido

I.	Introducción.....	11
1.1	Leucemia Linfoide Crónica.....	11
1.1.1	Generalidades.....	11
1.1.2	Diagnóstico y factores pronóstico.....	12
1.1.3	Terapias actuales y emergentes.....	18
1.2	Microambiente tumoral.....	21
1.3	Nurse-like Cells.....	24
1.3.1	Características de las células nurse-like.....	25
1.3.2	Funciones biológicas de las NLC.....	26
1.3.3	Moléculas que median la interacción entre las NLC y LLC.....	27
II.	Objetivos.....	29
2.1	Objetivo General.....	29
2.2	Objetivos Específicos.....	29
III.	Materiales y Métodos.....	30
3.1	Reactivos.....	30
3.1.1	Soluciones, buffers y medios de cultivo.....	30
3.1.2	Anticuerpos.....	30
3.2	Procedimientos generales.....	32
3.2.1	Muestras de pacientes con LLC.....	32
3.2.2	Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	32
3.2.3	Descongelado de CMSP.....	34
3.2.4	Cultivo celular de CLL y diferenciación de NLC.....	34
3.2.5	Cultivo celular de THP-1.....	35
3.3	Caracterización fenotípica.....	38
3.3.1	Microscopía.....	38
3.3.2	Citometría de flujo convencional y espectral.....	40
IV.	Resultados y Discusión.....	44
4.1	Optimización de las condiciones del cultivo para el desarrollo de las NLC.....	44
4.2	Características morfológicas de las NLC.....	49
4.3	Inmunofenotipaje de las NLC por microscopía confocal.....	52
4.4	Inmunofenotipaje de NLC mediante citometría de flujo.....	59
4.5	Asociación del desarrollo de las NLC con características clínicas de las muestras de los pacientes con LLC.....	69
4.6	Efecto del desarrollo de NLC en la viabilidad del clon tumoral.....	71

4.7	Uso de un modelo de línea celular para imitar los efectos protectores de las NLC sobre las células B leucémicas.....	73
V.	Conclusiones y Perspectivas .....	76
VI.	Referencias Bibliográficas .....	78
VII.	Anexo.....	85

## Lista de figuras

Figura 1. Presencia y características morfológicas de las células B.....	13
Figura 2. Tratamientos actuales sobre la célula de LLC y sus distintas dianas farmacológicas....	19
Figura 3. El microambiente tumoral de la LLC .....	23
Figura 4. Separación de CMSP por gradiente de densidad.....	33
Figura 5. Esquema del co-cultivo de células de LLC con macrófagos derivados de la línea celular THP-1.....	36
Figura 6. Marcaje para el fenotipado de NLC por microscopía confocal	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Figura 7. Impacto de la densidad celular de linfocitos B leucémicos en el desarrollo de NLC. ...	46
Figura 8. Obtención in vitro y aislamiento de NLC.....	48
Figura 9. Fenotipificación de NLC.....	50
Figura 10. Morfología fusiforme de las NLC. ....	51
Figura 11. Formación de clusters entre el clon leucémico y las NLC.....	52
Figura 12. Caracterización de las células adherentes mediante inmunofluorescencia.....	54
Figura 13. Control negativo de los anticuerpos secundarios utilizados para microscopía confocal.	54
Figura 14. Localización intracelular de CD68 y CD206 en las NLC.....	55
Figura 15. Localización intracelular de CD163 y CD206 en las NLC.....	56
Figura 16. Morfología de las NLC observadas mediante microscopía confocal.....	57
Figura 17. Prolongaciones en la morfología de NLC.....	58
Figura 18. Estrategia de gating para los ensayos de expresión de los marcadores de NLC. ....	60
Figura 19. Expresión de los marcadores de NLC en monocitos al inicio del cultivo de CMSP .....	60
Figura 20. Expresión de los marcadores de NLC en las células adherentes obtenidas .....	62
Figura 21. Optimización de la estrategia de gating para la detección y caracterización de NLC .	63
Figura 22. Evaluación optimizada de los marcadores de NLC en la población de células adherentes	64
Figura 23. Expresión de los marcadores inmunosupresoresIDO y PDL-1 en NLC. ....	64
Figura 24. Evaluación de la expresión de CD68 en la población celular CD11b+ al inicio y tras 14 días de cultivo de CMSP provenientes de pacientes en distintos estadios de LLC .....	65
Figura 25. Evaluación de la expresión de CD163 en la población celular CD11b+ al inicio y tras 14 días de cultivo de CMSP provenientes de pacientes en distintos estadios de LLC .....	66
Figura 26. Evaluación de la expresión de CD206 en la población celular CD11b+ al inicio y tras 14 días de cultivo de CMSP provenientes de pacientes en distintos estadios de LLC .....	67
Figura 27. Evaluación de la expresión de marcadores inmunosupresores en la población celular CD11b+ al cultivar CMSP provenientes de pacientes en distintos estadios de LLC .....	68

Figura 28. Capacidad de los monocitos de desarrollarse en NLC tras 14 días de cultivo, en base al estadio clínico del paciente .....	70
Figura 29. Nivel del desarrollo de NLC en muestras formadoras de esta población, en base al estadio clínico del paciente .....	71
Figura 30. Efecto de las NLC en la viabilidad de las células B tumorales.....	72
Figura 31. Efecto del modelo celular THP-1 en la viabilidad de las células de LLC. ....	74

## Lista de tablas

Tabla 1. Sistema de estadificación de Rai en LLC. ....	14
Tabla 2. Sistema de estadificación de Binet en LLC. ....	14
Tabla 3. Índice de pronóstico internacional para la LLC. ....	17
Tabla 4. Anticuerpos utilizados para ensayos de Citometría de Flujo. ....	31
Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Microscopía Confocal. ....	31
Tabla 6. Cronograma para preparar los cultivos celulares de macrófagos M0, M1 y M2 a partir de la línea celular THP-1.....	37
Tabla 7. Diseño de paneles para la caracterización mediante citometría de flujo de las distintas poblaciones celulares: NLC, células B.....	42

## Abreviaturas

Abreviación	Descripción completa
AID	Deaminasa de citosina inducida por activación (del inglés "Activation-induced cytidine deaminase")
APC	Aloficocianina (del inglés " <i>Allophycocyanin</i> ")
BCR	Receptor de células B (del inglés "B cell receptor")
BTK	Tirosina quinasa de Bruton (del inglés "Bruton's tyrosine kinase")
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol (del inglés "4',6-diamidino-2-phenylindole")
DMSO	Dimetilsulfóxido
FISH	Hibridación fluorescente in situ (del inglés fluorescence in situ hybridization)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés "Fluorescein isothiocyanate")
Hgb	Hemoglobina
IF	Inmunofluorescencia
Ig	Inmunoglobulina

IGHV	Gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina
IL	Interleuquina
LLC	Leucemia linfoide crónica
MEM	Medio esencial mínimo
NLC	Nurse-like cell
PBS	Buffer fosfato salino (del inglés "Phosphate-buffered saline")
PE	Ficoeritrina (del inglés "Phycoerythrin")
PLT	Plaquetas
PMA	Forbol-12-mirístato-13-acetato (del inglés "Phorbol-12-myristate-13-acetate")
Rcf	Fuerza centrífuga relativa (del inglés "Relative centrifuge force")
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
SP	Sangre periférica
TAM	Macrófagos asociados a tumores (del inglés "tumour associated macrophages")

## I. Introducción

### 1.1 Leucemia Linfoide Crónica

#### 1.1.1 Generalidades

La Leucemia Linfoide Crónica (LLC) es una neoplasia maligna de células B. Es caracterizada por la acumulación lenta y progresiva de pequeños linfocitos B monoclonales de apariencia madura en la sangre periférica (SP), la médula ósea y los órganos linfoides secundarios. Las células de LLC expresan la mayoría de los antígenos de superficie presentes en las células B maduras, y como característica distintiva coexpresan el antígeno de células T CD5. La expresión de inmunoglobulinas (Ig) de superficie es relativamente baja, siendo mayormente IgM e IgD, en comparación con las células B de SP normales (Caligaris-Cappio & Hamblin, 1999; Rozman & Montserrat, 1995).

En cuanto a la epidemiología, la incidencia de la LLC difiere según la región geográfica en la que se habite, actualmente es la leucemia en adultos más frecuente en países occidentales, mientras que en Asia es menos común (Nabhan et al., 2014). Adicionalmente, además de la composición étnica, el riesgo de desarrollar la enfermedad varía con la edad y sexo, siendo hasta dos veces mayor para los hombres que para las mujeres. La incidencia aumenta en personas mayores de 50 años, siendo la media de edad de 70 años al momento del diagnóstico (Dighiero & Hamblin, 2008). Para el año 2024, los cálculos de la Sociedad Americana Contra el Cáncer en los Estados Unidos estiman alrededor de 20.800 nuevos casos de LLC y 4.440 decesos por esta enfermedad (American Cancer Society, 2024). En Uruguay, según el último reporte de la Sociedad de hematología del Uruguay (SHU), la incidencia es de 4,17/100.000 habitantes, lo que implica 143 nuevos casos por año en nuestro país (Sociedad de Hematología del Uruguay, 2021).

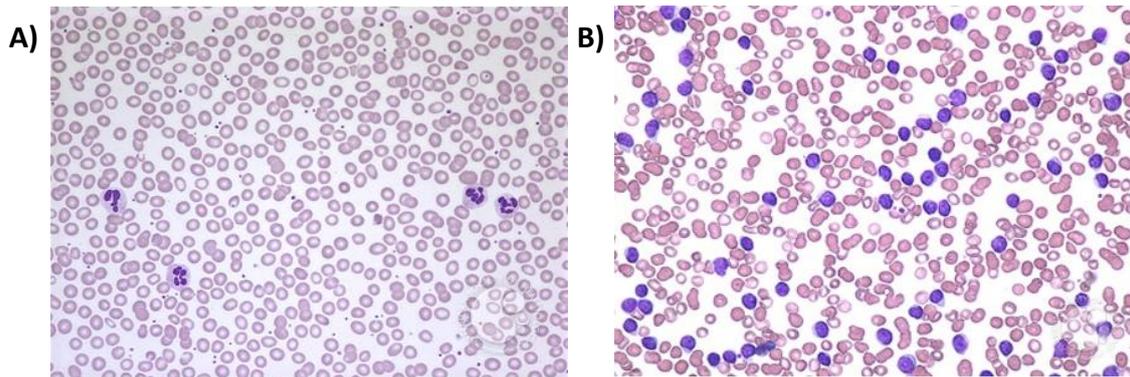
Cabe destacar que desde una perspectiva clínica las características presentes en los pacientes con LLC son sumamente heterogéneas. Un tercio de los pacientes debuta con una enfermedad indolente, que se mantiene estable y no requiere de tratamiento, lo que les confiere una larga supervivencia. Sin embargo, existe un grupo de pacientes que eventualmente sí desarrolla progresión de la enfermedad, a pesar de presentar una

fase inicial estable Por otra parte, el tercio restante de los pacientes desde el inicio manifiesta una enfermedad agresiva requiriendo tratamiento temprano y llegando a presentar recaídas (Dighiero, 2003). La razón de dicha heterogeneidad clínica está determinada principalmente por factores genéticos y la compleja relación que tienen las células leucémicas con el microambiente circundante, la cual aún no se ha dilucidado completamente. Es relevante resaltar que a pesar de los avances de las últimas dos décadas en nuevas estrategias terapéuticas la LLC sigue siendo una enfermedad incurable (J. A. Burger, 2011).

### **1.1.2 Diagnóstico y factores pronóstico**

La LLC puede ser detectada tras la manifestación de linfocitosis en un hemograma de rutina. Se requiere una alta presencia de linfocitos B monoclonales en SP,  $\geq 5000/\text{ml}$ , mantenido durante al menos 3 meses (Hallek et al., 2018). Morfológicamente se distinguen linfocitos pequeños, de aspecto maduro, con un núcleo que prácticamente ocupa la totalidad de la célula con su densa cromatina, rodeada de un borde de citoplasma (Figura 1).

Se debe verificar la presencia de un inmunofenotipo compatible mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica, con el fin de corroborar que no se trate de otra enfermedad linfoproliferativa enmascarada. El fenotipo distintivo de la LLC implica la expresión de CD5, CD19, CD23, y bajos niveles de CD20 y CD79b diferenciándose de otros trastornos CD5<sup>+</sup> (Eichhorst et al., 2015; Ghia et al., 2007). Cada clon se restringe a la expresión de cadenas ligeras de Ig kappa o lambda. Tras un gran esfuerzo de armonización en estudios consenso se ha concluido que trabajar sobre un panel que analice los marcadores CD19, CD5, CD20, CD23,  $\lambda$  y  $\kappa$  generalmente es suficiente para establecer el diagnóstico. Sin embargo, en algunos casos es de utilidad evaluar los marcadores CD43, CD79b CD81, CD200, CD10 y ROR1 para terminar de definir el diagnóstico (Hallek et al., 2018; Rawstron et al., 2018).



**Figura 1. Presencia y características morfológicas de las células B.** Frotis de SP teñidos con May Grunwald-Giemsa a partir de **A)** un donante sano, conteniendo una población relativamente uniforme de eritrocitos, plaquetas y algunos granulocitos circulantes **B)** un paciente con LLC, donde resalta la presencia de linfocitos B maduros con su cromatina condensada y un alto ratio núcleo-citoplasma. Magnificación X600. Imágenes adquiridas a partir de American Society of Hematology | ImageBank.

Es un gran desafío para los médicos predecir la evolución de la enfermedad dada la notoria heterogeneidad clínica de los pacientes. Es por ello que surgieron sistemas de estadificación para definir la extensión de la enfermedad y el pronóstico, además de ser una base para la toma de decisiones respecto al tratamiento. Los sistemas propuestos por Rai y Binet (Tabla 1 y Tabla 2) fueron los primeros publicados en 1975 y 1981, respectivamente, y siguen siendo ampliamente utilizados. El objetivo es establecer grupos pronósticos que se pueden utilizar para predecir la supervivencia media, sin embargo, no predicen la progresión de la enfermedad ni la respuesta al tratamiento. La evidencia de progresión de la enfermedad puede incluir un tiempo de duplicación de linfocitos de <1 año, linfadenopatía y/o esplenomegalia palpables progresivas en exámenes seriados (Kipps et al., 2017). La determinación del estadio clínico para Rai se basa en la presencia de linfadenopatía, organomegalia y citopenias, categorizando a los pacientes en cinco estadios y tres grupos de riesgo: bajo, intermedio y alto (Rai et al., 1975). Mientras que Binet propone tres grupos pronóstico: A, B y C; de acuerdo con la presencia de citopenias y el número de áreas de afectación de ganglios linfáticos, como lo son las axilas, ingle, cabeza, cuello, bazo e hígado (Binet et al., 1981). Los pacientes con estadio Rai 0-Binet A presentan una sobrevida mayor a 10 años desde el diagnóstico. Los estadios I/II-B indican una sobrevida media de entre 7 y 5 años. Por último, los estadios III/IV-C implican una menor sobrevida, entre 1 y 3 años (Cheson et al., 1988; Eichhorst et al., 2008).

**Tabla 1.** Sistema de estadificación de Rai en LLC.

<b>Riesgo</b>	<b>Estadio</b>	<b>Características</b>
Bajo	0	Linfocitosis
Intermedio	I	Linfocitosis y Linfadenopatía
Intermedio	II	Linfocitosis y Hepatomegalia o Esplenomegalia
Alto	III	Linfocitosis y Anemia (Hgb<10g/dL)
Alto	IV	Linfocitosis y Trombocitopenia (PLT<100000/uL)

Hgb=Hemoglobina, PLT=Plaquetas

**Tabla 2.** Sistema de estadificación de Binet en LLC.

<b>Estadio</b>	<b>Características</b>
A	Menos de tres áreas de tejido linfoide agrandado. Sin citopenias.
B	Tres o más áreas de tejido linfoide agrandado. Sin citopenias.
C	Varias áreas de tejido linfoide agrandado. Anemia (Hgb<10g/dL) y/o Trombocitopenia (PLT<100000/mm <sup>3</sup> ).

Las áreas de tejido linfoide incluyen axilas, cervical, ingle, bazo e hígado.

Hgb=Hemoglobina, PLT=Plaquetas

En los últimos años se han identificado diversos factores pronósticos para la LLC, los cuales han ayudado a predecir la evolución de la enfermedad. La evaluación de estos

marcadores se inicia en el momento del diagnóstico del paciente, e incluye características genéticas, moleculares y bioquímicas de las células leucémicas. Su identificación representa una herramienta valiosa para el médico en la toma de decisiones *sobre el tipo de tratamiento y el momento adecuado para indicarlo. Por ejemplo, permite identificar a aquellos pacientes que requieren terapia inmediata, lo que aumenta su posibilidad de supervivencia.*

Entre los factores pronósticos se incluyen el estado mutacional de la cadena pesada variable de inmunoglobulina (IGHV), *determinadas alteraciones cromosómicas, y los niveles séricos de proteínas, destacándose la timidina quinasa,  $\beta$ -2-microglobulina, CD49d, CD38 y ZAP-70. También es relevante la presencia de mutaciones, como la del gen TP53 (Korubo et al., 2021).*

Mediante técnicas citogenéticas moleculares como la hibridación in situ fluorescente (FISH), se pueden detectar anomalías cromosómicas. Más del 80% de los pacientes con LLC presentan al menos una aberración. En la LLC las aberraciones más destacadas son la deleción en el cromosoma 13 (del(13q)), del(11q), del(17p) y la trisomía del cromosoma 12 (tris(12)) (Dohner et al., 2000). La anomalía cromosómica más común es del(13q), evidenciada en más del 50% de los pacientes, y se asocia con un pronóstico favorable. Sin embargo, dentro de esta región se encuentran miRNAs, que en condiciones de salud regulan la expresión de proteínas capaces de inhibir la apoptosis (Klein et al., 2010). La deleción del(17p) se encuentra en aprox. 7% de los pacientes. Esta anomalía afecta el gen supresor de tumores TP53, que a menudo se encuentra mutado, y se asocia con una mala evolución de la LLC y la refractariedad a la quimioinmunoterapia. La trisomía del cromosoma 12 está presente en aprox. 16% de los pacientes, y se asocia con un pronóstico intermedio. Por último, la deleción del(11q) se encuentra en aprox. 18% de los pacientes, y se asocia con alteraciones del gen ATM, el cual codifica para una proteína involucrada en la reparación del ADN (Zenz et al., 2010)

Como fue mencionado anteriormente en las células de LLC puede haber deleciones en el cromosoma 13, resultando en la pérdida de mir-15-a y mir-16-1, o en mutaciones que llevan a una inactivación de su función. Como consecuencia se da una sobre expresión de BCL-2, una proteína anti apoptótica altamente expresada en pacientes con LLC, resultado de la regulación a la baja de miR-15-a y mir-16-1, que en condiciones normales reprimen su expresión (Pekarsky & Croce, 2015). Por tanto, una reducción en

la expresión de estos miRNA permite que se aumente la expresión de las proteínas que le conferirán a la célula tumoral una mayor resistencia frente a la muerte celular, evadiendo la apoptosis.

El estado mutacional del gen de la región variable de la cadena pesada de Ig (IGHV) es un potente marcador pronóstico para la LLC. La presencia o ausencia de mutaciones en el gen IGHV de las células LLC refleja la etapa de diferenciación de la célula B de la que se originan. Las células LLC que poseen IGHV no mutado (LLC-NM) se originan a partir de una célula B que no experimentó diferenciación en los centros germinales, es decir, que no participó del proceso de hipermutación somática ni de selección durante la respuesta inmune al antígeno en los ganglios linfáticos. De forma contraria, las células LLC que poseen IGHV mutado (LLC-M) surgen de una célula B del centro postgerminal, cuyas Igs sufrieron hipermutación somática e incluso, en algunos casos, cambio de clase, así como ocurre en las células B normales. Es posible considerar que aquellas células de LLC que tengan secuencias del gen IGHV no homólogas en al menos 2% en relación con la línea germinal más cercana han sufrido hipermutación somática (Hamblin et al., 1999). Por consecuencia, las células de LLC que tengan secuencias del gen IGHV con más del 98% de homología en relación con la línea germinal expresan IGHV no mutado. Cabe aclarar que dichas mutaciones no son patológicas sino una parte natural de la maduración por afinidad de los anticuerpos, llevada a cabo por la enzima deaminasa de citosina inducida por activación (AID). Resulta clave identificar la ausencia de mutaciones en IGHV debido a su elevado valor pronóstico. Independientemente del estadio clínico de la enfermedad, generalmente los pacientes LLC-NM tienen una enfermedad más agresiva que los pacientes LLC-M, y su tasa de supervivencia es significativamente peor (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999)

La proteína ZAP-70, aunque no se encuentra en los linfocitos B normales, se expresa en células LLC con el gen IGVH no mutado (Braga et al., 2022). Se ha demostrado que estas células tienen una capacidad migratoria mayor, asociada con las vías CXCR4/CXCL12 (Dubois et al., 2020). Su presencia se correlaciona con la forma más agresiva de la enfermedad. Lo mismo ocurre con las células CD38<sup>+</sup> en pacientes con IGVH no mutado, llegando a ser un marcador pronóstico negativo (Deaglio et al., 2007).

Por último, los marcadores séricos como lactato deshidrogenasa y  $\beta$ 2-microglobulina indican alta carga tumoral cuando los niveles se encuentran elevados, asociándose a un mal pronóstico (Hallek et al., 1996).

A raíz de la identificación de estos factores pronóstico, la introducción de terapias novedosas y contemplando los sistemas de estadificación clásicos surge un nuevo

índice de pronóstico. En 2016 fue publicado el Índice de pronóstico internacional (IPI) de la LLC (Tabla 3), que permite predecir la supervivencia global y un tratamiento más específico de los pacientes con LLC (The International CLL-IPI working group, 2016). Este índice combina parámetros genéticos, bioquímicos y clínicos para categorizar a los pacientes en cuatro grupos de riesgo pronóstico (Gentile et al., 2016). Se mantiene el sistema de puntuación tal como fue presentado en los sistemas de estadificación anteriores, donde los números o letras más bajos indican un nivel de riesgo menor. Se proponen cinco factores pronósticos independientes que se ponderan individualmente determinando una puntuación a la cual se le asignará uno de los cuatro grupos de riesgo, donde los dos primeros en ausencia de sintomatología se encuentran libre de terapia.

**Tabla 3.** Índice de pronóstico internacional para la LLC.

<b>Variable</b>	<b>Factor de riesgo</b>	<b>Puntuación IPI</b>
Aberración genética	Del(17p) / TP53 mutado	4
Estado mutacional IGHV	No mutado	2
Concentración sérica de $\beta 2m$	>3.5 mg/L	2
Estadio	Binet B-C / Rai I-IV	1
Edad	>65 años	1

<b>Puntuación IPI acumulada</b>	<b>Grupo de riesgo</b>	<b>Recomendaciones</b>
0-1	Bajo	No tratar. Watch and wait.
2-3	Intermedio	No tratar, excepto que sea enfermedad sintomática
4-6	Alto	Tratar, excepto que sea enfermedad asintomática.
7-10	Muy alto	Si es posible tratar, utilizar drogas no citotóxicas.

IGHV=Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina

### 1.1.3 Terapias actuales y emergentes

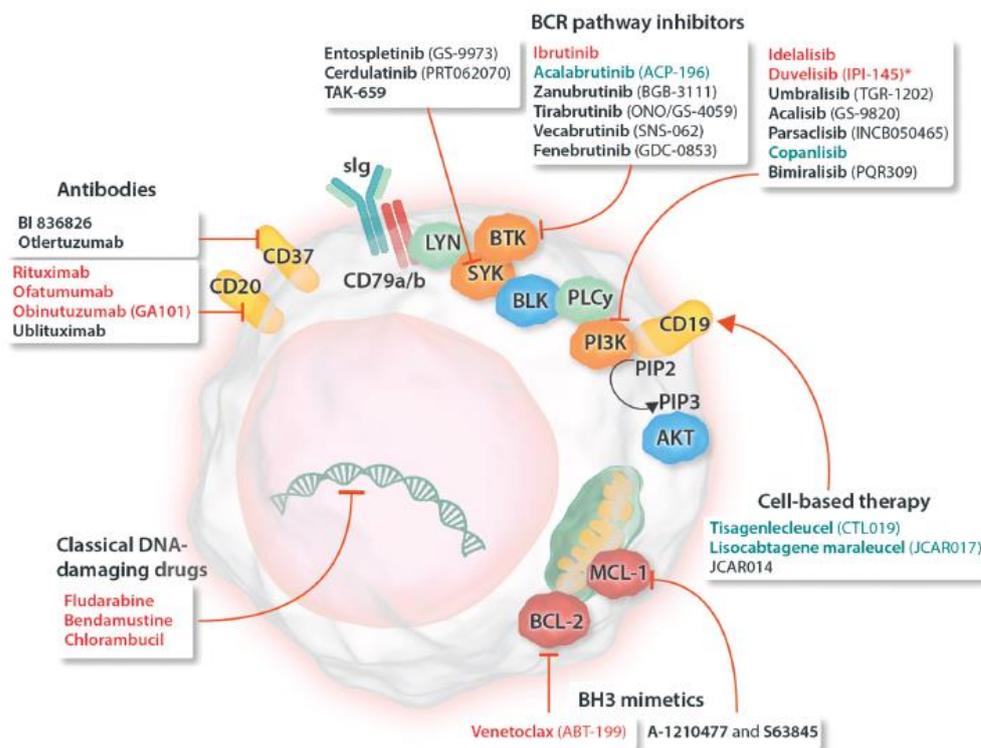
Una vez realizado el diagnóstico de LLC el médico tratante se debe enfrentar a la decisión de cómo tratar al paciente y cuándo iniciar la terapia, lo que depende de la presencia de una enfermedad sintomática y del riesgo de progresión. Como se establece en el IPI para la LLC en aquellos pacientes con ausencia de síntomas típicamente se sigue un modelo de watch and wait. es decir, un seguimiento cercano sin terapia. La mayoría de los pacientes con estadio Binet B o C, con estadio Rai III o IV, o estadio Rai I o II con enfermedad progresiva cuya expectativa de vida no exceda los 7 años, deberían ser considerados para el tratamiento temprano (Dighiero, 2003). Las estrategias de tratamiento óptimas incluyen quimioterapia, quimioinmunoterapia, medicamentos dirigidos a la señalización del receptor de células B (BCR) o inhibidores de la apoptosis (Figura 2).

El primer tratamiento establecido para la LLC fue la quimioterapia. Se utilizan análogos de purina (fludarabina, pentostatina o cladribina) y agentes alquilantes (clorambucilo, ciclofosfamida o bendamustina) como agentes únicos. Su mecanismo de acción involucra varias vías. Principalmente afectan la síntesis de ADN y la división celular, induciéndose la expresión de P53 que causa apoptosis para que el daño al ADN no sea transmitido (Robak, 2005; Sharma & Rai, 2019). Dentro de los aspectos negativos, este tratamiento resulta citotóxico tanto para las células malignas proliferantes como para las células normales. Cabe destacar que, la delección del cromosoma 17p o mutaciones en el gen TP53 hacen que los fármacos quimioterapéuticos sean ineficaces (Kipps et al., 2017), siendo necesario otras alternativas terapéuticas.

Posteriormente, la introducción de la quimioinmunoterapia revolucionó el tratamiento de la LLC. El éxito comenzó con la llegada del anticuerpo quimérico anti-CD20 (Rituximab), que permitió el establecimiento de una terapia combinada, la cual se denominó por sus siglas régimen FCR (fludarabina, ciclofosfamida y rituximab), y se posicionó como el estándar de oro en la terapia (Yosifov et al., 2019). La FDA validó el beneficio de este y otros anticuerpos monoclonales anti-CD20, Obinutuzumab y Ofatumumab, en combinación con quimioterapia para el tratamiento de primera línea de pacientes con LLC (Piggin et al., 2017). Estos anticuerpos cumplen su función al unirse a la molécula de CD20 sobre la superficie del linfocito B. Allí causan su eliminación al desencadenar mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad

dependiente de complemento (CDC) y por inducción directa de la apoptosis (Boross & Leusen, 2012). La combinación FCR todavía tiene su papel en el tratamiento de pacientes LLC-M, produciendo una supervivencia libre de progresión notablemente larga en casi la mitad de los pacientes (Fürstenau et al., 2019). Sin embargo, si bien se estableció como terapia estándar su uso en primera línea se ve limitado por la edad del paciente y la presencia de comorbilidades, por lo que no siempre es una opción de tratamiento viable. Además, puede llevar a una recaída temprana de la enfermedad, a una respuesta deficiente y al desarrollo de un linfoma agresivo, definido como síndrome de Richter, particularmente refractario a la quimioterapia.

Las células de LLC son capaces de desarrollar resistencia a las terapias, sobre todo si hay progresión de la enfermedad luego del tratamiento de primera línea (Moreno, 2020). Es por ello que resulta necesario el desarrollo de nuevos tratamientos con mecanismos de acción alternativos y un bajo nivel de efectos secundarios.



**Figura 2. Tratamientos actuales sobre la célula de LLC y sus distintas dianas farmacológicas.** Representación esquemática de los tratamientos en la LLC. En rojo figuran los fármacos con aprobación para su uso en LLC. En azul los fármacos aprobados para su uso en otras indicaciones. En negro se muestran los fármacos en diversas etapas de desarrollo clínico. Adaptado de Yosifov et al., 2019.

En la última década las opciones terapéuticas para la LLC se han ampliado considerablemente, gracias a la introducción de nuevos agentes orales que son bien tolerados y altamente eficaces. La terapia dirigida está conformada por Ibrutinib, Idealisib y Venetoclax, que se destacan por ser fármacos con blancos más específicos. Actúan como inhibidores en la activación de las vías de señalización del receptor de células B (BCR). El inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), Ibrutinib, fue aprobado en primera línea y en la actualidad es ampliamente utilizado (Fürstenau et al., 2019). Posee efectos directos en la proliferación del clon tumoral, y además es capaz de modular el microambiente tumoral para revertir mecanismos de evasión inmune (Charalambous et al., 2018). Idealisib es un inhibidor de la proteína PI3K $\delta$ , expresada selectivamente en células hematopoyéticas. Al inhibirla se ven afectadas varias vías de señalización celular involucradas en el mantenimiento de la viabilidad y proliferación de la célula de LLC (Markham, 2014). Por último, se destaca Venetoclax, un inhibidor de BCL-2. Como fue mencionado anteriormente, un factor común en pacientes con LLC es la sobreexpresión de esta proteína anti-apoptótica, lo que la hace un buen blanco terapéutico. Al interaccionar el inhibidor, Venetoclax, con la proteína, BCL-2, se induce la muerte de la célula tumoral (Aitken et al., 2019). El surgimiento de estas terapias ha abierto el abanico de opciones para el tratamiento de los pacientes que han recaído o han sido refractarios a los tratamientos más clásicos. Además, su mecanismo de acción es exitoso en pacientes con del(17p) o mutación en TP53, a diferencia de la quimioterapia, ya que involucra mecanismos río abajo de p53 (Aitken et al., 2019; Campo et al., 2018). Sin embargo, algunos pacientes pueden desarrollar resistencias, lo que limita su eficacia clínica. Puede tratarse de una resistencia primaria, donde no hay una respuesta adecuada al tratamiento desde el inicio debido a características moleculares específicas en las células neoplásicas, como la presencia de mutaciones en el gen BTK que impide la acción de Ibrutinib (Nakhoda et al., 2023). También, puede generarse a medida que avanza el tratamiento por la adquisición de mutaciones puntuales en el gen diana, tal como indican los datos recientes tras la frecuente resistencia a Venetoclax (Lucas et al., 2020; Tausch et al., 2019). Lo que trae como consecuencia un aumento en la tasa de recaídas, una progresión más rápida y una menor supervivencia global.

En resumen, a pesar de los avances en el entendimiento de la biología de la enfermedad y el desarrollo de fármacos cada vez más específicos, algunos pacientes con LLC

siguen desarrollando resistencias y recaídas, por lo que su tratamiento aún implica un desafío clínico. Existe la necesidad de continuar la investigación y el desarrollo de tratamientos adicionales, con mecanismos de acción alternativos a los presentes, minimizando efectos adversos y aumentando su efectividad. En los últimos años, el estudio del microambiente tumoral ha emergido como un potencial blanco terapéutico debido a su influencia en la progresión de la LLC. La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas enfocadas en este microambiente podría abordar las necesidades no satisfechas de los pacientes que enfrentan esta compleja patología, y ofrecer nuevas opciones para aquellos con recaídas o resistentes al tratamiento.

## **1.2 Microambiente tumoral**

El concepto de microambiente y su vínculo con el cáncer fue descrito inicialmente en 1889 por Stephen Paget, quien propuso la hipótesis de la semilla y el suelo (Paget, 1889). Paget sugirió que las células tumorales (“semillas”) podían vivir y crecer sólo si se encontraban en un microambiente favorable (“suelo fértil”) de órganos seleccionados. Por tanto, se establece que la relación entre las células cancerosas y el microambiente tumoral (TME), que incluye componentes como células inmunitarias, fibroblastos y matriz extracelular, es fundamental para el desarrollo y la progresión del cáncer.

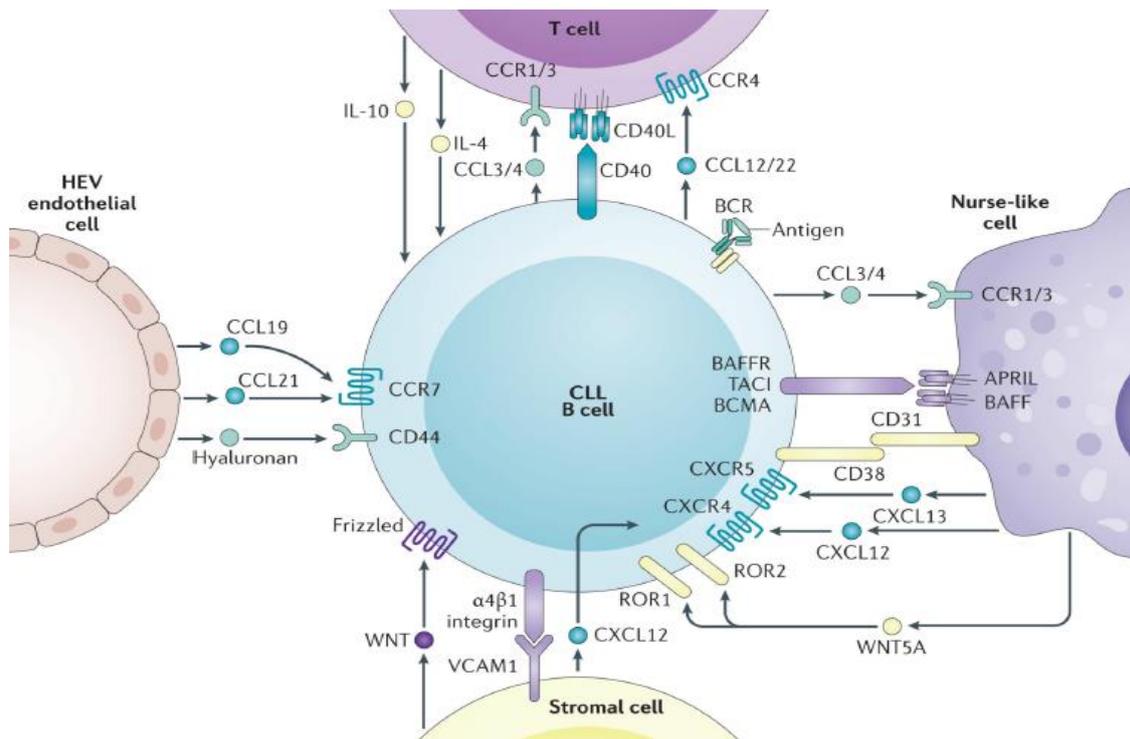
Tradicionalmente se propuso que la LLC surge de la acumulación de células B resistentes a la apoptosis que no proliferan activamente en SP. Sin embargo, experimentos fundamentales utilizando agua deuterada como marcador demostraron que las células de LLC tienen una tasa de proliferación que va de 0,1% a 1,75% por día (Messmer et al., 2005). Si bien las células de LLC que circulan en SP están detenidas en la fase G0/G1 del ciclo celular, aquellas que residen en centros de proliferación expresan marcadores de proliferación celular y replicación del ADN (Cerreto et al., 2023; Fiorcari et al., 2021). Lo que resalta la importancia de la presencia de determinado microambiente para que ocurra una proliferación celular activa. Estos centros de proliferación se destacan por ser nichos protectores dentro de la médula ósea, los ganglios linfáticos y los órganos linfoides secundarios.

Adicionalmente, cabe destacar que las células de LLC derivadas de SP a pesar de presentar una aparente larga vida in vivo, una vez que son cultivadas in vitro sufren rápidamente de apoptosis espontánea (J. A. Burger et al., 2000; Fiorcari et al., 2021). Lo que apunta a que las condiciones ex vivo carecen de factores esenciales de supervivencia, y evidencia que la resistencia a la apoptosis no es intrínseca a la célula

LLC. La supervivencia del clon leucémico depende claramente de señales extrínsecas provenientes de los elementos que rodean a las células tumorales in vivo. En conjunto estos hechos demuestran la fuerte dependencia de las células leucémicas con el TME.

Adentrándonos en el microambiente tumoral de la LLC encontramos un entorno complejo y dinámico (Figura 3). El TME *se compone de múltiples tipos de células*, así como quimiocinas y moléculas solubles inflamatorias, *que en conjunto tienen un importante rol de apoyo* a la supervivencia de las células B leucémicas. Entre ellas se destacan las células del estroma endoteliales y mesenquimales, linfocitos T, células nurse-like (NLC), fibroblastos, células asesinas naturales (NK) y células mieloides (Svanberg et al., 2021). Entre todos los componentes ocurre una compleja de red comunicación cruzada. Esta red es bidireccional y está garantizada por el contacto entre células, las moléculas de adhesión, los ligandos de la superficie celular, las quimiocinas, las citocinas y sus receptores correspondientes.

La adhesión celular entre las células leucémicas, fibroblastos y células endoteliales mediante integrinas y otras moléculas de adhesión, es un proceso crucial. Esta interacción no solo proporciona un soporte físico, sino que también crea un nicho que protege a las células leucémicas de la muerte celular inducida (ten Hacken & Burger, 2016). En estos centros de proliferación las células T apoyan al tumor mediante la co-estimulación CD40/CD40L y la señalización de citocinas, induciendo la supervivencia del clon tumoral (Svanberg et al., 2021). Mientras que las células estromales protegen a las células de LLC de la apoptosis espontánea e inducida por fármacos a través del contacto directo (Kurtova et al., 2009).



**Figura 3. El microambiente tumoral de la LLC.** Diferentes tipos de células y moléculas comprenden el microambiente tumoral de la LLC. El mismo se compone principalmente de células endoteliales, células estromales, células T y nurse-like cells, además de proteínas de la matriz extracelular, citoquinas y moléculas inflamatorias. Todos estos elementos interaccionan con el clon leucémico favoreciendo su supervivencia, proliferación, migración, y la supresión inmunitaria. Adaptado de Kipps et al., 2017

Por otra parte, al ser una comunicación bidireccional, las células de LLC liberan citoquinas, quimiocinas y vesículas extracelulares, con el fin de reclutar células inmunitarias. Las quimiocinas regulan la migración de las células; por ejemplo, la proteína quimiotáctica CCL2 atrae macrófagos al TME que contribuyen a la inflamación y la progresión del cáncer (Gandhi & Balakrishnan, 2012). En apoyo actúan citoquinas, como la interleucina (IL) 10, e IL-4 que favorece un entorno inmunosupresor al estimular la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2, que apoya el crecimiento tumoral (Herishanu et al., 2013; Mesaros et al., 2020). De esta forma las células leucémicas pueden alterar la función de las células inmunitarias del TME, promoviendo un estado de inmunosupresión. Además, la señalización del BCR es esencial para la interacción de las células de LLC con el TME. El BCR reconoce autoantígenos derivados de células apoptóticas, lo que promueve su proliferación clonal, favoreciendo la supervivencia y resistencia de las células leucémicas (Taghilo & Asgarian-Omran, 2024). Finalmente, la comunicación intercelular se ve facilitada por el intercambio de exosomas y vesículas

extracelulares. En la LLC se demostró que los exosomas son capaces de rescatar a las células tumorales de la apoptosis espontánea e inducida por fármacos, y de mejorar su capacidad de migración (Fiorcari et al., 2021).

En conclusión, las células tumorales son capaces de programar diferencialmente a las células, modificando el microambiente circundante para su propio beneficio. De esta forma se generan nichos específicos que permiten la supervivencia y proliferación del clon tumoral, además de causar la inmunosupresión de las respuestas antitumorales, logrando la evasión inmune que lleva a la progresión de la enfermedad y la resistencia a las terapias (vom Stein et al., 2024). Por lo tanto, El TME de la LLC no es simplemente un sistema de apoyo para las células malignas, sino que contribuye significativamente a la progresión y agresividad de la enfermedad. Es por ello que resulta pertinente comprender las interacciones y mecanismos implicados entre la célula tumoral y su microambiente, ya que del estudio de los elementos participantes pueden resultar potenciales blancos para el desarrollo de terapias innovadoras.

### **1.3 Nurse-like Cells**

Las células mieloides son capaces de reconocer antígenos asociados a tumores e iniciar procesos inflamatorios, incluido el reclutamiento y la activación de otras células inmunitarias para contribuir a las respuestas antitumorales (Hanna et al., 2019). Sin embargo, pueden ser entendidas como un arma de doble filo. A pesar de su potencial antitumoral, la literatura sugiere que en la mayoría de los cánceres las células mieloides tienen funciones promotoras de tumores, lo que implica que su número es de relevancia pronóstica. Entre sus funciones contribuyen a la resistencia a la apoptosis y una mayor supervivencia de las células malignas, la evasión de la inmunidad antitumoral y la inmunodeficiencia de los pacientes (Gabrilovich et al., 2012; Lewis & Pollard, 2006). Dentro de dicha población se destacan los macrófagos asociados a tumores (TAMs) por su naturaleza altamente plástica, la exposición a diferentes estímulos induce perfiles de polarización distintos, asociados con cambios en los perfiles de expresión génica (Gabrilovich et al., 2012; Hanna et al., 2019). Mientras que los macrófagos inflamatorios M1 tienen actividad tumoricida, los macrófagos M2 poseen un fenotipo de apoyo tumoral. La activación de M2 es inducida por células apoptóticas, macrófagos, IL-4, IL-13, IL-10, factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) y varias otras señales originadas a partir de las células en circulación en el TME (Mantovani et al., 2002). Estos

macrófagos tienen una alta capacidad de fagocitosis, mitigan la respuesta inflamatoria, producen componentes de la matriz extracelular, factores angiogénicos y quimiotácticos (Lewis & Pollard, 2006).

La primera contribución acerca del rol de las células mieloides en la patología de la LLC fue realizada por el grupo de Burger et al. demostrando que los monocitos sanguíneos CD14<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> de pacientes con LLC se diferencian *in vitro*, bajo la influencia de las células de LLC, en células nurse-like (NLC) (J. A. Burger et al., 2000). Es de destacar que, las NLC son un modelo *in vitro*, y el equivalente *in vivo* de estas células y su desarrollo aún no están claros. Tomando como base la expresión de marcadores de superficie y la similitud en los perfiles de expresión génica, se sugirió que las células NLC se asemejan a TAMs de tipo M2 (Hanna et al., 2019; Herishanu et al., 2013). Estos se han encontrado *in situ* en órganos linfoides de pacientes con LCC, donde han demostrado ser esenciales para la supervivencia de las células de la LLC en el microambiente tumoral (ten Hacken & Burger, 2016).

### **1.3.1 Características de las células nurse-like**

Las NLC son un componente clave en el microambiente tumoral de la LLC. Su nombre se debe a la similitud con las células nodrizas presentes en el timo. Las NLC se caracterizan por ser células grandes, adherentes, redondas o con forma similar a fibroblastos (J. A. Burger et al., 2000). Poseen similitud en los perfiles de expresión génica con el subtipo M2 de TAM. Expresan los marcadores de superficie CD14, CD11b, CD68, CD163 y CD206 (Mantovani et al., 2017; Ysebaert & Fournié, 2011). Se diferencian a partir de monocitos y dependen del estrecho contacto célula-célula con las células leucémicas (Herishanu et al., 2013). Es así que su formación se correlaciona positivamente con la presencia de monocitos en SP. Su acumulación se da en tejidos linfoides como los ganglios linfáticos, médula ósea y el bazo.

Las NLC pueden ser generadas *in vitro* espontáneamente cultivando durante un largo período de tiempo las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de pacientes con LLC a una alta densidad celular (Zaaboub et al., 2022). Sin embargo, su obtención no ha sido bien estandarizada. Se ha descrito que no se pueden diferenciar NLC a partir de muestras de sangre de todos los pacientes con LLC, e incluso entre muestras de diferentes pacientes que generan NLC la cinética de producción y rendimiento final varían considerablemente (Mohammad et al., 2021). Cabe resaltar que

los monocitos obtenidos de donantes sanos en co-cultivo con células de LLC también se diferencian en NLC, mientras que las células B normales no inducen la diferenciación de monocitos en NLC (Tsukada et al., 2002). Este hecho resalta la importancia del rol de las NLC en el TME de la LLC.

### **1.3.2 Funciones biológicas de las NLC**

Las NLC desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento del clon leucémico. Contribuyen al soporte de la supervivencia y apoyo a la proliferación de las células de B-LLC. Principalmente entre sus funciones se destaca la protección de las células de B-LLC frente a la apoptosis, tanto espontánea como inducida por fármacos. Como fue mencionado anteriormente, las células de LLC una vez cultivadas *in vitro* sufren rápidamente de apoptosis. Sin embargo, ensayos de co-cultivo con NLC evidenciaron que la viabilidad de las células de B-LLC se prolongaba, en comparación con aquellas células B-LLC cultivadas en ausencia de NLC (J. A. Burger et al., 2000). Adicionalmente, al concluir el co-cultivo y separar las células, se observaba consecuentemente una disminución de la viabilidad en las células de LLC. Esto demuestra que las NLC pueden tener un efecto citoprotector sobre las células de LLC al encontrarse en el mismo microambiente. Además de la protección contra la apoptosis espontánea, estas células también demostraron protección frente a la apoptosis inducida por distintos fármacos (M. Burger et al., 2005; Fiorcari et al., 2016). Por tanto, las NLC proporcionan un entorno protector importante para las células de la LLC, contribuyendo a su persistencia y expansión al proporcionar señales de supervivencia a las células leucémicas.

Mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas las NLC pueden atraer al nicho diversos tipos de células, incluidas las células tumorales. A su vez, les proporciona un sustrato físico que facilita la adhesión y el acoplamiento de las células de LLC, fortaleciendo así su integración en el tejido linfóide.

Por otra parte, las NLC desempeñan un papel inmunosupresor significativo que contribuye a la evasión del sistema inmunológico por parte de las células tumorales. Estas células crean un microambiente que inhibe la activación y función de células inmunitarias a través de la secreción de factores inmunosupresores y la presentación de antígenos que desvían la respuesta inmune. Además, las NLC pueden inducir la diferenciación de linfocitos T hacia un fenotipo regulador, promoviendo un estado de tolerancia que disminuye la capacidad del sistema inmunológico para reconocer y atacar a las células leucémicas (Dondi & Varin-Blank, 2022). Este efecto inmunosupresor no

solo favorece la supervivencia de las células tumorales, sino que también dificulta la eficacia de tratamientos inmunológicos.

### **1.3.3 Moléculas que median la interacción entre las NLC y LLC**

Las NLC producen y secretan quimiocinas y factores de crecimiento, incluidos CXCL12 y CXCL13, así como el factor activador de células B (BAFF) y un ligando inductor de proliferación (APRIL), que atraen a las células B-LLC al compartimento tisular y apoyan su supervivencia y proliferación.

BAFF y APRIL son miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), y se encuentran expresados en altos niveles por las NLC. La estimulación de BAFF y APRIL induce la activación de la vía NF- $\kappa$ B y la expresión de BCL-2, preservando la supervivencia de las células LLC (Herishanu et al., 2013; Taghiloo & Asgarian-Omran, 2024). En la misma línea, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), secretado por las células NLC, induce señales de pro-supervivencia (Taghiloo & Asgarian-Omran, 2024).

Las células NLC expresan altos niveles de CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ), una quimiocina que es un potente quimioatrayente, involucrado en la migración de las células leucémicas a través del endotelio vascular, y mediador de su interacción con las células del estroma de la médula ósea (J. A. Burger et al., 2000). A su vez, las células de LLC circulantes expresan en su superficie el receptor de quimiocina CXCR4. Una vez que las células leucémicas se unen a las células NLC, son protegidas de la apoptosis a través de un firme contacto célula a célula. La interacción CXCR4-CXCL12 induce la activación de vías de señalización posteriores como la MAP quinasa y AKT, cruciales para el mantenimiento de la supervivencia de las células LLC (Dondi & Varin-Blank, 2022). Además, las NLC secretan CXCL13 que desempeña un papel en el tráfico de células B. La interacción de CXCL13 con su receptor CXCR5, expresado en altos niveles en células leucémicas, es responsable de la localización de los linfocitos en órganos linfoides secundarios y del tráfico activo dentro de los folículos (Mantovani et al., 2002; Zaaboub et al., 2022). También producen CCL21 que se retiene en la membrana celular y proporciona una potente señal quimioatrayente para las células de LLC, favoreciendo no sólo su entrada sino la retención y acumulación en los ganglios linfáticos (Zaaboub et al., 2022). En respuesta a los antígenos presentados por las células NLC, la activación de BCR desencadena el aumento de la secreción de quimiocinas CCL3 y CCL4 por parte de las células LLC. Estas quimiocinas movilizan células accesorias,

como las células T y los monocitos, a nichos tisulares, lo que permite la formación de un entorno propicio para las células LLC (Hanna et al., 2019).

Se ha descrito que las células B leucémicas secretan quimioatrayentes que reclutan macrófagos derivados de monocitos al nicho de la LLC en la médula ósea y los ganglios linfáticos, donde adquieren el fenotipo similar al M2. La diferenciación al fenotipo M2 es impulsada por HMGB1, IL-10 o exosomas producidos por células B leucémicas (ten Hacken & Burger, 2016). La proteína B1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) es liberada por las células de LLC, y promueve la diferenciación de las NLC al unirse al ADN y desencadenar la respuesta inmunitaria a través de la interacción con el receptor de productos finales de glucosilación avanzada (RAGE) y el receptor tipo Toll 9 (TLR9) (Jia et al., 2014). En este trabajo se muestra que al bloquear la vía de señalización HMGB1-RAGE/TLR9, se impide la diferenciación de las células NLC.

No obstante, si bien el papel de las NLC en el apoyo a la supervivencia de las células de LLC está bien establecido, los mecanismos moleculares que inducen la diferenciación de las NLC siguen sin estar completamente comprendidos. Por ello, se requieren más investigaciones para desentrañar los mecanismos que regulan dicha diferenciación y su papel en la progresión de la LLC. Sin embargo, los esfuerzos por lograr esta comprensión se han visto obstaculizados por limitaciones prácticas en su obtención. Por lo tanto, lograr establecer un protocolo sólido para la obtención de NLC in vitro y su caracterización, sería de gran valor para continuar ampliando el conocimiento acerca del rol del TME, y particularmente de las NLC, en la LLC. Conocer dichos mecanismos nos permitiría explorar el potencial de las NLC como blanco terapéutico en el tratamiento de la LLC. En particular, teniendo en consideración el creciente interés en el desarrollo de terapias que logren interrumpir la interacción entre la célula tumoral y su microambiente.

## **II. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

- Estandarizar una metodología para la obtención de células “nurse like” a partir de monocitos de sangre periférica y evaluar sus características fenotípicas, con fines de estudiar posteriormente los mecanismos que inducen su diferenciación en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- 1) Aislar células mononucleares de sangre periférica (CMSP) provenientes de muestras de pacientes con LLC, evaluar el porcentaje de monocitos presentes e incubarlas in vitro bajo diferentes condiciones de cultivo.
- 2) Caracterizar fenotípicamente, luego de 14 días de cultivo de las CMSP, las células adherentes al plástico con marcadores que permitan identificar las NLC diferenciadas.
- 3) Determinar la expresión de marcadores inmunosupresores en las NLC obtenidas luego de su diferenciación.
- 4) Comparar los marcadores presentes en las células NLC diferenciadas a partir de muestras de pacientes con diferentes perfiles clínicos.

### III. Materiales y Métodos

#### 3.1 Reactivos

##### 3.1.1 Soluciones, buffers y medios de cultivo

- Solución Ficoll-Histopaque-1077: Solución isotónica de Ficoll Histopaque® (Sigma-Aldrich #10771). Solución de polisucrosa y diatrizoato de sodio con una densidad de 1,077 g/L.
- Medio de cultivo RPMI completo: Medio RPMI 1640 1X + GlutaMAX™ con 1% HEPES Buffer Solution 1M, 1% Piruvato de Sodio 100mM, 1% L-Glutamina 200mM, 1% de Antibiótico-Antimicótico 100X compuesto de penicilina, estreptomicina y anfotericina b, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Todos los reactivos fueron adquiridos de Gibco™.
- Solución de desprendimiento celular: EDTA 5mM, 2% SFB, PBS 1X.
- *Buffer* fosfato salino (PBS) 10X: Solución preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,078M y KHPO<sub>4</sub> 0,015M, pH 7,4.
- Inhibidor de unión a receptores Fc Anti-Hu. (Bioscience® #2410741).
- *Buffer* de fijación celular: Solución preparada con 4% paraformaldehído (PFA), PBS 1X.
- Fixation Buffer con 4% PFA (Biolegend® #420801).
- Solución Cyto-Fix Perm/Wash 10X (Biolegend® #426803).
- *Buffer* de permeabilización celular: Solución preparada con 0,2% Triton X-100, PBS 1X.
- Buffer de bloqueo: Solución preparada con 5% SFB, PBS 1X.
- Medio de montaje Prolong™ Gold antifade reagent (Invitrogen™ #P36930).

##### 3.1.2 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para el fenotipaje se encuentran detallados en la Tablas 4 y 5, para ensayos de citometría de flujo e inmunofluorescencia, respectivamente.

**Tabla 4.** Anticuerpos utilizados para ensayos de Citometría de Flujo.

<b>Anticuerpo (anti-human)</b>	<b>Compañía</b>	<b>Clon</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Volumen (uL)</b>
CD19	Biolegend® #302232	HIB19	Pacific Blue	0,63
CD19	Biolegend® #302208	HIB19	PE	1
CD5	Biolegend® #364008	L17F12	PECy7	1
CD11b	Invitrogen™ #406-0118-42	ICRF44	Brilliant Violet 605	0,63
CD68	Biolegend® #333812	Y1/82A	Alexa Fluor 488	2,6
CD206, MMR	Biolegend® #321152	15-2	Pacific Blue	1
CD163	Biolegend® #333620	GHI/61	Alexa Fluor 647	1
CD163	Biolegend® #333606	GHI/61	PE	1,25
CD206	Biolegend® #321123	15-2	PECy7	0,63
IDO1	Biolegend® #654004	2E2/IDO1	Alexa Fluor 647	1
CD274, PD-L1	Invitrogen™ #56-5983-42	MIH1	Alexa Fluor 700	0,63

**Tabla 5.** Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Microscopía Confocal.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Compañía</b>	<b>Clon</b>	<b>Origen</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Dilución</b>
-------------------	-----------------	-------------	---------------	--------------------	-----------------

Primario Anti-humano CD68	Invitrogen™ #14-0688- 82	KP1	Ratón	Sin conjugar	1:100
Primario Anti-humano CD163	Invitrogen™ #MA1- 82342	EDHu-1	Ratón	Sin conjugar	1:100
Primario Anti-humano CD206	Invitrogen™ #MA5- 32498	JF0953	Conejo	Sin conjugar	1:200
Secundario Anti-conejo IgG	Invitrogen™ #A21245	-	Cabra	Alexa Fluor 647	1:500
Secundario Anti-ratón IgG	Invitrogen™ #A11029	-	Cabra	Alexa Fluor 488	1:500

### 3.2 Procedimientos generales

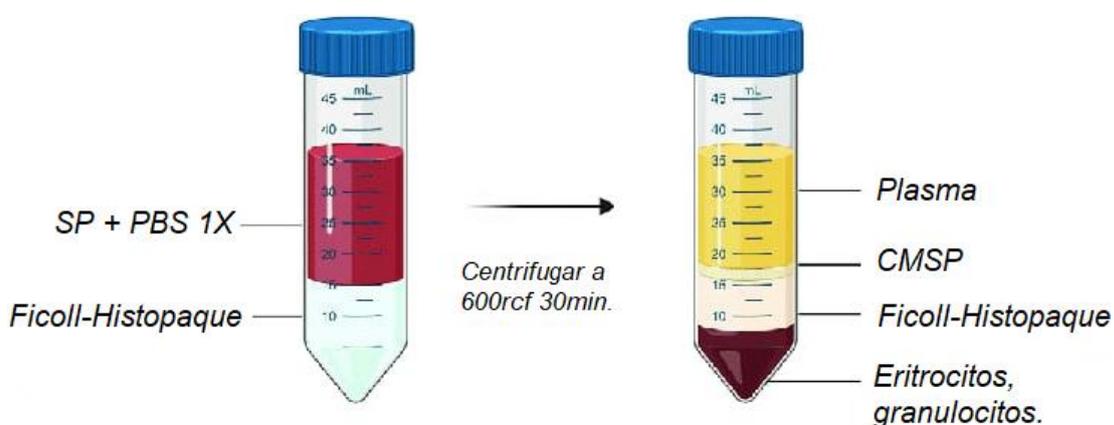
#### 3.2.1 Muestras de pacientes con LLC

Las muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados con LLC se obtuvieron a partir del BioBanco de LLC del Institut Pasteur de Montevideo. El ingreso de todos los pacientes al BioBanco fue realizado bajo su consentimiento informado, y de acuerdo con la Declaración de Helsinki y las regulaciones éticas de Uruguay. El diagnóstico de LLC de los presentes pacientes se basó en los sistemas de estadificación Rai y Binet, y en los criterios inmunofenotípicos estándar. El trabajo se realizó con muestras provenientes de pacientes con diferentes características clínicas. El detalle de las mismas para cada paciente se muestra en la Tabla # (Anexo). Las células se utilizaron frescas o viablemente congeladas en SFB que contenía 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) para su almacenamiento en nitrógeno líquido.

#### 3.2.2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

La muestra de SP del paciente se traspasó a un tubo Falcon™ de 50mL, al cual se le agregó PBS 1X en una relación 1:1, y se mezcló por inversión. En tubos Falcon™ de 15mL se colocaron 5mL de solución Ficoll-Histopaque-1077 y se agregaron, sobre la pared del tubo, 10mL de la dilución de SP-PBS 1X, para tener una relación (1:2). El procedimiento se realizó con precaución de no mezclar los componentes. Para lograr la

separación por gradiente de densidad se centrifugó a 600rcf, sin aceleración ni freno, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al final de la centrifugación se forman múltiples fases (Figura 4). La interfase entre el plasma y el Ficoll, conteniendo las CMSP, se recuperó con pipeta y se colocó en un nuevo tubo Falcon™ de 50mL. La fracción de plasma también se recuperó para su almacenamiento a -80°C. A las CMSP se le agregó PBS 1X hasta completar el tubo, y se centrifugó 8 minutos a 400g. El sobrenadante fue descartado y las células se resuspendieron en PBS 1X. Todo el proceso de aislamiento se realizó en esterilidad en cámara de flujo laminar. Al final se realizó el recuento celular a partir de una pequeña alícuota de las CMSP.



**Figura 4. Separación de CMSP por gradiente de densidad.** Representación gráfica del aislamiento de CMSP mediante gradiente con Ficoll-Histopaque. Se observa el gradiente en tubos de 50mL Falcon™ previo a la centrifugación (izquierda), y el gradiente luego de centrifugar (derecha). En la parte superior del gradiente se observa la fracción de plasma. La interfase entre el plasma y el Ficoll contiene las CMSP. En el sedimento se encuentran los eritrocitos, granulocitos, etc.

En caso de criopreservación, las muestras de CMSP se centrifugaron 6 minutos a 400rcf a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y el pellet de células fue resuspendido, según la concentración de células deseada, en medio de congelamiento (90% SFB y 10% DMSO). La suspensión celular se pasó a crioviales ya en hielo, y luego se colocaron en un recipiente Mr. Frosty™ de congelación. Todo el proceso de congelado se realizó en esterilidad en cámara de flujo laminar. En una primera etapa los crioviales son almacenadas en freezers a -80°C y posteriormente son llevados a tanques de nitrógeno líquido para su conservación.

### 3.2.3 Descongelado de CMSP

El contenido de los viales criopreservados se resuspendió en 10mL de medio de cultivo RPMI 1640 completo, previamente calentado a 37°C, en tubos Falcon™. El procedimiento debe realizarse rápidamente, con el fin de evitar la muerte celular debido al DMSO presente. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 400rcf, a máxima aceleración y desaceleración. Se retiró el sobrenadante, el pellet se resuspendió en el volumen sobrante y se agregó medio RPMI completo para llevar la suspensión celular a la concentración deseada. El proceso de descongelado se realizó en esterilidad en cámara de flujo laminar.

Posteriormente, se tomó una alícuota en microtubos Eppendorf para realizar el recuento y viabilidad celular. Primero, se diluyó la misma con PBS en relación 1:2, debido a la alta concentración celular. Luego, se realizó un ensayo de exclusión con Azul Tripán, en proporción 1:1. El colorante azul es incorporado en la membrana celular de las células muertas, distinguiéndolas de aquellas células vivas que no se tiñen. El ensayo se analizó mediante el contador automático *Countess™ 3 FL Automated Cell Counter*. *El valor de viabilidad óptimo es en muestras frescas mayor a 90% y en muestras congeladas superior a 80%.*

### 3.2.4 Cultivo celular de CLL y diferenciación de NLC

Las muestras de CMSP se cultivaron en alta concentración,  $10 \times 10^6$  células/mL, en placas multipocillo Costar® de 12 pozos (*Sigma #CLS3513*). El cultivo se hizo en medio RPMI-1640 completo, suplementado con SFB al 10%, a una densidad de  $20 \times 10^6$  de células por pozo, con el fin de inducir la diferenciación de los monocitos a NLC. Esta condición fue aplicada para los ensayos de citometría de flujo, descritos a continuación.

Para ensayos de inmunofluorescencia (IF) la concentración celular deseada fue de  $15 \times 10^6$  células/mL. El cultivo se realizó en placas de 8 pocillos  $\mu$ -Slide 8 Well<sup>high</sup> ibiTreat (*ibidi #80806*), a una densidad de  $4,5 \times 10^6$  células por pozo.

También, se desarrollaron ensayos de IF con la condición descrita anteriormente, en placas de 12 pozos y alta densidad celular. Para ello se utilizaron cubreobjetos de vidrio circulares para microscopía, que fueron colocados previamente en el fondo de cada pocillo de la placa de cultivo para que se adhiran allí las NLC desarrolladas.

Antes de realizar el cultivo,  $2 \times 10^6$  células obtenidas de la muestra obtenida de CMSP se reservó en microtubos Eppendorf para realizar su caracterización fenotípica mediante citometría de flujo (día 0).

El proceso de cultivo se realizó en esterilidad en cámara de flujo laminar.

Las células se mantuvieron durante 14 días en una incubadora humidificada, a  $37^\circ\text{C}$  y con  $\text{CO}_2$  al 5%.

Diariamente los cultivos fueron analizados bajo el microscopio óptico para detectar la formación de NLC.

Al finalizar el cultivo (día 14) las células de LLC de los cultivos de CMSP fueron removidas, y se reservaron en tubos Falcon™ para su análisis por citometría de flujo. Se realizaron lavados con medio RPMI completo para eliminar células B restantes. El proceso se realizó pipeteando suavemente contra los laterales del pozo, para evitar alterar la monocapa de NLC. Al finalizar cada lavado se observó bajo el microscopio la monocapa de NLC, asegurando que se mantuviera adherida al pozo y que quedara un número mínimo de células de LLC en la superficie.

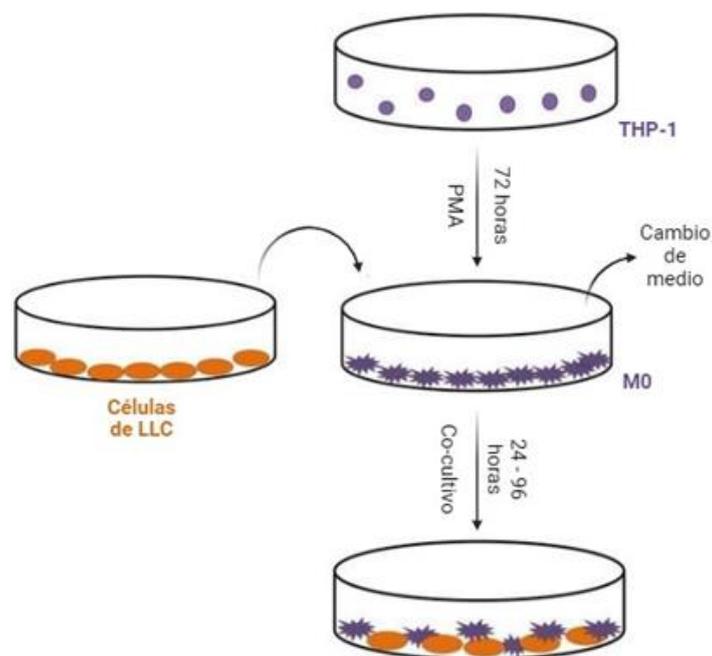
Para los ensayos posteriores de citometría de flujo fue necesario recuperar las células adherentes. Para ello se incubaron en 1mL de la solución de desprendimiento celular, durante 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . De ser necesario, se terminó de despegar las células con un pequeño cell scraper (Corning® #3010) o con ayuda de un tip. Se reservó la suspensión celular en tubos Falcon™, y se realizaron lavados con PBS 1X para recuperar NLC restantes.

### **3.2.5 Cultivo celular de THP-1**

La línea celular THP-1, derivada de células de leucemia monocítica humana, se mantuvo en cultivo en medio RPMI completo en botellas de cultivo celular (Corning® #CLS431080). Durante su crecimiento se mantuvieron en una incubadora humidificada a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ .

Con el fin de comprobar si las células THP-1 diferenciadas a macrófagos eran capaces de proteger a las células de LLC de la muerte celular, se procedió a realizar ensayos de co-cultivo de células de LLC con macrófagos derivados de THP-1. Para ello fue necesario con anterioridad diferenciar la línea celular. Las células THP-1 pueden ser inducidas a diferenciarse en macrófagos con la adición de Forbol-12-mirístato-13-acetato (PMA), obteniéndose células adherentes similares a los macrófagos (Park et al., 2007). Por lo tanto, en primer lugar, las células THP-1 se cultivaron en placas de 24

pozos (Costar® #3524) en medio RPMI completo, con una concentración celular de  $5 \times 10^5$  células/mL. Para inducir su diferenciación a macrófagos, las células THP-1 fueron tratadas (Figura 5) con 5 ng/ml de PMA durante 72 horas. La formación de macrófagos adherentes luego del tratamiento se comprobó mediante su examinación por microscopía de campo claro, y citometría de flujo (descrito más adelante). Una vez obtenidas las células diferenciadas, se retiró el sobrenadante con cuidado de no alterar la monocapa adherida, y se lavó con PBS 1X temperado para eliminar el reactivo residual. Al mismo tiempo, células de LLC descongelaadas según el protocolo descrito anteriormente, se ajustaron a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI completo, y se agregaron al cultivo de células THP-1 diferenciadas. Adicionalmente, se realizó un control en el cual las células de LLC no fueron co-cultivadas con las THP-1. Durante un período de 96h, cada 24h las células de LLC en ambas condiciones, sin y en co-cultivo, fueron recolectadas con pipeta para realizar ensayos de viabilidad mediante citometría de flujo.



**Figura 5. Esquema del co-cultivo de células de LLC con macrófagos derivados de la línea celular THP-1.** Tratamiento de línea celular THP-1 con Forbol-12-mirístato-13-acetato (PMA) durante 3 días para la obtención de macrófagos adherentes (M0). Posterior co-cultivo de las células de LLC con los macrófagos diferenciados. Adicionalmente se realizó un control sin co-cultivo de las células de LLC. Se realizaron ensayos de viabilidad cada 24hs, durante 4 días, por citometría de flujo.

Las condiciones mencionadas anteriormente fueron puestas a punto a partir de distintos ensayos de diferenciación y polarización realizados previamente sobre la línea celular

THP-1. Las células adherentes se evaluaron mediante citometría de flujo para verificar en ellas la presencia de marcadores de macrófagos. Para ello fue necesario efectuar su desprendimiento de la placa, tal como se realizó con las NLC, y continuar con el protocolo estándar de citometría mencionado a continuación. Para este ensayo se utilizaron como control células THP-1 sin diferenciar, con el fin de evidenciar una variabilidad en la expresión de dichos marcadores. Adicionalmente, se realizó una condición igualmente tratada con 5 ng/ml de PMA pero durante 48 horas, seguido de un período de resting de 72 horas. Al comienzo del período de resting se retiró el tratamiento y se realizó un lavado con medio RPMI completo. Por otra, para la obtención de macrófagos polarizados a M2 a partir de esta línea celular, se hicieron ensayos con estímulos adicionales, utilizando distintas interleucinas para la obtención de diversas clases de macrófagos tipo M2. Los ensayos comenzaron con el cultivo de las células THP-1 y su diferenciación bajo tratamiento con PMA por 48 horas. Una vez cumplido el tiempo se realizó un lavado con medio. Posteriormente, una de las condiciones, implicó la estimulación con IL-4 30ng/mL durante 72 horas, con el fin de obtener una polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2a. La segunda condición fue estimulada con IL-10 30ng/mL durante el mismo período de tiempo, logrando polarizar los macrófagos hacia un fenotipo M2c. Al finalizar los tiempos de tratamiento, se obtuvieron las células adherentes y se analizó la presencia de los marcadores de macrófagos en cada una de las condiciones. Con el objetivo de que cada población pueda ser analizada al mismo tiempo final, se debió diseñar un cronograma (Tabla 6) para coordinar los tiempos de cultivo de cada condición, haciendo un efectivo uso del tiempo.

**Tabla 6. Cronograma para preparar los cultivos celulares de macrófagos M0, M1 y M2 a partir de la línea celular THP-1.**

<b>Población deseada</b>	<b>Día 0</b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día 4</b>	<b>Día 5</b>
<b>THP-1</b>	THP-1	-	Cambio de medio	-	-	Análisis
<b>M0</b>	-	-	THP-1 + PMA	-	-	Análisis
<b>M0</b>	THP-1 + PMA	-	Resting	-	-	Análisis
<b>M2a</b>	THP-1 + PMA	-	IL-4	-	-	Análisis
<b>M2c</b>	THP-1 + PMA	-	IL-10	-	-	Análisis

### **3.3 Caracterización fenotípica**

A continuación, se detallarán los enfoques metodológicos empleados en las técnicas de microscopía y citometría de flujo, y sus fundamentos, para lograr caracterizar las NLC. A través de estas herramientas, se buscó obtener información detallada sobre la morfología celular y la expresión de marcadores específicos que definen el fenotipo de estas células.

#### **3.3.1 Microscopía**

##### **3.3.1.1 Microscopía de campo claro y campo oscuro**

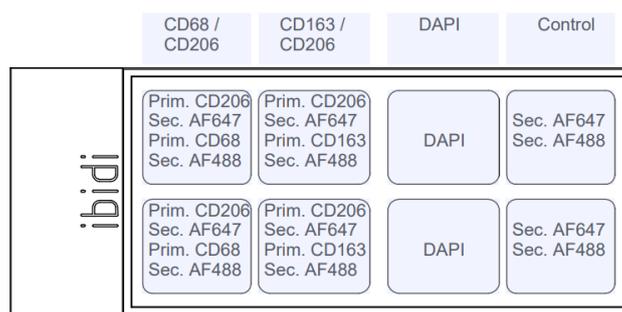
La microscopía de campo claro es una técnica fundamental en el estudio de células en cultivo, permitiendo la observación directa de su desarrollo, la morfología celular y sus interacciones en un ambiente controlado. Se destaca por ser una técnica sencilla y directa, que no precisa necesariamente de una tinción especial de la muestra para su observación. Esta técnica se basa en el uso luz blanca como fuente luminosa, que se transmite a través de las muestras, es decir, las células en las placas de cultivo. La intensidad de la luz se regula utilizando el diafragma y las perillas de brillo del microscopio. El enfoque se establece con el tornillo macrométrico, y se termina de ajustar con el tornillo micrométrico. La imagen se magnifica mediante la lente del objetivo, y se proyecta en un ocular o una cámara. La muestra se visualiza oscura contra un fondo claro. A diferencia de la microscopía de campo oscuro, que consiste en generar una trayectoria inclinada de la iluminación formando un cono de luz con el centro obscuro. El cono de luz garantiza que solamente la luz difractada de la muestra sea la que se propague al objetivo, formando como resultado una imagen de elementos luminosos con un fondo oscuro.

##### **3.3.1.2 Microscopía de fluorescencia**

La microscopía de fluorescencia es una técnica avanzada que permite la obtención de imágenes de muestras biológicas en alta resolución y contraste. Se puede analizar la distribución de las células, sus características y la presencia de múltiples marcadores de superficie e intracelulares. A diferencia de la microscopía convencional, que capta luz de toda la muestra, la microscopía confocal utiliza como fuente de iluminación luz láser, que se mantiene lineal al propagarse, y un pinhole que captura únicamente la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano focal. Esto resulta en imágenes

nítidas y en capas, permitiendo la reconstrucción tridimensional de estructuras celulares. Por tanto, las muestras deben teñirse con anticuerpos fluorescentes o poseer fluorescencia natural. Aplica el principio de absorción de energía, el cual implica que las moléculas se excitan a través del láser a una longitud de onda específica, y emiten luz a una longitud de onda más baja debido a la pérdida de energía, esta luz es la detectada (Sanderson et al., 2014). Al seleccionar los fluoróforos, se debe considerar el amplio espectro de longitudes de onda tanto de emisión como de excitación, para evitar que la señal de un fluoróforo interfiera con la de otro.

Los pasos en la microscopía de IF incluyen la preparación del cultivo celular, como fue descrito anteriormente. Pudiendo realizarse directamente en placas específicas para microscopía, o sobre cubreobjetos circulares dentro de las placas de cultivo, de modo que las células permanezcan adheridas a él. Una vez desarrolladas las NLC, se retiró la suspensión celular y se realizaron lavados con medio RPMI completo temperado para remover las células B restantes. Siempre cuidando de no alterar la monocapa de NLC adheridas. Las células se incubaron con el buffer de fijación celular o fixation buffer comercial, durante 15 minutos a temperatura ambiente para su fijación. Se lavó con PBS 1X. Se permeabilizaron las células con el buffer de permeabilización celular, incubándolas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con PBS 1X. Las células se bloquearon al incubarlas 30 minutos a temperatura ambiente con el buffer de bloqueo, evitando así las uniones no específicas. Sobre la solución de bloqueo se añadieron los anticuerpos primarios seleccionados (Figura 5) y se dejó en incubación toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Se combinaron los distintos anticuerpos teniendo en cuenta las características y el origen de cada uno. Se realizaron lavados con PBS 1X. Se añadieron los anticuerpos secundarios en buffer de bloqueo, y se incubaron dos horas a temperatura ambiente. A partir de aquí el ensayo se continuó en condiciones de oscuridad. Se lavaron los pozos con PBS 1X. Para realizar la tinción nuclear se incubaron las células con DAPI 0,5ug/mL en PBS 1X, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con PBS 1X. En caso de trabajar directamente sobre placas se añadió una gota de medio de montaje en cada pocillo. De lo contrario, se retiró el cubreobjeto de la placa con ayuda de una pinza estéril, y se colocó inversamente sobre un portaobjeto de vidrio ya conteniendo la gota de medio de montaje. Se debe asegurar que no queden burbujas en el preparado, realizando el montaje suavemente. Se cubrieron las muestras con aluminio y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Luego, fueron conservadas a 4°C para su posterior análisis. En caso de su conservación a largo plazo, se guardaron a -20°C.



**Fig 6. Marcaje para el fenotipado de NLC por microscopía confocal.** Las NLC diferenciadas se incubaron en primaria instancia con anticuerpos primarios (CD206, CD68, CD163) sin conjugar. En un segundo paso se marcaron con anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 647 (columna 1 y 2). Teniendo en cuenta las características y el origen de cada anticuerpo se decidió combinarlos como figura en la imagen. Para el enfoque y ubicación de las células por IF se utilizaron células únicamente con tinción DAPI (columna 3). Como control se colocaron solamente los anticuerpos secundarios (columna 4). En todos los casos se realizó tinción nuclear con DAPI. Se realizaron duplicados de cada condición (fila 2).

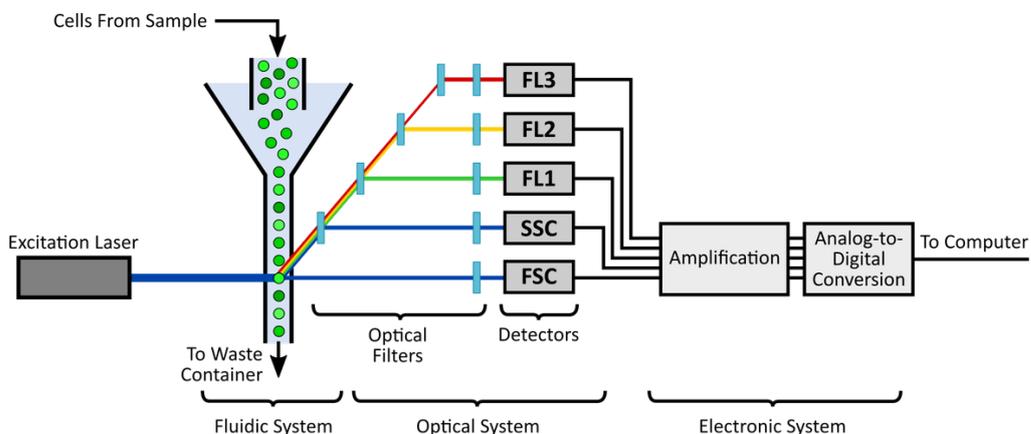
Las muestras fueron analizadas en el microscopio de laser confocal LSM ZEISS 800. El objetivo utilizado en todos los casos fue de 63x con inmersión en aceite. Las células se localizaron y enfocaron utilizando el filtro DAPI a baja exposición. Se debe tener cuidado con los tiempos de exposición a la luz prolongados para evitar el fotoblanqueo, es decir, la degradación del fluoróforo. Posteriormente, se realizó la selección de filtros para tomar las imágenes. Los archivos .TIFF se analizaron utilizando el software ImageJ.

### 3.3.2 Citometría de flujo convencional y espectral

La citometría de flujo es una técnica analítica utilizada para cuantificar y caracterizar células y partículas en suspensión, con tamaños entre 0,2 y 150µm (Depince-Berger et al., 2016). Permite medir múltiples parámetros celulares y cualquier componente que pueda ser marcado con un fluorocromo, siguiendo el mismo principio de la IF. Los citómetros de flujo cuentan con una parte fluídica que mediante un enfoque hidrodinámico promueven el transporte de las células individualmente en una sola fila hacia el haz láser. Las células a través de la columna son iluminadas por un solo haz con una longitud de onda particular. En la citometría convencional las señales de dispersión de luz resultantes y la fluorescencia pasan a través de espejos y filtros, que seleccionan longitudes de onda específicas, para luego ser dirigidas hacia el detector

respectivo. Por tanto, las longitudes de onda de excitación y emisión de los fluorocromos elegidos en una misma muestra no deben superponerse entre sí. La parte electrónica del citómetro convierte las señales de luz detectadas en señales electrónicas que pueden ser procesadas por una computadora. Mediante la herramienta de compensación es posible eliminar la sección superpuesta y la autofluorescencia. El parámetro Forward Scatter (FSC) mide la dispersión frontal de la luz, cuya intensidad se relaciona principalmente con el tamaño de las células. El parámetro Side Scatter (SSC) mide la dispersión lateral de la luz, asociándose con la granularidad y complejidad interna de las células. Así se da la medición del tamaño relativo, la granularidad y la intensidad relativa de fluorescencia de las células.

Actualmente, la llegada de la citometría espectral representó un avance significativo en la capacidad de análisis. La técnica captura un espectro completo de fluorescencia para cada célula, creando una especie de *huella* de las longitudes de onda que se emiten. Esto permite la utilización de múltiples fluorocromos con espectros de emisión solapados, y el diseño de paneles complejos de marcadores.



**Fig 6. Esquema de los componentes básicos de un citómetro de flujo.** Se indican los tres sistemas que componen a un citómetro (fluidico, óptico, electrónico), así como el flujo del procesamiento de la señal y la detección.

En marco de este trabajo se diseñaron diversos paneles con marcadores para la caracterización de las distintas poblaciones celulares a analizar (NLC, células B, THP-1) (Tabla 7. En la estrategia de diseño se consideraron los espectros de excitación y emisión de cada fluorocromo asociado a su anticuerpo y el índice de complejidad, para evitar su interferencia y asegurar una correcta detección en el citómetro de flujo,

contemplando el tipo y cantidad de láseres allí presentes. Aquella fracción de muestra a la que se le agregaron todos los marcadores a analizar se denominó MIX. Por otra parte, se realizó el control de fluorescencia menos uno (FMO), donde se incubó la muestra con todos los anticuerpos excepto aquellos a evaluar en la población objetivo, lo que es clave para determinar el porcentaje de células positivas. También se reservó una fracción de la muestra que no fue marcada como control sin tinción (US).

**Tabla 7.** Diseño de paneles para la caracterización mediante citometría de flujo de las distintas poblaciones celulares: NLC, células B.

<b>Muestra</b>	<b>Marcaje utilizado</b>
Células B	CD19-PE, CD5-PECy7, ZV
NLC	CD19-PE, CD11b-PECy7, CD163-AF647, CD206-PB, CD68-AF488
NLC	CD19-PB, CD11b-BV605, CD163-PE, CD206-PECy7, CD68-AF488, IDO-AF647, PDL1-AF700, NIR

Los marcajes detallados son los correspondientes al MIX.

Como fue detallado anteriormente, luego de los 14 días del cultivo celular, se realizó el desprendimiento de la monocapa de NLC, las células se colectaron en tubos Eppendorf, y luego de su conteo se colocaron en placas de 96 pocillos fondo V (*Deltalab #900012*) para realizar el marcaje, considerando la misma cantidad de células por pocillo. En caso de las células B se colocó un total aproximado de  $5 \times 10^5$  células por pocillo. Una vez en la placa las células se centrifugaron a 400g por 5 minutos, y se lavaron con PBS 1X. Para el análisis de viabilidad se utilizaron los marcadores ZombieViolet (ZV) o NIR, según el panel diseñado. El marcador se diluyó 1:1000, y se incubaron las células en 50uL de la dilución durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se realizó un lavado con PBS 1X. Para el bloqueo se colocaron 10uL del inhibidor de unión a receptores Fc, durante 15 minutos a 4°C. Se realizó un lavado con PBS 1X. Para el marcaje extracelular se incubaron las células 30 minutos a 4°C con los anticuerpos correspondientes conjugados a su fluorocromo, en un volumen final de 50uL con PBS 1X. Transcurrido el tiempo se realizó un lavado con PBS 1X para eliminar el excedente. Las células se fijaron al incubarlas con 50uL de fixation buffer comercial a 4°C durante 20 minutos. Se realizó un lavado con la solución Cyto-Fix Perm/Wash 1X. En el caso de las NLC se realizó marcaje intracelular, incubando las

células con el anticuerpo CD68-AF488 durante 30 minutos a 4°C, en un volumen final de 50uL con solución Cyto-Fix Perm/Wash 1X. Finalmente se lavaron las células con la solución Cyto-Fix Perm/Wash 1X, y se resuspendieron en 150uL de PBS 1X.

Para la compensación de la fluorescencia se utilizaron perlas UltraComp eBeads (Invitrogen #01-2222-42). Para el análisis de viabilidad el control utilizado fue realizado con células. En tubos Eppendorf, según la cantidad de fluorocromos a analizar, se colocaron 100uL de PBS 1X y una gota de perlas ya vortexeadas. Luego, a cada uno se le añadió 0,5uL del anticuerpo deseado, salvo para aquellos conjugados a PE y PECy7 que se agregó 10uL partiendo de una dilución previa 1:50. Se incubaron 15 minutos a 4°C, se lavaron y resuspendieron en PBS 1X. Las muestras se analizaron en el citómetro convencional Attune NxT o en el citómetro espectral Aurora.

Posteriormente los archivos con los resultados se analizaron con el software FlowJo y se procesaron en GraphPad. Cuando fue apropiado, se realizó la prueba t de Student para muestras pareadas, para determinar la significancia estadística de la diferencia entre los dos grupos de datos.

## IV. Resultados y Discusión

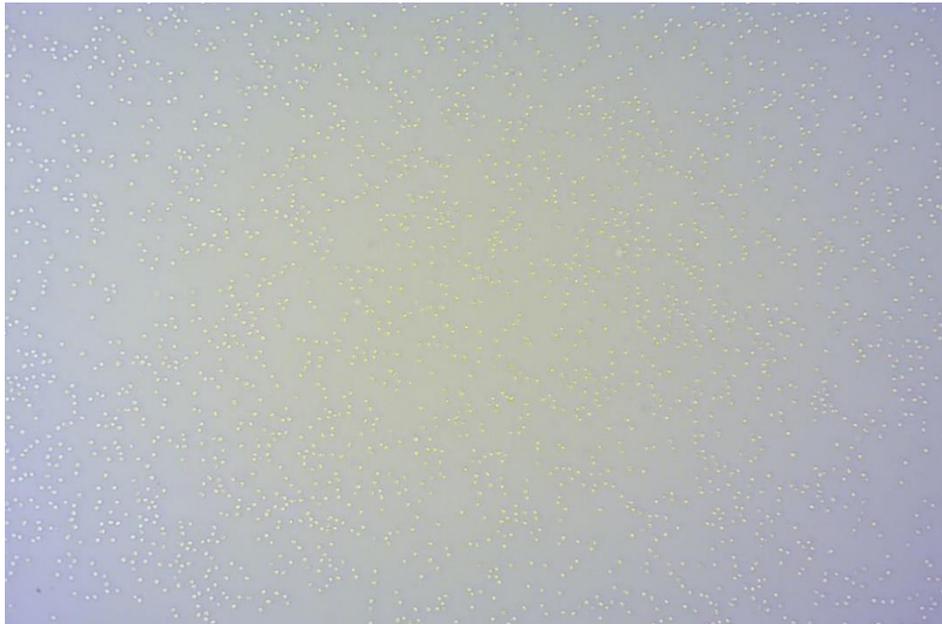
### 4.1 Optimización de las condiciones del cultivo para el desarrollo de las NLC

En primer lugar, con el objetivo de lograr el desarrollo de NLC en condiciones de cultivo estándar, se debió definir la densidad celular óptima para el cultivo de CMSP. En la literatura la información proporcionada sobre la densidad celular utilizada es muy variante de un estudio a otro, con concentraciones que van desde  $3 \times 10^6$  células/mL a  $15 \times 10^6$  células/mL (J. A. Burger et al., 2000; Filip et al., 2015), por lo que definir un valor de referencia fue necesario en la puesta de a punto de la metodología para la obtención de NLC. Inicialmente los cultivos de CMSP de pacientes con LLC fueron realizados a una densidad celular de  $10 \times 10^6$  células por pocillo en placas de 12 pozos. Sin embargo, transcurridos los 14 días de cultivo al observar la presencia de células al microscopio de campo claro se evidenció que el desarrollo de NLC fue ineficiente, no hallándose células adherentes. Por el contrario, se destaca la presencia de células B leucémicas de pequeño tamaño y distribuidas de forma dispersa (Fig. 7A) En cuanto a su morfología no se observan totalmente redondeadas, sino que hay presencia de células contraídas, con bordes irregulares y de aspecto arrugado. Dado que el contacto entre las células de LLC y los monocitos ha sido descrito como esencial para la diferenciación de NLC y la promoción de la supervivencia del clon leucémico (Tsukada et al., 2002), este hecho podría estar indicando que la baja cantidad de células B presentes en el cultivo dificulta la interacción célula-célula y por consecuencia la diferenciación de NLC.

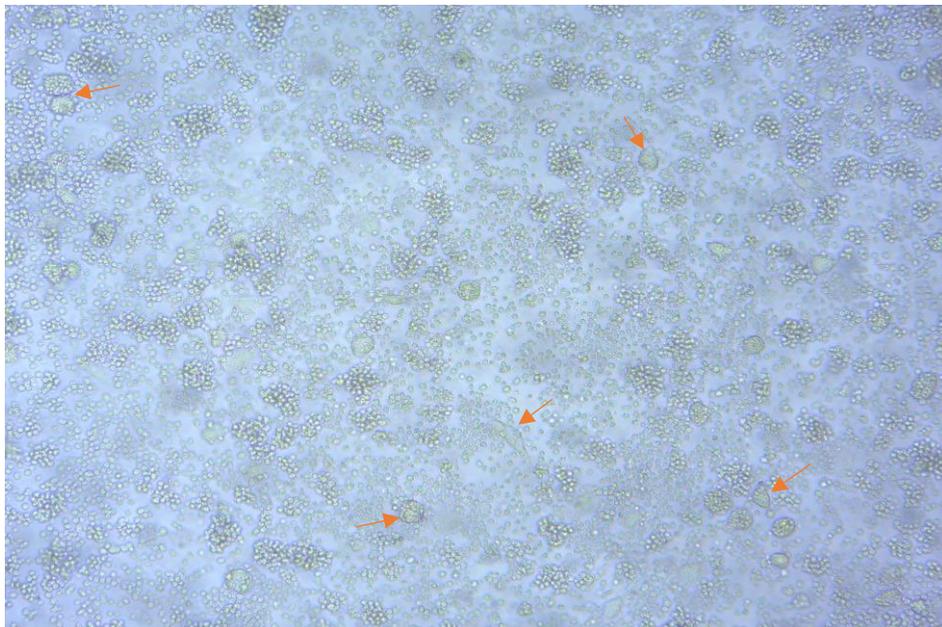
A continuación, tomando como referencia este resultado, se realizó el cultivo de CMSP modificando la densidad celular a un valor alto,  $20 \times 10^6$  células por pocillo, en placas de 12 pozos. Todos los días se observaron las placas al microscopio en un mínimo de 3 campos aleatorios, siguiendo así cambios visuales relacionados con la forma, el tamaño y el desarrollo general de las células para cada muestra. De esta forma se detectó el desarrollo de nurse-like cells en estos cultivos de alta densidad celular (Fig. 7B) cuya morfología redondeada o alargada agrandada resalta sobre el pequeño tamaño y forma redondeada de los linfocitos B. La aparición de las células adherentes comenzó a visualizarse de forma progresiva transcurridos aproximadamente 7 días, alcanzando su máximo luego de 14 días de cultivo. Sin embargo, pese a que la metodología empleada se mantuvo sin cambios, el desarrollo de NLC no fue igual para todas las muestras. Se detectó variabilidad en su formación, llegando a observarse una diferenciación de NLC reducida o incluso nula en algunas muestras (Fig. 7C). Este fenómeno sugiere que la capacidad de los monocitos para diferenciarse en células adherentes podría depender

de características clínicas particulares de cada paciente, algo que se abordará más adelante.

Adicionalmente, con el fin de detectar diferencias en la eficiencia del desarrollo de NLC se realizaron los cultivos de CMSP a alta densidad celular, utilizando dos tipos de placas de 12 pozos pertenecientes a compañías diferentes, *Greiner* y *Costar*. Sin embargo, el resultado en el desarrollo de NLC fue indistinto para ambos tipos de placas.

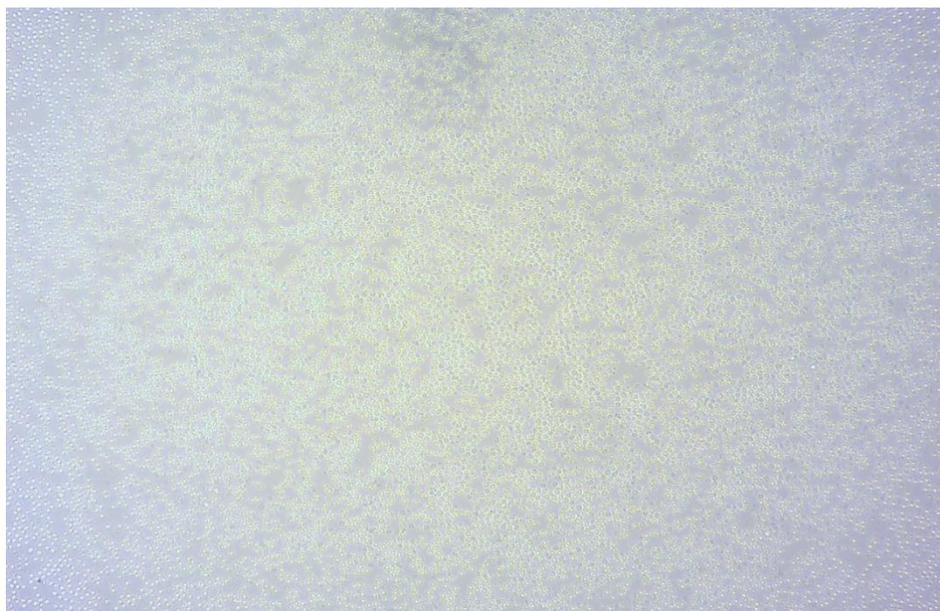


A)



B)

C)

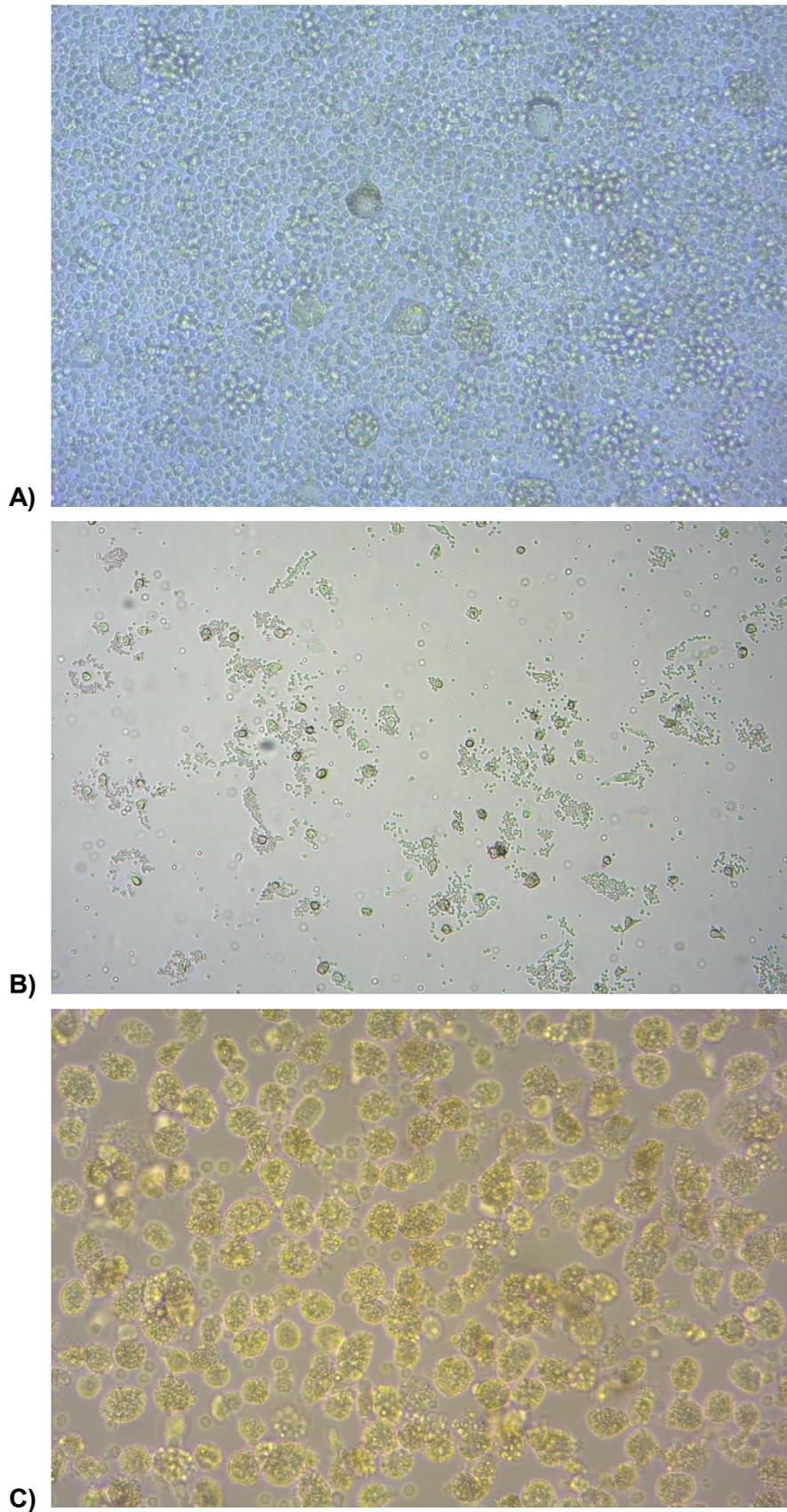


**Figura 7. Impacto de la densidad celular de linfocitos B leucémicos en el desarrollo de NLC.** Micrografías de campo claro transcurridos 14 días de cultivo de CMSP. **A)** Cultivo celular a una densidad de  $10 \times 10^6$  células. Se observa la presencia de células B dispersas y ausencia de NLC. **B)** Cultivo a una densidad celular alta. Se destaca el desarrollo de NLC (flecha naranja) sobre las células leucémicas presentes. **C)** Cultivo a una densidad celular alta,  $20 \times 10^6$  células. Se destaca la presencia mayoritaria de células B y ausencia de NLC. Aumento: 40X.

Al tratarse de un cultivo de largo plazo con el fin de nutrir las células durante el experimento inicialmente se realizó un recambio parcial del medio de cultivo en días alternos. No obstante, se observó que era más eficiente para el desarrollo de las NLC realizar un recambio parcial de medio de cultivo fresco cada 5 días. El período de tiempo más largo entre los recambios de medio aseguró una menor agitación de placa y el mejor asentamiento de las células. Respecto a la técnica fue relevante comenzar a retirar el sobrenadante con precisión de la parte superior del pozo, y colocar el medio fresco suavemente sobre el lateral del pozo, causando la menor alteración posible del cultivo. Se optó por realizar un recambio parcial del medio dada la importancia del contenido del medio ya presente en el cultivo. El recambio parcial del medio asegura que las concentraciones de citocinas, nutrientes y factores de crecimiento presentes se mantengan dentro de niveles adecuados. A su vez evita la acumulación de metabolitos tóxicos y mantiene un pH adecuado del medio, evitando la acidosis. Por tanto, el mantenimiento supone un beneficio en la supervivencia de las células B y favorece la diferenciación de las NLC, especialmente dada la implicancia de los factores solubles en la interacción entre estas células del sistema inmune (Herishanu et al., 2013).

En relación con la recolección de las células B del sobrenadante luego de finalizado el tiempo del cultivo celular se decidió, según lo observado al microscopio para cada muestra (Fig. 8A) realizar entre uno y dos lavados suaves para su recuperación. Después de realizar los lavados se observó una notable disminución en su número, dejando sólo una cantidad muy reducida de estas células en el cultivo, mientras que las NLC permanecieron adheridas (Fig. 8B). De lo contrario, realizar un mayor número de lavados para recuperar las células B resultaba en la pérdida de las células adherentes durante el procedimiento. O, en caso de mantenerse adheridas, las células mostraban una alteración en su morfología debido a la alteración mecánica.

Por último, debió ponerse a punto el desprendimiento de las células adherentes para llevar a cabo su posterior análisis e identificación. Para ello se realizaron pruebas incubando la monocapa de células adherentes con distintas soluciones para causar su desprendimiento. La examinación de la placa bajo el microscopio se realizó de forma rutinaria antes y después de cada incubación para controlar la integridad y el desprendimiento completo de las células. En primer lugar, se procedió a la incubación con tripsina; si bien se logró el desprendimiento de las células, el resultado no fue exitoso ya que la técnica resultaba agresiva para las células disminuyendo en consecuencia su viabilidad. Posteriormente, tomando como referencia la bibliografía, se probó la incubación con EDTA 0,7mM en PBS 1X. Sin embargo, no se logró el desprendimiento de la monocapa. A continuación, se realizó la incubación de nuevas muestras con EDTA 5mM en PBS 1X (Zaaboub et al., 2022). Además, en este paso se hicieron ensayos modificando el tiempo de incubación, así como las temperaturas, manteniendo las placas en hielo o en la incubadora a 37°C. Tras los distintos ensayos, se comprobó que la técnica más eficiente para el desprendimiento de las células adherentes NLC era la incubación con EDTA 5mM, SFB 2% y PBS 1X, durante 15 minutos a 37°C (Fig. 8C). La adición de SFB causaría una menor alteración de las células. De todas formas, hubo casos en que no fue suficiente la incubación con la solución para observar el desprendimiento completo de la monocapa de células adherentes. En esta situación se comenzó a utilizar un cell scraper o un tip cumpliendo la misma función para ayudar al desprendimiento, sin embargo, un trabajo mecánico prolongado afecta a las células de interés y su morfología.

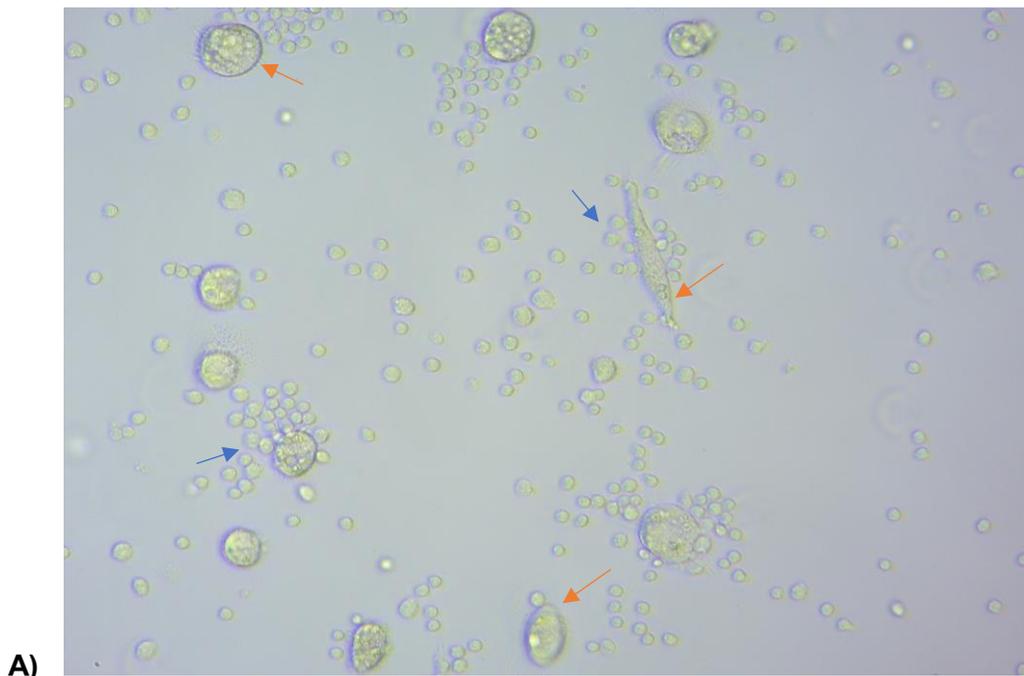


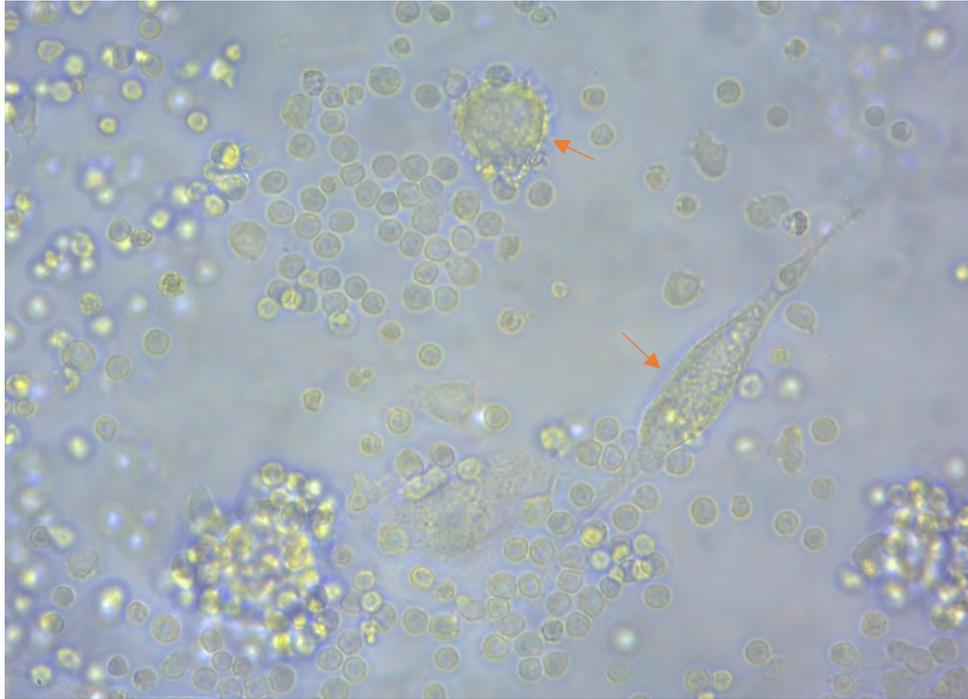
**Figura 8. Obtención in vitro y aislamiento de NLC.** Proceso de desprendimiento de NLC transcurridos 14 días en cultivo celular. **A)** NLC adherentes y células **B)** previo a los

lavados y el tratamiento de desprendimiento. **B)** NLC adherentes y menor presencia de linfocitos B posterior a los lavados. Aumento: 40X **C)** NLC y su cambio morfológico luego de la incubación con la solución de desprendimiento celular y uso de cell scraper.

#### 4.2 Características morfológicas de las NLC

Una vez establecido el protocolo de referencia que permitió la correcta obtención de las células adherentes, se procedió a su caracterización morfológica para confirmar que verdaderamente nos encontrábamos frente a las células de interés. Tras el cultivo de CMSP a la densidad celular de  $20 \times 10^6$  células por pozo, la apariencia de los monocitos pese a su tamaño era indistinguible de los linfocitos debido a la alta proporción de linfocitos leucémicos en la muestra. Se realizó un seguimiento diario para obtener una visión clara de las células y sus cambios morfológicos. Transcurrida una semana la presencia de células con propiedades adherentes se comienza a distinguir tras una agitación mínima de la placa. Bajo el microscopio óptico, con técnicas de campo claro y campo oscuro, se caracterizó la morfología de las células que se desarrollaron a partir de los cultivos de CMSP de LLC. Destacándose la aparición de células con características morfológicas variables (Fig. 9). Las células adherentes similares a macrófagos mostraban una morfología pleomórfica, presentándose con formas ovaladas o alargadas grandes, consistente con lo reportado previamente para NLC (Burger et al., 2000; Tsukada et al., 2002).

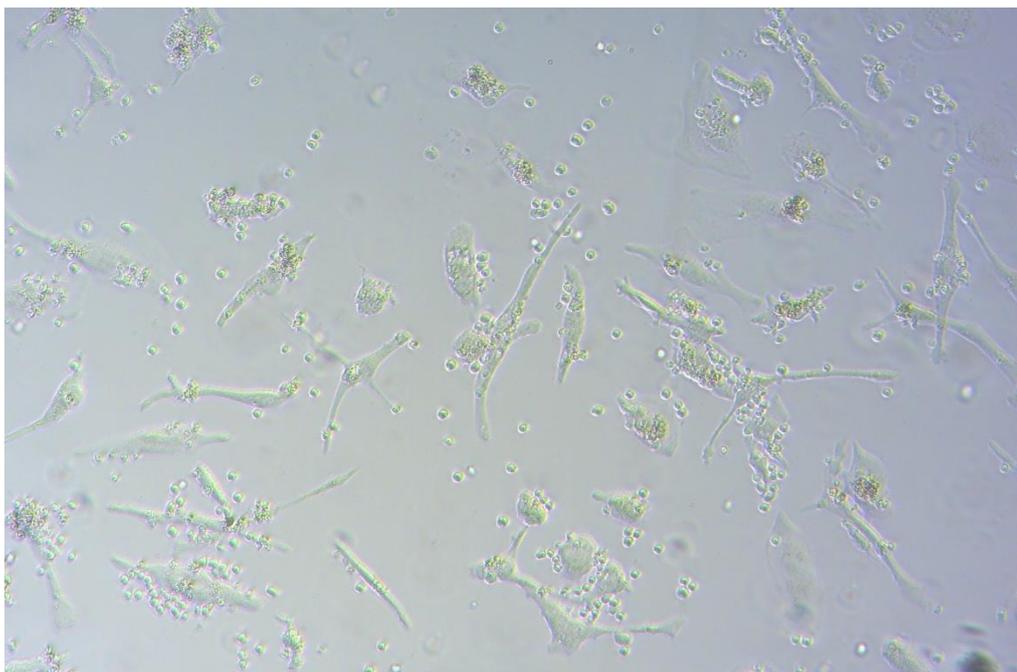




**B)**

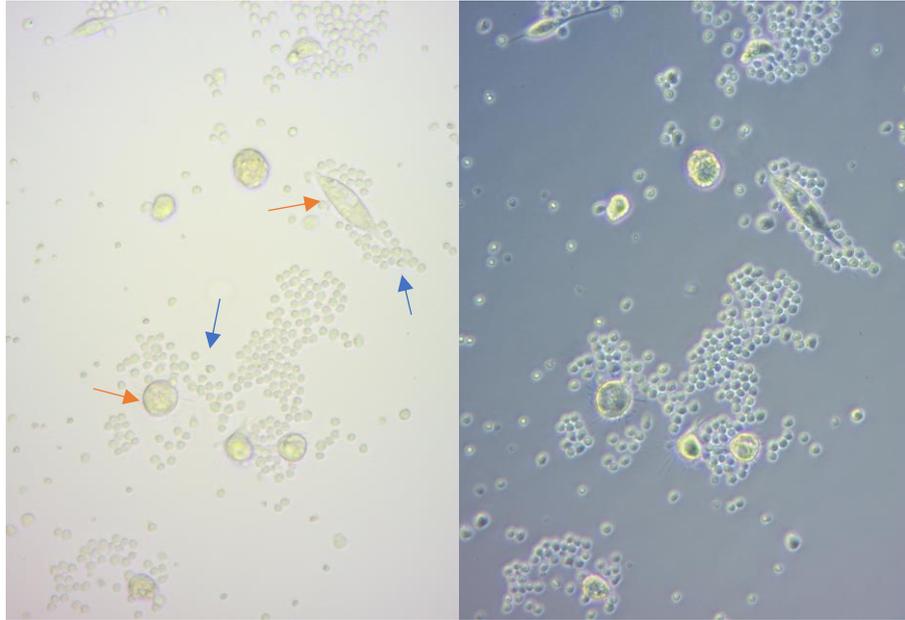
**Figura 9. Fenotipificación de NLC.** Caracterización morfológica de las NLC mediante microscopía óptica. Los paneles **A)** y **B)** muestran el pleomorfismo de las NLC (flecha naranja), resaltando sus distintas morfologías: ovalada y alargada agrandada, respecto a las células B (flecha azul). Aumento: 400X.

Por tanto, las NLC presentan una amplia gama de morfologías, desde una apariencia ovalada grande hasta una forma alargada y fusiforme. Particularmente en las células adherentes alargadas se pueden ver estructuras de apariencia similar a una cola que se proyecta hacia los lados. Estas proyecciones le otorgan a la célula una apariencia en forma de huso. La presencia de prolongaciones puede sugerir que las NLC exhiben características de motilidad celular, tal como ocurre en los fibroblastos (Herant et al., 2010). Asimismo, esta prolongación puede presentarse como dos o múltiples proyecciones, que a su vez pueden variar en longitud y orientación. En general, el núcleo de la célula parecería estar ubicado en el centro mientras que las prolongaciones se extienden en dos direcciones opuestas como se observa en la Figura 10. Se nota claramente el contraste de dicha morfología con las NLC de forma redondeada.



**Figura 10. Morfología fusiforme de las NLC.** Caracterización de la morfología alargada de las NLC. Se observan prolongaciones de variada longitud y número que se extienden a partir del centro de la célula adherente.

Como puede visualizarse en las micrográficas, si bien luego de los lavados de recolección de células B su número disminuye, aún queda una pequeña población remanente. Lo que es llamativo es la disposición que presentan las células de LLC que permanecen en el cultivo celular. Se observan múltiples células de LLC en estrecha proximidad a las NLC (Fig. 11). Estas se presentan rodeando a las NLC, formando una colección de células que se visualizan como clusters. La localización tan próxima y superpuesta de las células causa que muchas veces sus márgenes no se puedan distinguir. Como resultado del contacto estrecho entre el clon leucémico y las NLC se podría estar promoviendo la supervivencia de las células de LLC. Tal como fue evidenciado en investigaciones anteriores, la interacción física directa entre las células tumorales y TAM favorece el crecimiento de las células B neoplásicas y las protege de la apoptosis espontánea y quimioterapéutica (Herishanu et al., 2013; Dondi & Varin-Blank, 2022).



**Figura 11. Formación de clusters entre el clon leucémico y las NLC.** Se observa la ubicación en estrecha proximidad de las células B (flecha azul) rodeando las NLC (flecha naranja), lo que lleva a la formación de clusters. Imagen en campo claro (izquierda) y campo oscuro (derecha). Aumento: 100X

### 4.3 Inmunofenotipaje de las NLC por microscopía confocal

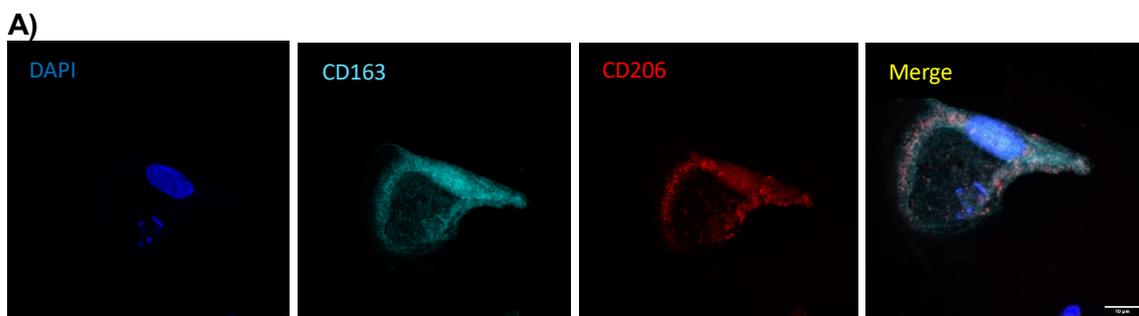
El segundo objetivo de este trabajo final de carrera consistió en caracterizar fenotípicamente, luego de 14 días de cultivo de las CMSP, las células adherentes similares a macrófagos. Tras su caracterización morfológica por microscopía óptica, procedí a estudiar la expresión de marcadores proteicos típicos de las NLC mediante microscopía de inmunofluorescencia. Para identificar las NLC diferenciadas examiné la presencia de los marcadores CD68, CD163 y CD206, cuya expresión anteriormente fue reportada en esta población celular (Mantovani et al., 2017). A su vez, estos marcadores de superficie son identificadores de macrófagos tipo M2 (Ysebaert & Fournié, 2011; Jia et al., 2014), por lo que su expresión permitiría confirmar si la población celular muestra un fenotipo antiinflamatorio similar al de los macrófagos M2. De forma contraria, estos marcadores no se encuentran presentes en el clon leucémico, lo que hace posible su diferenciación.

En primer lugar, con el fin de ubicar las células y diferenciar las distintas poblaciones celulares, realicé el análisis de la tinción con DAPI. La tinción con DAPI es una herramienta útil en este tipo de microscopía para visualizar los núcleos celulares, ya que

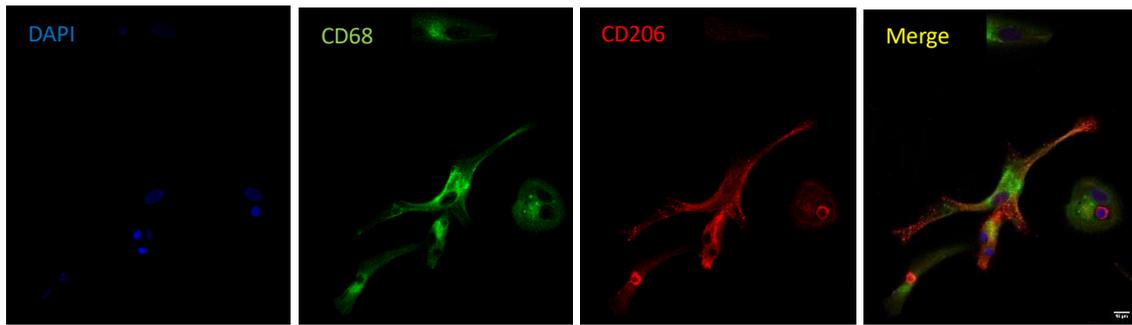
se une a regiones específicas del ADN, particularmente a secuencias ricas en adenina y timina. Mediante la observación de la estructura nuclear de las células, en las figuras a continuación, se logra diferenciar la población de células B tumorales de las NLC. En el caso de las NLC el núcleo se distingue por su mayor tamaño y heterogeneidad, respecto al núcleo de las células B que es más pequeño, redondeado y de estructura compacta.

A continuación, se realizó para las distintas muestras el análisis de las tinciones con los biomarcadores previamente mencionados (CD68, CD163 y CD206), con el objetivo de identificar y caracterizar las NLC en el microambiente tumoral de la LLC. En primer lugar, cabe resaltar que la técnica empleada fue realizada con éxito, ya que se observó una correcta tinción de las células, evidenciada por una señal intensa y específica para los marcadores seleccionados. La tinción para los marcadores CD163 y CD206 mostró una fuerte señal en las células adherentes (Fig. 12A). De manera similar, la tinción para CD68 también reveló una señal clara en las células adherentes (Fig. 12B). Estos hechos respaldan la identidad de estas células en el cultivo como NLC, debido a la consistencia con otros informes que indican la expresión de CD68 y CD163 en las NLC (Fiorcari et al., 2015; Marchesi et al., 2015). No menor, lo observado por nosotros in vitro en las NLC es relevante en el microambiente tumoral in vivo, ya que ha sido descrita la expresión de CD163 y CD68 en monocitos/macrófagos en el bazo y los ganglios linfáticos de pacientes con LLC (Ysebaert et al., 2010; Giannoni et al., 2014). Además, no observamos señal en las células B tumorales, lo que permitió una distinción clara entre ambas poblaciones celulares.

En busca de un enfoque que proporcione una visión detallada de la ubicación de los marcadores en las NLC se realizó una superposición (merge) de las emisiones obtenidas para cada biomarcador, revelando la co-localización de las proteínas en la célula.

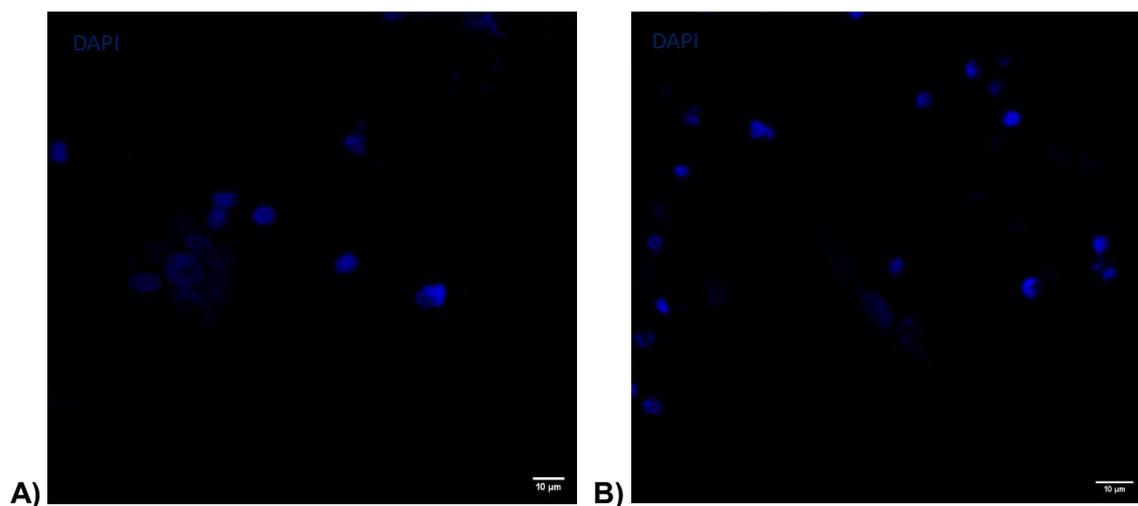


**B)**



**Figura 12. Caracterización de las células adherentes mediante inmunofluorescencia. A)** Expresión de los marcadores de superficie CD163 (cyan) y CD206 (rojo) en NLC. **B)** Expresión de los marcadores de superficie CD68 (verde) y CD206 (rojo) en NLC. En ambos casos se realizó tinción nuclear con DAPI (azul) para identificar el núcleo celular. A la derecha se muestra la superposición de las emisiones. Escala: 10µm.

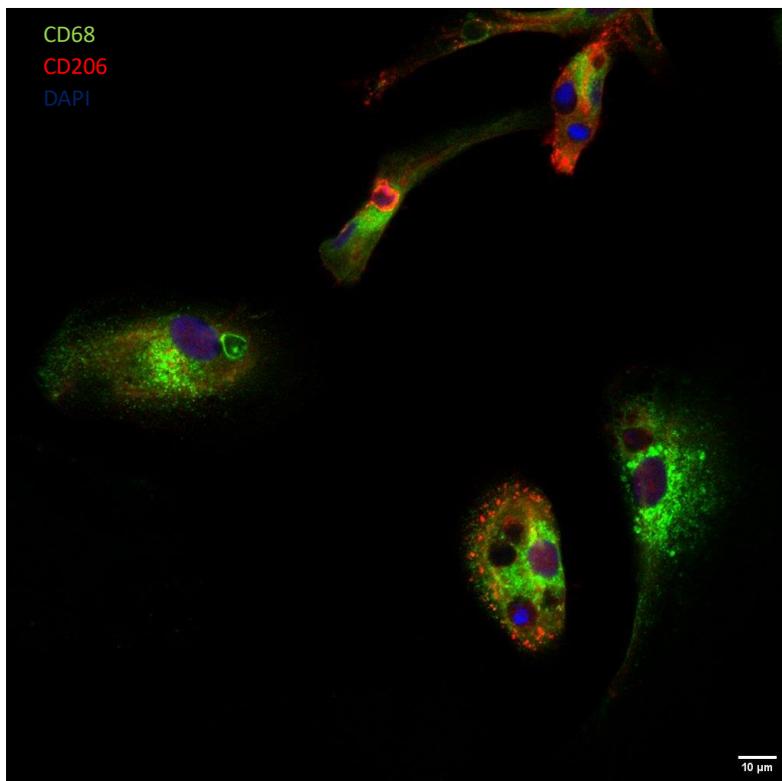
Como control negativo se realizó un ensayo únicamente con los anticuerpos secundarios y tinción DAPI, sin los anticuerpos primarios, para verificar la ausencia de unión inespecífica. En este control, no se observó señal a partir de los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 647, lo que confirma la especificidad de la técnica (Fig. 13). Asimismo, las propias células B actúan como control adicional, ya que no mostraron expresión de los marcadores CD68, CD163 y CD206, presentando únicamente tinción positiva para DAPI, debido a que son una población negativa para dichos marcadores.



**Figura 13. Control negativo de los anticuerpos secundarios utilizados para microscopía confocal.** Imágenes del cultivo celular incubado únicamente con anticuerpos secundarios conjugados a **A)** Alexa Fluor 488 y **B)** Alexa Fluor 647, junto

con tinción DAPI, sin la presencia de anticuerpos primarios. Se observa ausencia de unión inespecífica. Escala: 10um

La expresión de CD68 se localizó en el interior celular de las NLC, principalmente en el citoplasma, con una fuerte señal que a menudo se encuentra cerca del núcleo y en menor medida en la membrana plasmática (Fig. 14). Esto sugiere que el marcador se asocia con estructuras citoplasmáticas, posiblemente vesículas o compartimentos fagocíticos, que se agrupan en la región perinuclear. De forma consistente con estos hallazgos, estudios previos han demostrado que la proteína CD68 se localiza principalmente en endosomas y lisosomas, pero puede trasladarse rápidamente a la superficie celular (Chistiakov et al., 2017).

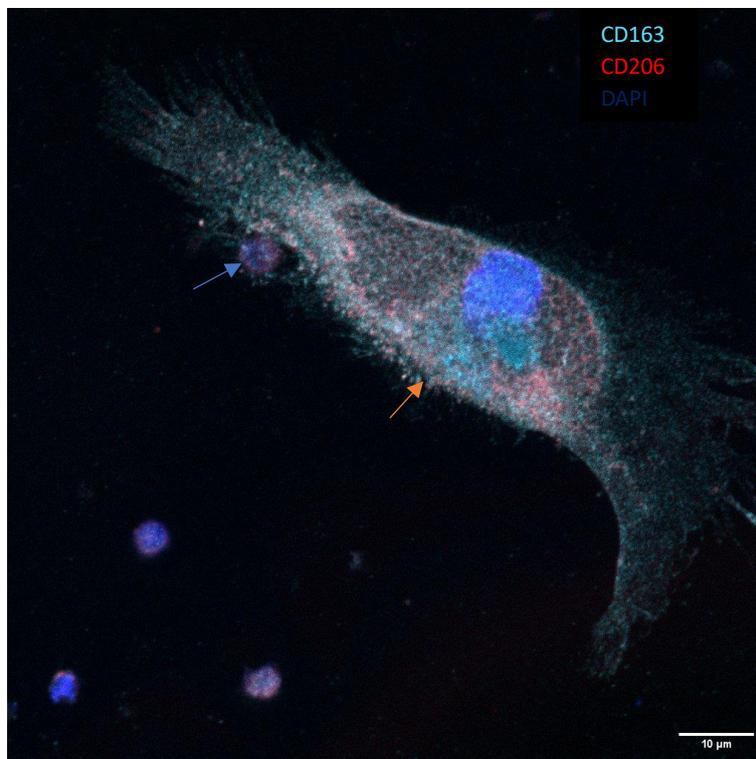


**Figura 14. Localización intracelular de CD68 y CD206 en las NLC.** Evaluación de la distribución de los marcadores CD68 (verde), CD206 (rojo) y DAPI (azul) en NLC mediante microscopía confocal. La ubicación de CD68 se observa en el citoplasma cercano al núcleo. La tinción nuclear con DAPI (azul) resalta la organización interna nuclear. Escala: 10um.

Por otro lado, la expresión de CD163 se observa de forma difusa en la membrana plasmática y también en el citoplasma de las NLC (Fig. 15) La presencia de este marcador revela la similitud de las NLC con los macrófagos tipo M2. Su localización en

el citoplasma revela su función fagocítica, ya que esta proteína está involucrada en la captura y procesamiento de complejos hemoglobina-haptoglobina, asociados con la eliminación de material intracelular (Fiorcari et al., 2021). Por lo tanto, se refuerza el rol de las NLC en la modulación de la inflamación y en la interacción con otras células dentro del microambiente tumoral.

En todos los casos la tinción con CD206, un marcador específico de macrófagos tipo M2, mostró una expresión localizada principalmente en la membrana de las NLC. Sin embargo, también se observa expresión difusa en el citoplasma. La presencia de este marcador refuerza la identificación de las NLC dentro del entorno tumoral.

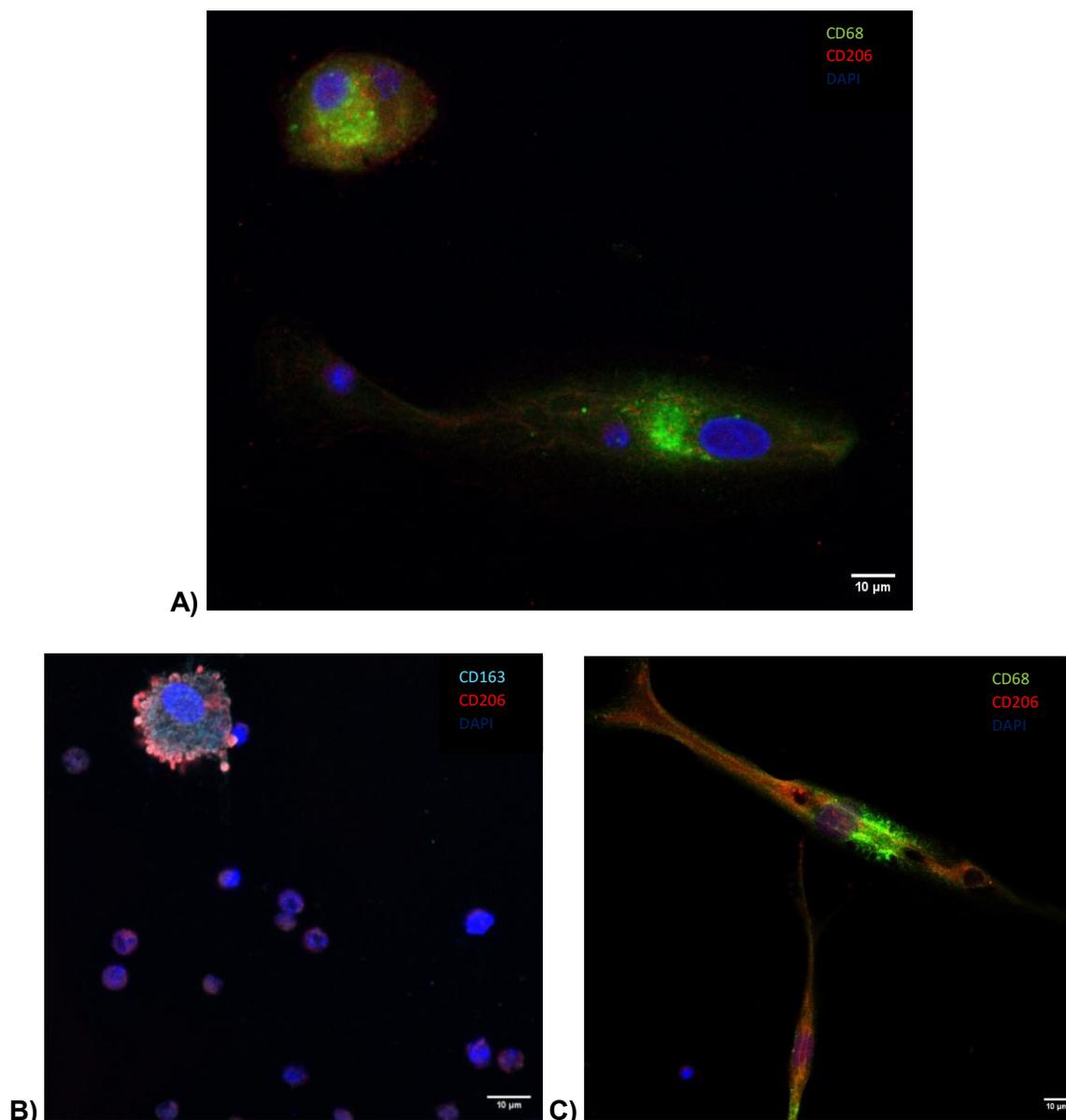


**Figura 15. Localización intracelular de CD163 y CD206 en las NLC.** Distribución de los marcadores CD163 (cya) y CD206 (rojo) en NLC mediante microscopía confocal. Se realizó tinción nuclear con DAPI (azul). La expresión de CD163 se observa en el citoplasma y membrana celular de las NLC (flecha naranja). Hay presencia de linfocitos B (flecha azul) próximos a la NLC. Escala: 10um

De forma complementaria a las observaciones previas realizadas en microscopía de campo claro, las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal confirmaron el pleomorfismo de las NLC (Fig. 16). Observándose células con variada morfología, desde

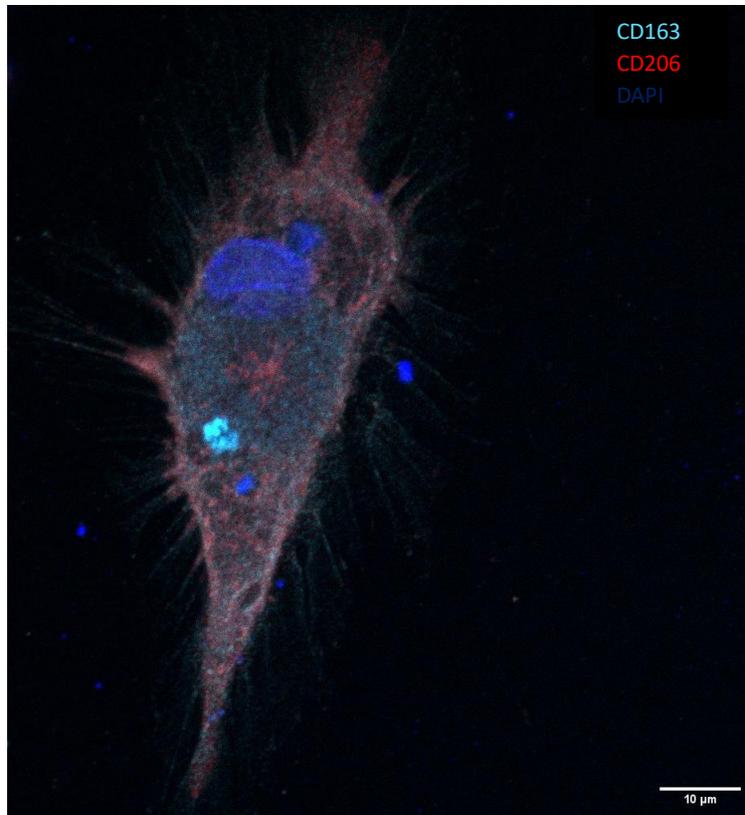
formas redondeadas hasta alargadas. Este resultado coincide con la descripción temprana de las NLC, con morfología ovalada (Burger et al. 2000) o redondeada (Tsukada et al. 2002).

Asimismo, se distingue la presencia de múltiples prolongaciones alargadas que se extienden radialmente desde el cuerpo celular de las NLC (Fig. 17). Las proyecciones varían tanto en forma como en longitud, algunas exhibieron proyecciones más largas y delgadas, mientras que otras presentaron proyecciones más cortas y gruesas, lo que sugiere diferentes configuraciones funcionales de las NLC.



**Figura 16. Morfología de las NLC observadas mediante microscopía confocal.** Presentación del pleomorfismo presente en las NLC a través de la expresión de los marcadores CD68 (verde), CD206 (rojo) y CD163 (cyan). **A)** Diferentes morfologías que

pueden adquirir las NLC: redondeada y alargada. **B)** NLC con de forma redondeada y gran tamaño. **C)** NLC con morfología alargada, mostrando una forma extendida. Escala: 10um



**Figura 17. Prolongaciones en la morfología de NLC.** Se observa la presencia de múltiples proyecciones alargadas que se extienden radialmente desde el cuerpo celular de las NLC. Escala: 10um

También se observa la ubicación de las células de LLC en estrecha proximidad con las NLC. Esta cercanía sugiere posibles interacciones entre ambas poblaciones celulares dentro del microambiente tumoral. Además, de esta forma las NLC podrían proporcionar un nicho protector para las células tumorales, tal como se ha descrito en estudios previos (ten Hacken & Burger, 2016).

En conclusión, las observaciones combinadas a partir del estudio fenotípico por microscopía óptica y microscopía de inmunofluorescencia confirmaron la presencia de NLC. Por tanto, la metodología puesta a punto en este trabajo permite un correcto desarrollo de NLC *in vitro* a partir de cultivos de CMSP de LLC, y su posterior detección.

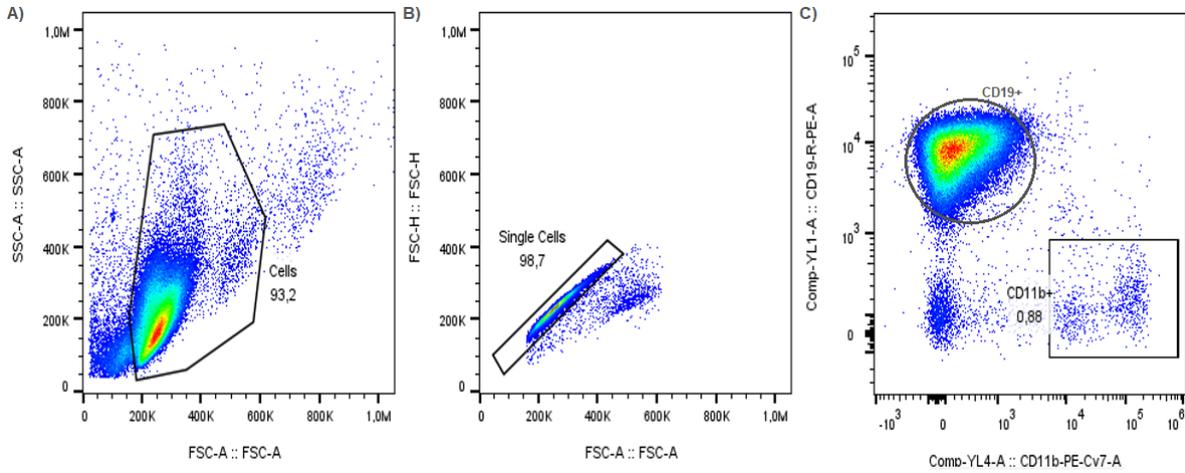
#### 4.4 Inmunofenotipaje de NLC mediante citometría de flujo.

En una segunda etapa, con el fin de obtener un resultado aún más robusto acerca del fenotipo de las células adherentes y su evolución, procedimos a examinar la expresión de los marcadores típicos de NLC mediante citometría de flujo. De esta forma, mediante la aplicación de estas técnicas complementarias, se buscó obtener una visión completa del inmunofenotipo de las células adherentes. En búsqueda de identificar las poblaciones celulares presentes en el cultivo se procedió al diseño de un panel de anticuerpos para citometría de flujo que contemplara los marcadores de NLC, así como los marcadores para el clon tumoral. Por lo tanto, las células fueron teñidas con los anticuerpos: anti-CD19, anti-CD11, anti-CD68, anti-CD163 y anti-CD206.

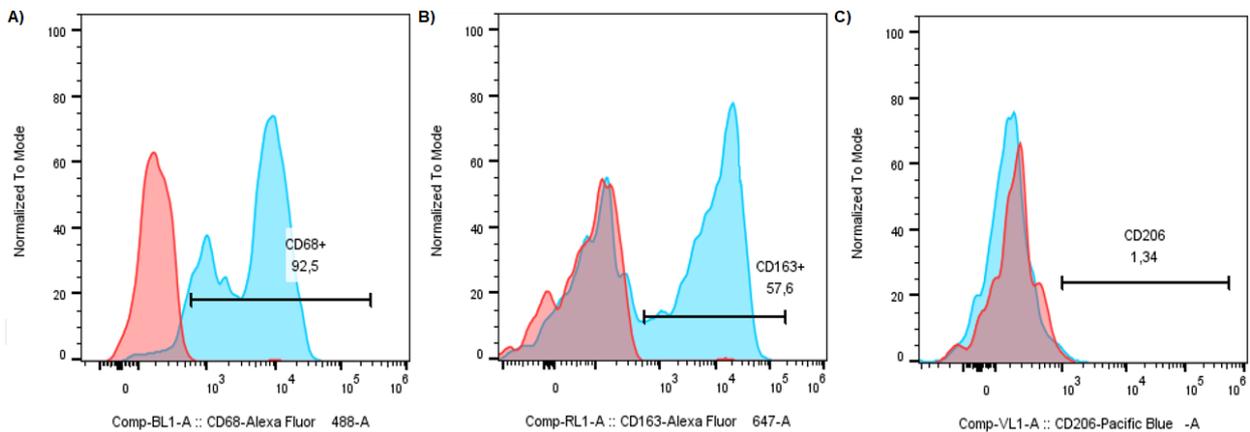
Al momento del cultivo celular de las CMSP se tomó una fracción de cada muestra para su análisis por citometría de flujo, de esta manera fue posible obtener el nivel de expresión inicial al día 0 del cultivo. En la Figura 18 se presenta la estrategia de gating utilizada para el análisis de los datos. Cabe resaltar que antes de comenzar el análisis se optimizó el proceso de adquisición de datos en base al estudio del parámetro tiempo vs SSC, asegurando que sea de calidad y no haya fluctuaciones en el flujo al momento de toma de muestra. En primer lugar, para el análisis se separó la población celular en función del tamaño y granularidad, excluyendo restos celulares (Fig. 18A). Luego, en dicha región se seleccionaron células individuales, descartando agregados celulares y dobletes (Fig. 18B). Para la diferenciación del clon tumoral de los monocitos (Fig. 18C) se utilizaron los anticuerpos anti-CD11b y anti-CD19, conjugados a PECy7 y PE, respectivamente. De esta forma se observa la población de células B (CD19+ CD11b-) características de la LLC, que representa la porción mayoritaria de las células (>90%) como era esperado. Por otro lado, se observa la población de monocitos (CD19- CD11b+) que se encuentran en muy baja proporción (<1%). A su vez para algunas muestras en esta selección se distinguen dos poblaciones indicando niveles diferenciales de expresión de CD11b.

Una vez seleccionada la población de monocitos se determinó el porcentaje de células que expresan los marcadores de NLC. Para identificar y determinar el porcentaje de células positivas se utilizó como referencia el control FMO, donde se marcaron las células con todos los anticuerpos menos el de interés a evaluar. En la Figura 19 se presentan los histogramas representativos de la expresión de los tres marcadores típicos de NLC en la población de monocitos. Al analizar el porcentaje de expresión de CD68 vemos que ya desde el inicio se observa un alto porcentaje (92,5%) de células marcadas con el anticuerpo. Si bien para CD163 el porcentaje de células que expresan

la proteína es menor, la expresión es significativa (57,6%). Por el contrario, la expresión de CD206 es realmente baja (1,34%) en la población de monocitos, a comparación de los marcadores anteriores.



**Figura 18. Estrategia de gating para los ensayos de expresión de los marcadores de NLC.** Presentación de un ejemplo representativo del análisis realizado en el software FlowJo para cada muestra. **A)** Dot plot de FSC-A vs SSC-A para la selección de células y exclusión de restos celulares. **B)** Dot plot de FSC-A y FSC-H, dentro de la región anterior, para excluir dobletes y seleccionar singuletes. **C)** Dot plot de CD11B y CD19, dentro de la región anterior, para seleccionar los monocitos y excluir el clon tumoral.

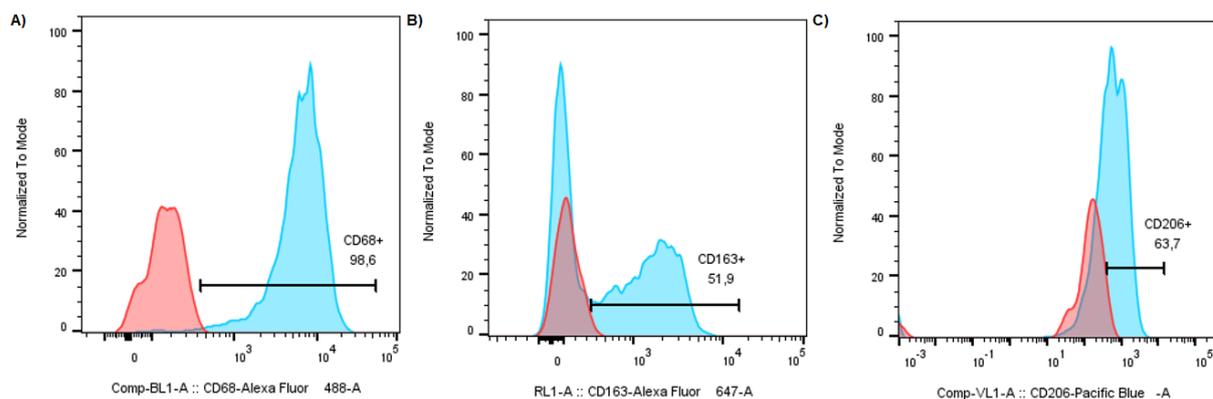


**Figura 19. Expresión de los marcadores de NLC en monocitos al inicio del cultivo de CMSP.** Histogramas representativos del análisis de los marcadores **A)** CD68, **B)** CD163 y **C)** CD206 presentes en monocitos el día 0. En azul se muestran los histogramas de las células marcadas. En rojo se muestran los controles FMO.

Transcurridos 14 días del cultivo de CMSP de LLC se procedió al análisis de la expresión de los marcadores característicos de NLC sobre las células adherentes obtenidas. Sin

embargo, realizar citometría de flujo con las NLC representó un desafío debido a su naturaleza adherente, lo que requirió un desprendimiento muy controlado de las células de la placa para evitar alteraciones en su integridad. Tras superar esta dificultad, como fue detallado anteriormente, me enfrenté a una nueva problemática relacionada con la dificultad para detectar las células en el diagrama de dispersión. Para ello se debió trabajar con valores de voltaje muy bajos para los parámetros SSC y FSC. Adicionalmente, en algunos casos el bajo nivel de formación de NLC dificultaba la ubicación de la población y por tanto la medición de la expresión de los marcadores. No menor, no todas las muestras cultivadas daban lugar a la obtención de NLC. En consecuencia, para obtener un resultado óptimo se debía formar un número alto de células adherentes. Por lo tanto, se requirió que la generación de cultivos celulares de CMSP sea de alta densidad celular. Esto implica un compromiso con el manejo extremadamente cuidadoso de las muestras, debido a su naturaleza clínica limitada.

Aplicando la estrategia de gating detallada previamente, se procedió al análisis de los marcadores característicos de NLC en las células adherentes (Fig. 20). El porcentaje de expresión de CD68 en la población de células CD11b+ se mantuvo en niveles elevados (>98%) después de 14 días de cultivo. Por otro lado, en el ejemplo presentado el porcentaje de células que expresan CD163 se mantuvo similar entre el día 0 y 14. En contraste, la expresión de CD206 mostró un aumento notable en la población analizada. La visualización de altos niveles de expresión de los marcadores CD68, CD163 y CD206 en las células adherentes implica que, tras 14 días de cultivo, los monocitos presentes en las CMSP de sangre periférica de pacientes con LLC se han diferenciado y mantenido su identidad fenotípica como NLC. La estabilidad en la expresión de CD68 y CD163, junto con el aumento de CD206, indica que las NLC continúan desempeñando funciones clave en el microambiente tumoral, tales como la modulación de la respuesta inmune, la promoción de un entorno antiinflamatorio y la interacción con las células tumorales en la LLC.

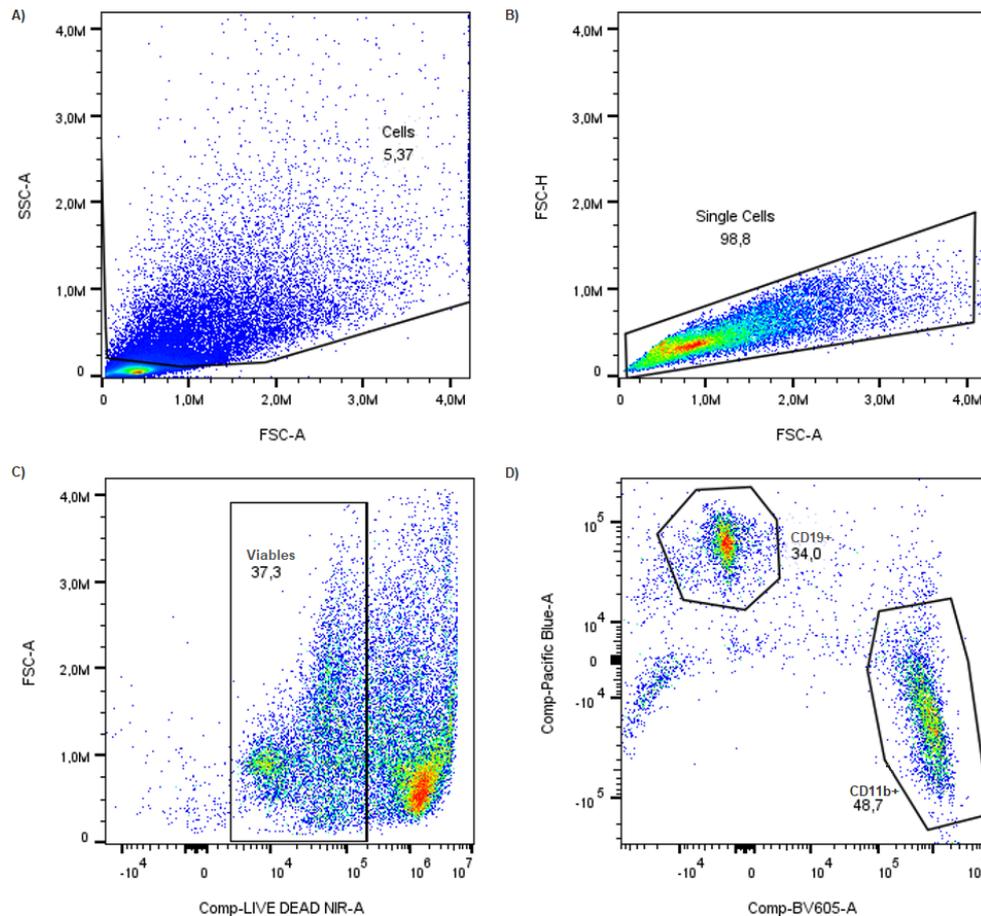


**Figura 20. Expresión de los marcadores de NLC en las células adherentes obtenidas.** Histogramas representativos del análisis de los marcadores **A) CD68, B) CD163 y C) CD206** presentes en las células adherentes obtenidas luego de 14 días del cultivo de CMSP. En azul se muestran los histogramas de las células marcadas. En rojo se muestran los controles FMO.

En búsqueda de una visión más abarcativa, se diseñó un nuevo panel de anticuerpos para citometría de flujo. Si bien se mantuvieron los marcadores clásicos, se modificaron los fluorocromos asociados a cada uno, lo que permitió utilizar un mayor número de anticuerpos en un solo ensayo. Esta estrategia facilitó la evaluación simultánea de múltiples parámetros sin interferencias entre las señales emitidas por los fluorocromos utilizados, garantizando una correcta separación y análisis de las señales en el equipo de citometría de flujo. Previo a su uso en la identificación se realizó la puesta a punto de los nuevos anticuerpos mediante su titulación.

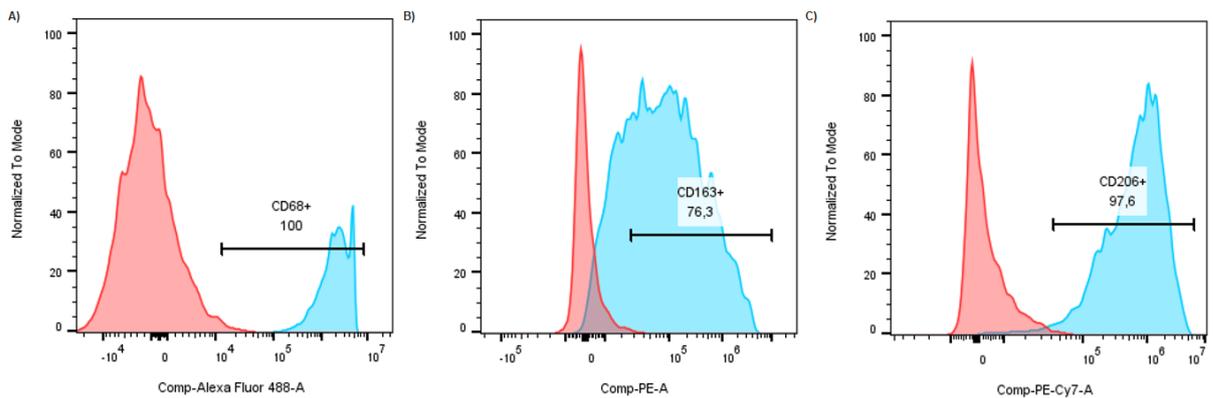
Adicionalmente, esta modificación posibilitó la incorporación del tercer objetivo de este trabajo al ensayo. El mismo consistió en evaluar la expresión de los marcadores inmunosupresores IDO y PDL-1 en la población de células adherentes. La elección de estos marcadores se basó en su relevancia en la actividad inmunosupresora de las NLC. IDO es una enzima clave en la vía del metabolismo del triptófano, y su expresión en las NLC está asociada con la inmunosupresión mediante la disminución de los niveles de triptófano en el microambiente tumoral, lo que inhibe la proliferación de linfocitos T y promueve un estado de tolerancia inmunológica (Lindström et al., 2020). Por su parte, PDL-1 es una molécula que interacciona con el receptor PD-1 en las células T, induciendo la anergia y la tolerancia en las células T activadas, favoreciendo la evasión inmunológica de las células tumorales (Böttcher et al., 2021). Ambos marcadores son fundamentales en la capacidad de las NLC para modular la respuesta inmune en el microambiente tumoral y promover la evasión de la vigilancia inmunológica.

Para el análisis, la estrategia de gating se mantuvo sin modificaciones, excepto por la adición del marcador NIR para la evaluación de la viabilidad celular. En la Figura 21 se presenta un ejemplo representativo de esta estrategia, correspondiente a la evaluación de una muestra el día 14 de cultivo. Se destaca la selección de la población de células adherentes CD11b+ y el incremento en su número (48%).

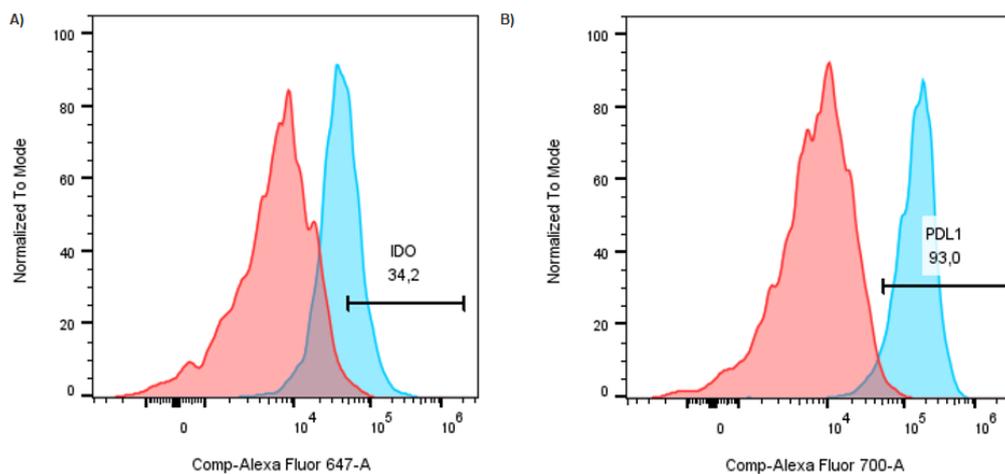


**Figura 21. Optimización de la estrategia de gating para la detección y caracterización de NLC.** Ejemplo representativo del análisis realizado en el software FlowJo para la caracterización de células adherentes, basado en el diseño de un nuevo panel de citometría de flujo. **A)** Dot plot de FSC-A vs SSC-A para la selección de células las células adherentes. **B)** Dot plot de FSC-A y FSC-H para seleccionar singuletes y excluir agregados celulares. **C)** Dot plot de NIR y FSC para la evaluación de la viabilidad celular. **D)** Dot plot de CD11B y CD19 para la selección de NLC y exclusión del clon tumoral. En todos los casos, la selección de cada población se realizó a partir del gate definido en el panel anterior.

Seguidamente, en la Figura 22, se muestra la expresión de los marcadores característicos de NLC, confirmando nuevamente su expresión en las células adherentes. El total de la población de células adherentes (100%) presenta expresión de CD68, y una alta proporción de la población presenta una expresión elevada de CD163 (76%) y CD206 (97%). En el caso de los marcadores inmunosupresores (Fig. 23), en la población de NLC la expresión de IDO no se presenta muy elevada (34%), mientras que la expresión de PDL-1 fue alta (93%), favoreciendo la evasión inmunológica, lo que es coherente con lo reportado en la bibliografía.



**Figura 22. Evaluación optimizada de los marcadores de NLC en la población de células adherentes.** Histogramas representativos obtenidos mediante el uso de un nuevo panel de anticuerpos, que permite el análisis de los marcadores **A) CD68**, **B) CD163** y **C) CD206** presentes en las células adherentes. En azul se muestran los histogramas de las células marcadas. En rojo se muestran los controles FMO.

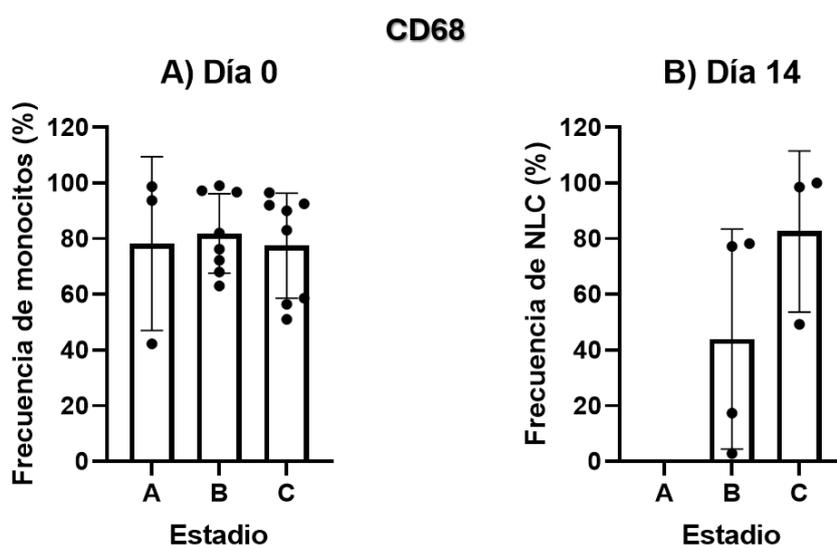


**Figura 23. Expresión de los marcadores inmunosupresores IDO y PDL-1 en NLC.** Histogramas representativos del análisis de los marcadores **A) IDO** y **B) PDL-1** en la población de NLC obtenidas luego de 14 días del cultivo de CMSP de pacientes con LLC. En azul se muestran los histogramas de las células marcadas. En rojo se muestran los controles FMO.

De forma general, podemos afirmar que el panel diseñado es correcto para la identificación de las NLC y permitirá el futuro desarrollo de investigaciones sobre la implicancia de esta población celular en el microambiente tumoral de la LLC.

Una vez presentado de manera representativa el análisis realizado para cada muestra se procederá a evaluar la expresión general de los marcadores CD68, CD163 y CD206

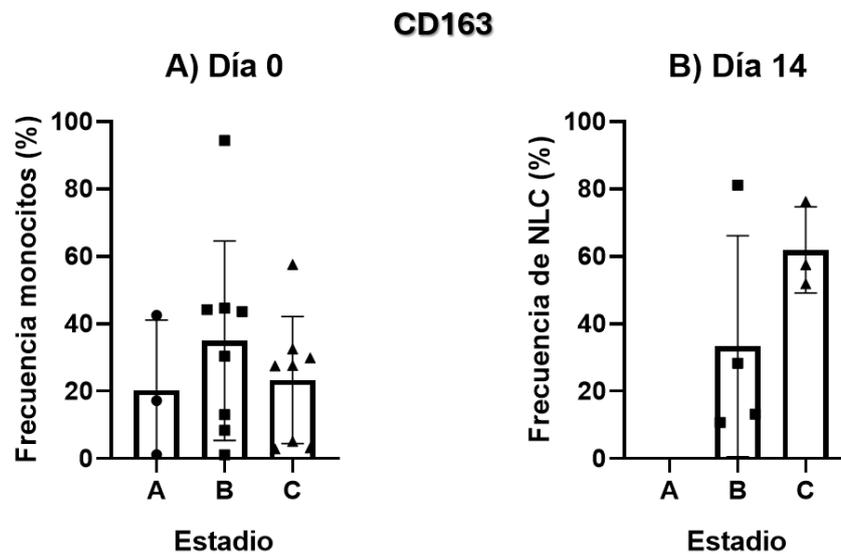
en la población celular CD11b+. Para ello, se compararán los datos obtenidos al inicio del cultivo con los obtenidos tras 14 días de cultivo en todas las muestras analizadas en este estudio. Se considerarán además características clínicas de los pacientes con LLC. La evaluación de estos marcadores se presenta en las Figuras 24-26, donde se muestra el porcentaje de células CD11b+ que expresan cada marcador, en base al estadio de LLC del paciente analizado. Cada figura incluye dos paneles: el panel A muestra la expresión en monocitos (día 0), mientras que el panel B muestra la expresión en NLC (día 14).



**Figura 24. Evaluación de la expresión de CD68 en la población celular CD11b+ al inicio y tras 14 días de cultivo de CMSP provenientes de pacientes en distintos estadios de LLC.** Gráficos de la expresión de CD68 en dos puntos temporales en células CD11b+ de pacientes en diversos estadios clínicos (A, B y C) de LLC. **A)** Expresión de CD68 en monocitos, al día 0 del cultivo. **B)** Expresión de CD68 en NLC, al día 14 del cultivo. Cada muestra está representada como un punto individual y la barra vertical indica el promedio de la frecuencia de células que expresan el marcador en cada estadio de LLC.

La evaluación de la expresión del marcador CD68 en monocitos provenientes de muestras de pacientes con diferentes perfiles clínicos muestra niveles similares, cercanos al 80%, al inicio del cultivo (Fig. 24). Esto puede sugerir que en esta fase inicial la expresión basal de CD68 en los monocitos no está influenciada por el estadio clínico. No obstante, al día 14 del cultivo, las respuestas entre los distintos estadios de LLC son diferentes entre sí. Por un lado, en el estadio A no se pudo realizar el análisis de este ni de otros marcadores, debido a la ausencia de NLC desarrolladas en el grupo. En el caso

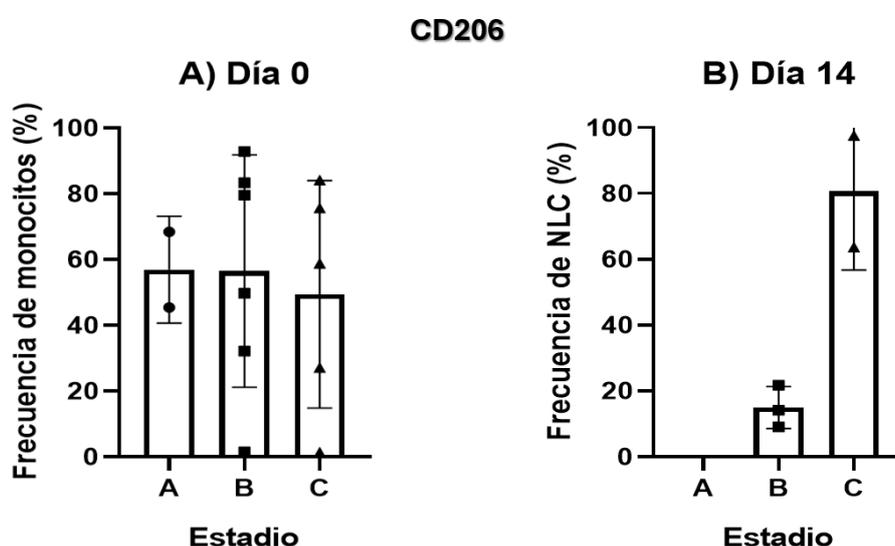
del estadio B, se observó una disminución en la expresión de CD68 en las NLC. Este descenso en la expresión sugiere un cambio en el microambiente tumoral y en la interacción entre las células. Por último, en el estadio C, la expresión de CD68 en las NLC se mantuvo constante a lo largo del cultivo. Ese patrón de estabilidad podría reflejar una característica de las NLC en estadios avanzados de LLC, donde las células en el microambiente son menos susceptibles a cambios. Considerando los niveles de expresión observados CD68 puede ser un potencial marcador para las NLC in vivo. De todas formas, la importancia biológica de la variación en la expresión de CD68 por las NLC aún no está clara y merece una mayor investigación.



**Figura 25. Evaluación de la expresión de CD163 en la población celular CD11b+ al inicio y tras 14 días de cultivo de CMSP provenientes de pacientes en distintos estadios de LLC.** Gráficos de la expresión de CD163 en dos puntos temporales en células CD11b+ de pacientes en diversos estadios (A, B y C) de LLC. **A)** Expresión de CD163 en monocitos, al día 0 del cultivo. **B)** Expresión de CD163 en NLC, al día 14 del cultivo. Cada muestra está representada como un punto individual y la barra vertical indica el promedio de la frecuencia de células que expresan el marcador en cada estadio de LLC.

La evaluación de la expresión de CD163 en monocitos mostró para cada estadio que menos de la mitad de la población celular expresa el marcador (Fig. 25). Sin embargo, la expresión se visualiza de forma heterogénea entre las muestras. Al día 14 del cultivo, se observaron diferencias en la expresión de CD163 entre los estadios clínicos de LLC. En el estadio B, la expresión promedio de CD163 se mantuvo estable y similar a la

observada al inicio del cultivo, indicando una estabilidad en el perfil fenotípico. Por otro lado, en el estadio C, se observó un aumento en la expresión de CD163 en las NLC. Este aumento es relevante, ya que CD163 es un marcador característico de macrófagos M2. A su vez, es coherente con la investigación donde se propone que CD163 es el marcador más confiable para las células NLC en comparación con el CD68 (Boissard et al. 2016). En el contexto de la LLC, un aumento en la población que expresa CD163 en el estadio C podría reflejar una mayor presencia de NLC, lo que sugiere que, en los estadios avanzados de la enfermedad las NLC pueden estar desempeñando un papel más pronunciado en la modulación del microambiente tumoral.

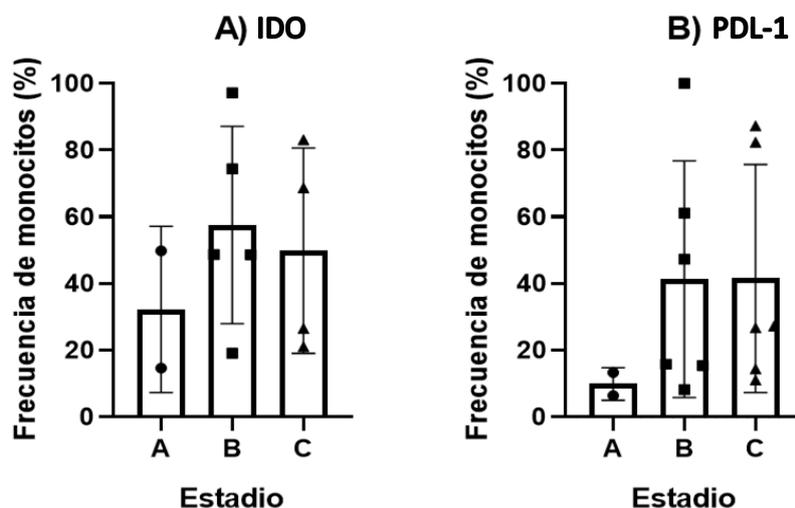


**Figura 26. Evaluación de la expresión de CD206 en la población celular CD11b+ al inicio y tras 14 días de cultivo de CMSP provenientes de pacientes en distintos estadios de LLC.** Gráficos de la expresión de CD206 en dos puntos temporales en células CD11b+ de pacientes en diversos estadios (A, B y C) de LLC. A) Expresión de CD206 en monocitos, al día 0 del cultivo. B) Expresión de CD206 en NLC, al día 14 del cultivo. Cada muestra está representada como un punto individual y la barra vertical indica el promedio de la frecuencia de células que expresan el marcador en cada estadio de LLC.

La evaluación de la expresión de CD206 en monocitos muestra que los niveles promedio de expresión fueron similares entre los tres estadios clínicos, aunque las muestras presentaron una distribución poco homogénea (Fig. 26). Esta variación entre las muestras puede reflejar diferencias individuales en la respuesta inmune o en la activación de las células derivadas de cada paciente. Al día 14 del cultivo, en el estadio B la expresión promedio de CD206 en las NLC es menor respecto al día 0. En contraste,

en el estadio C, la expresión de CD206 aumentó, lo que podría indicar una mayor presencia de estas células inmunosupresoras en el microambiente tumoral. Además, podría ser indicativo de una polarización de las células hacia un fenotipo M2 más pronunciado, lo que favorecería la progresión de la enfermedad al promover la tolerancia inmune y la remodelación del microambiente.

La evaluación de la expresión de los marcadores IDO y PDL-1 mostró que ambos marcadores presentan una distribución dispersa entre las diferentes muestras de pacientes (Fig. 27). Esta variabilidad en la expresión podría reflejar diferencias individuales en la activación celular o en el microambiente del paciente. En cuanto al promedio de expresión, para ambos casos en el estadio A la expresión fue más baja en comparación con otros estadios, lo que sugiere que las células podrían presentar una menor activación de las vías inmunosupresoras asociadas. Mientras tanto, para los estadios B y C se observa una mayor expresión de IDO y PDL-1 que podría sugerir una mayor activación de las vías inmunosupresoras y favorecer la evasión inmune del tumor y la tolerancia inmunológica descrita en los estadios clínicos más avanzados de la LLC. Esto podría ser explicado por la participación de exosomas derivados de células de LLC, que han sido descritos capaces de inducir un fenotipo supresor en monocitos y macrófagos, con elevados niveles de expresión de IDO y PD-L1 (Fiorcari et al., 2021; ten Hacken & Burger, 2016).



**Figura 27. Evaluación de la expresión de marcadores inmunosupresores en la población celular CD11b+ al cultivar CMSP provenientes de pacientes en distintos estadios de LLC.** Gráficos de la expresión de **A) IDO** y **B) PDL-1** en monocitos de SP a partir de la clasificación de las muestras según el estadio clínico del paciente. Cada

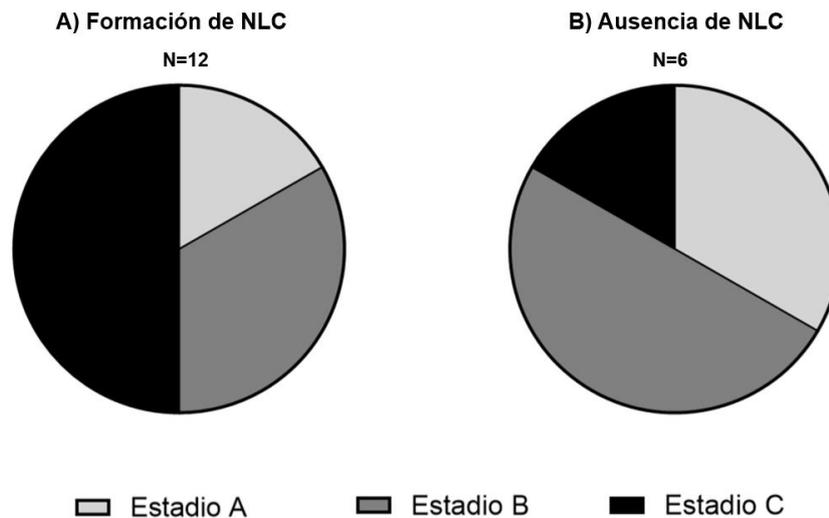
muestra está representada como un punto individual y la barra vertical indica el promedio de la frecuencia de células que expresan el marcador en cada estadio de LLC.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta sección de análisis sugieren que las *NLC* presentan una gran plasticidad fenotípica, lo que les permite modificar su perfil de expresión dependiendo del microambiente en el que se encuentren. Dicha variabilidad en la expresión refleja las diferencias en la maduración y en la activación de las células en función del entorno en el que se desarrollan (Zaaboub et al., 2022). Sin embargo, es necesario aumentar el número de muestras a analizar en cada estadio clínico para poder confirmar estos resultados, ya que no se pudo realizar un análisis estadístico. En suma, se destaca la importancia de comprender las características fenotípicas y funcionales de las *NLC* en los distintos estadios clínicos de la LLC, para poder identificar potenciales objetivos terapéuticos que modulen su influencia en el microambiente tumoral. Este enfoque, junto con un mayor tamaño de muestra, permitiría una evaluación más precisa y la validación de estos hallazgos.

#### **4.5 Asociación del desarrollo de las *NLC* con características clínicas de las muestras de los pacientes con LLC**

En esta sección se presenta el análisis del desarrollo diferencial de *NLC* a partir de CMSP provenientes de pacientes con LLC, tras el periodo de cultivo de 14 días. El objetivo es evaluar la capacidad de los monocitos para diferenciarse en *NLC* en función del estadio clínico de la enfermedad, y explorar posibles correlaciones entre el perfil de diferenciación celular y las características clínicas de los pacientes, descritas en el anexo.

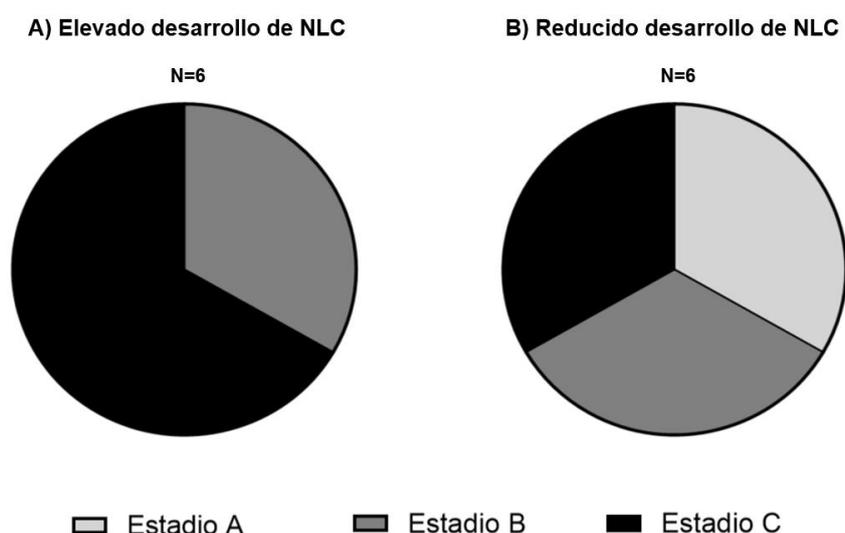
Los resultados presentados se basan en las observaciones realizadas mediante microscopía óptica de campo claro, lo que permitió examinar el desarrollo y la morfología de las *NLC*. Los resultados se ilustran en gráficos circulares proporcionan una visión general de la capacidad diferencial de los monocitos para diferenciarse en *NLC*, a su vez mostrando la influencia del estadio clínico en el desarrollo. En el primer gráfico (Fig. 28A) se representa la proporción de muestras que sí desarrollaron *NLC*, en base a cada estadio clínico. El segundo gráfico (Fig. 28B) ilustra en el mismo sentido la proporción de las muestras que no lograron formar *NLC* tras 14 días de cultivo.



**Figura 28. Capacidad de los monocitos de desarrollarse en NLC tras 14 días de cultivo, en base al estadio clínico del paciente.** Se presentan dos gráficos circulares subdivididos en los tres estadios clínicos de la LLC (A, B y C) que representan la capacidad de cada uno de desarrollar NLC. A) Formación de NLC para los distintos estadios en un total de 12 muestras analizadas. B) Ausencia de formación de NLC para los distintos estadios en un total de 6 muestras analizadas.

A partir de las muestras que lograron formar NLC, se realizó un análisis adicional presentado en la Figura 29. En el panel A se presenta la proporción de muestras de cada estadio que exhiben una alta capacidad de formación de NLC, mientras que el panel B muestra la proporción de muestras que lograron desarrollar NLC, pero de forma mínima.

Los resultados indican que la mayor cantidad de muestras que presentan la capacidad de formar NLC provienen de pacientes cursando un estadio C de la enfermedad. Dentro de este grupo, se observa una mayor proporción de muestras que no solo son formadoras de NLC, sino que también muestran una alta capacidad de diferenciación de estas células, obteniéndose un mayor número. En contraste, aquellas muestras pertenecientes al estadio B presentan una distribución más homogénea entre los grupos, con muestras tanto formadoras como no formadoras de NLC. Entre las muestras formadoras de NLC en este estadio, se aprecia una variabilidad en su capacidad de diferenciación, destacándose algunas con un elevado número de NLC y otras con un nivel más reducido de diferenciación. Finalmente, las muestras provenientes de pacientes cursando estadio A representan la menor proporción de muestras capaces de formar NLC, y en los casos que ocurre la formación, esta se caracteriza por un desarrollo limitado de NLC en todos los casos.



**Figura 29. Nivel del desarrollo de NLC en muestras formadoras de esta población, en base al estadio clínico del paciente.** Se presentan dos gráficos circulares subdivididos en los tres estadios clínicos de la LLC que muestran el nivel de desarrollo de NLC tras 14 días de cultivos en aquellas muestras formadoras de NLC. **A)** Elevado desarrollo de NLC para los distintos estadios en un total de 6 muestras. **B)** Reducido desarrollo de NLC para los distintos estadios en un total de 6 muestras

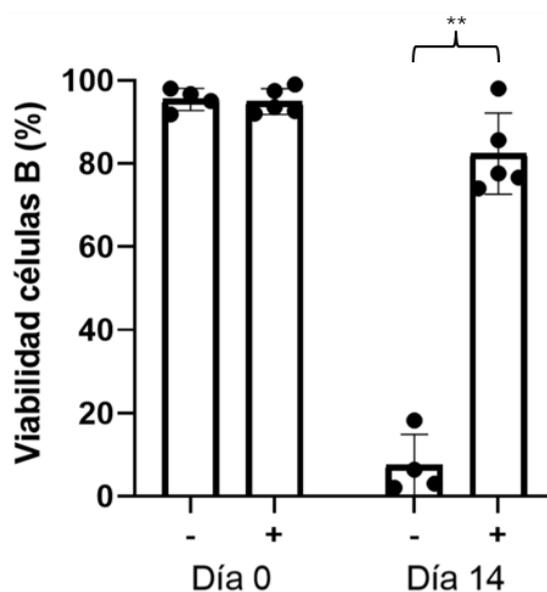
Estos hallazgos sugieren que la capacidad de los monocitos para diferenciarse en NLC está vinculada al estadio clínico de la LLC, lo cual podría reflejar la influencia del microambiente tumoral en la funcionalidad de las células del sistema inmunológico. Además, la variabilidad observada en la formación y desarrollo de NLC en los distintos estadios puede tener implicaciones relevantes para entender el papel de estas células en la patogénesis de la LLC y su posible contribución a la progresión de la enfermedad.

#### 4.6 Efecto del desarrollo de NLC en la viabilidad del clon tumoral.

La viabilidad celular es un parámetro fundamental para evaluar el comportamiento y la respuesta de las células tumorales en cultivos in vitro. Por esta razón, se consideró relevante realizar un análisis de la viabilidad de las células B tumorales provenientes de pacientes con LLC al inicio del cultivo y transcurridos 14 días, tras la formación de NLC. Para ello, mediante citometría de flujo se evaluó la viabilidad del clon tumoral en ambos puntos temporales. El análisis se hizo con el software FlowJo, siguiendo una estrategia de gating similar a la presentada previamente, identificando la población de células B de

LLC mediante la evaluación de CD19 y CD11b. Y, dentro de la población seleccionada, medir la viabilidad analizando el parámetro Zombie Violet o NIR y SSC.

Los resultados muestran que, en el inicio del cultivo, todas las muestras analizadas presentaban una viabilidad de células B elevada, superior al 90%. Sin embargo, una vez transcurridos 14 días del cultivo de CMSP, se observó una diferencia significativa en la viabilidad celular según la presencia o ausencia de NLC en el cultivo (Fig. 30). Las muestras que no desarrollaron NLC presentaron una disminución notoria en su viabilidad respecto al inicio del ensayo, alcanzando una viabilidad menor al 20% en la población de células B. Aquellas muestras que sí formaron NLC mantuvieron una viabilidad sorprendentemente alta (>70%) transcurridos 14 días. Este comportamiento en la viabilidad de la población presentó una variación estadísticamente significativa. Este hecho sugiere que el desarrollo de NLC tiene un efecto protector sobre las células B tumorales en el microambiente de la LLC. El resultado respalda lo reportado en artículos anteriores, donde se vio el efecto protector de las NLC en co-cultivo con células de LLC en la apoptosis espontánea (J. A. Burger et al., 2000).



**Figura 30. Efecto de las NLC en la viabilidad de las células B tumorales.** Análisis de la viabilidad de las células de LLC al inicio del cultivo de CMSP (Día 0) y después de 14 días (Día 14) mediante citometría de flujo. Las muestras se agruparon según el nivel de desarrollo de NLC, siendo formadoras (+) o no formadoras (-) de NLC. Análisis estadístico con prueba t de Student ( $p=0,0022$  \*\*) indica diferencia significativa entre la viabilidad de las muestras que desarrollaron NLC al día 14 y las que no.

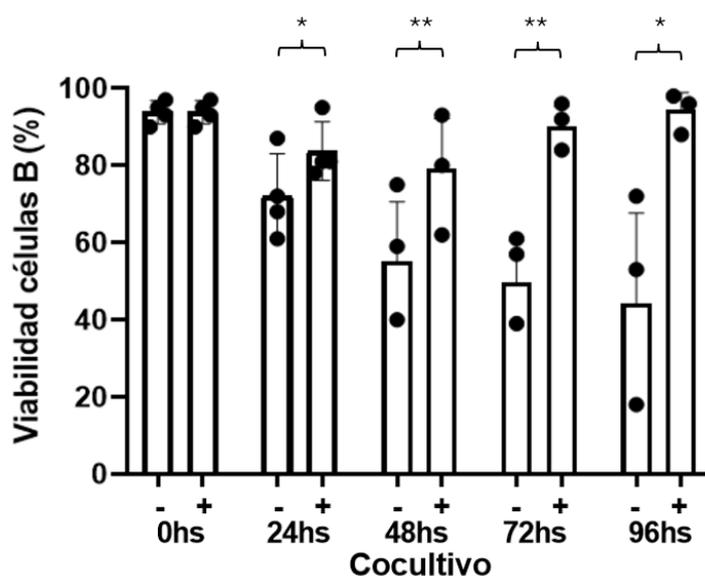
Este hallazgo resalta la importancia de las NLC, no solo como un componente clave del microambiente tumoral, sino también como moduladoras de la supervivencia celular en la LLC. Las NLC, conocidas por su capacidad para interactuar estrechamente con las células tumorales, parecen ofrecer un entorno que favorece la viabilidad de las células B leucémicas. Estos resultados abren nuevas posibilidades para el desarrollo de terapias dirigidas a interrumpir la interacción entre las NLC y las células B tumorales, lo que podría mejorar las respuestas terapéuticas en pacientes con LLC, especialmente en aquellos que presenten un estadio avanzado de la enfermedad. De hecho, estudios previos informaron sobre la correlación entre el número de NLC y el resultado clínico de la enfermedad, produciéndose un recuento de NLC mayor en aquellos pacientes con una supervivencia más corta. Por lo tanto, la manipulación de las NLC o sus mecanismos de acción podría convertirse en una estrategia innovadora en el tratamiento de la LLC.

#### **4.7 Uso de un modelo de línea celular para imitar los efectos protectores de las NLC sobre las células B leucémicas.**

La interacción entre las células tumorales y el microambiente celular es un factor determinante en la supervivencia de las células leucémicas. Como fue presentado anteriormente, las NLC han demostrado ejercer un efecto protector sobre las células tumorales, constituyendo un componente relevante de este microambiente. Sin embargo, pese a la optimización de la metodología realizada en este trabajo, la técnica para la obtención de NLC in vitro continúa siendo compleja, limitando el estudio de las NLC y la comprensión de su rol en la biología de la LLC. Por un lado, se presentó variabilidad en la cantidad de células de NLC generadas a partir de las muestras. Esto, sumado a la dependencia de muestras de sangre de LLC y el mantenimiento prolongado de los cultivos celulares, fomentaron la búsqueda de un modelo de línea celular de NLC para realizar experimentos de manera más eficiente y consistente. En este contexto, se optó por el uso de células THP-1 diferenciadas a macrófagos como un modelo celular que pudiera simular algunas de las características funcionales de las NLC. Este enfoque tiene como objetivo proporcionar un modelo experimental más accesible para el estudio de la interacción entre las células tumorales y las células del microambiente.

Para evaluar el impacto del uso de células THP-1 primero se debió realizar su diferenciación a macrófagos. Se evaluó la expresión de los marcadores CD68 y CD163, aplicando la misma estrategia que anteriormente, para comprobar el desarrollo de la población hacia un fenotipo similar a NLC mediante citometría de flujo (Figura I-Anexo).

El perfil de expresión fue consistente con lo reportado previamente para la línea celular diferenciada (Aldo et al. 2013). Para el análisis de la viabilidad de las células de LLC, se cultivaron CMSP tanto en su cultivo independiente como en co-cultivo con células THP1 diferenciadas a macrófagos. A lo largo de un periodo de 4 días, se realizaron mediciones diarias de la viabilidad celular para ambas condiciones mediante citometría de flujo.



**Figura 31. Efecto del modelo celular THP-1 en la viabilidad de las células de LLC.**

Análisis de la viabilidad de las células de LLC cultivadas de forma independiente (-) o en co-cultivo (+) con células THP-1 diferenciadas a macrófagos. Se evaluó una fracción de los cultivos cada 24hs durante 4 días. A partir de las 24hs ya hay diferencia significativa en la viabilidad de las células B entre las muestras en co-cultivo y aquellas cultivadas independientemente. Análisis estadístico con prueba t de Student para muestras pareadas. 24hs  $p=0,0327$  (\*), 48hs  $p=0,0078$  (\*\*), 72hs  $p=0,0062$  (\*\*), 96hs  $p=0,0248$  (\*).

Los resultados obtenidos evidenciaron que las células B cultivadas solas presentaron una disminución progresiva de su viabilidad durante el periodo de cultivo (Fig. 31). En cambio, las células B en co-cultivo con THP-1 diferenciadas a macrófagos mantuvieron una viabilidad más alta durante todo el ensayo. A partir de las 24hs ya es notoria la diferencia en la viabilidad de las células B entre las muestras en co-cultivo y aquellas cultivadas independientemente. Particularmente en el co-cultivo, si bien el nivel se mantuvo elevado, el promedio de viabilidad menor se dio a las 48hs, presentando luego un aumento en los días posteriores. Este hallazgo sugiere que, las células THP-1 diferenciadas a macrófagos podrían simular algunos de los efectos protectores de las NLC sobre las células tumorales, aportando a su supervivencia.

En conjunto, este ensayo proporciona un modelo experimental viable para investigar las interacciones entre las células B leucémicas y el microambiente de las NLC, abriendo nuevas posibilidades para el estudio de estrategias terapéuticas que modulen estas interacciones y mejoren el tratamiento de la LLC. El uso de macrófagos diferenciados podría facilitar futuros estudios sobre las NLC, permitiendo un análisis más accesible y reproducible de su impacto en la biología de la LLC (Riddy et al., 2018). Las líneas celulares son herramientas clave para la investigación biomédica, y en el marco de este proyecto, la línea celular THP-1 resultó adecuada para representar el rol de las NLC en el microambiente tumoral.

## V. Conclusiones y Perspectivas

En el presente estudio, se logró confirmar y expandir un hallazgo previo sobre el desarrollo de células nurse-like a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LLC, bajo condiciones de cultivo estándar. La optimización de la metodología para su obtención me permitió determinar una densidad celular óptima para el desarrollo de las NLC, establecida en  $20 \times 10^6$  células. Adicionalmente, pude establecer técnicas para el mantenimiento del cultivo y el posterior aislamiento de las NLC, de forma que se convierta en un protocolo reproducible para la generación de NLC.

Respecto al desarrollo de NLC detecté una amplia variación entre las muestras de CMSP provenientes de pacientes con LLC, tanto en términos de la cinética como en la magnitud de las células generadas. Esta variabilidad podría reflejar la heterogeneidad inherente de la LLC, y tiene implicaciones relevantes para la comprensión de las interacciones entre las NLC y las células de LLC en el microambiente tumoral.

En cuanto a las características fenotípicas y biológicas de las células adherentes, pude confirmar la expresión de marcadores como CD68, CD163 y CD206 en la población, permitiendo su identificación como NLC mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Adicionalmente, se observó el pleomorfismo que presentan las NLC, con una morfología que incluía formas ovaladas agrandadas y redondeadas, lo que destaca el proceso cambiante de su desarrollo y diferenciación.

Este trabajo también demostró que las NLC tienen un efecto pro-supervivencia sobre las células de LLC, lo que sugiere su rol en la evasión de la apoptosis dentro del microambiente tumoral. Este efecto fue corroborado mediante la medición de la viabilidad en las células B en dos momentos temporales y su correlación con el número de NLC. No obstante, para entender a fondo cómo se da la comunicación entre estas poblaciones a nivel de la expresión génica y otros mecanismos moleculares, se requiere realizar estudios adicionales.

Con el objetivo de avanzar a futuro en la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la interacción entre NLC y células de LLC, confirmé que la línea celular THP-1, una vez diferenciada, puede ser utilizada como un modelo adecuado para imitar los efectos pro-supervivencia de las NLC. De esta forma, las dificultades respecto al complejo manejo de las NLC sería superado en una primera aproximación, permitiendo la realización de un mayor número de investigaciones sobre la biología de esta población y su rol en la LLC.

En conclusión, este trabajo ha establecido una metodología robusta y reproducible para la obtención de NLC, así como para su identificación fenotípica mediante diversas técnicas. Este hecho permitirá en estudios futuros mejorar el entendimiento de las interacciones celulares que ocurren en el microambiente tumoral, particularmente entre NLC y células B tumorales, proporcionando nuevos insights sobre la biología del cáncer. Adicionalmente, la relevancia del rol de las NLC en el microambiente tumoral y el efecto pro-supervivencia sobre las células de LLC abre nuevas posibilidades para el diseño de estrategias terapéuticas que modulen estas interacciones y mejoren el tratamiento de la LLC. En este sentido, es de gran interés profundizar en los mecanismos que inducen la diferenciación de las NLC, ya que comprender estos factores podría permitir la modulación de su participación en el microambiente tumoral, lo cual sería clave para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

## VI. Referencias Bibliográficas

- Aitken, M. J. L., Lee, H. J., & Post, S. M. (2019). Emerging treatment options for patients with p53-pathway-deficient CLL. *Therapeutic Advances in Hematology*, *10*, 1-18. <https://doi.org/10.1177/2040620719891356>
- American Cancer Society. (2024). *Acerca de la leucemia linfocítica crónica*. <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-cronica/acerca/estadisticas-clave.html>
- Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M. T., Monconduit, M., Eelabbes, S., & Gremy, F. (1981). A New Prognostic Classification of Chronic Lymphocytic Leukemia Derived from a Multivariate Survival Analysis. *Cancer*, *48*(1), 198-206.
- Boross, P., & Leusen, J. H. W. (2012). Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res*, *2*(6), 676-690. [www.ajcr.us/ISSN:2156-6976/ajcr0000150](http://www.ajcr.us/ISSN:2156-6976/ajcr0000150)
- Böttcher, M., Bruns, H., Völkl, S., Lu, J., Chartomatsidou, E., Papakonstantinou, N., Mentz, K., Büttner-Herold, M., Zenz, T., Herling, M., Huber, W., Ghia, P., Stamatopoulos, K., Mackensen, A., & Mougiakakos, D. (2021). Control of PD-L1 expression in CLL-cells by stromal triggering of the Notch-c-Myc-EZH2 oncogenic signaling axis. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *9*. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001889>
- Braga, T. V., Evangelista, F. C. G., Santiago, M. G., Ferrão, A. L. M., de Almeida, T. D., Barbosa, B. L. da F., Araujo, S. S. da S., Ribeiro, G. N., Carvalho, M. D. G., & Sabino, A. de P. (2022). Evaluation of miR-15a, miR-16-1, ZAP-70, Ang-2, and Bcl-2 as potential prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *58*. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e19332>
- Burger, J. A. (2011). Nurture versus Nature: The Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology American Society of Hematology Education Program*, 96-103.
- Burger, J. A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N. J., Dell'aquila, M., & Kipps, T. J. (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, *96*(8), 2655-2663.
- Burger, M., Hartmann, T., Krome, M., Rawluk, J., Tamamura, H., Fujii, N., Kipps, T. J., & Burger, J. A. (2005). Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, *106*(5), 1824-1830. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4918>
- Caligaris-Cappio, F., & Hamblin, T. J. (1999). B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: A Bird of a Different Feather. *Journal of Clinical Oncology*, *17*, 399-408.
- Campo, E., Cymbalista, F., Ghia, P., Jäger, U., Pospisilova, S., Rosenquist, R., Schuh, A., & Stilgenbauer, S. (2018). TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: An overview of the clinical implications of improved diagnostics. En *Haematologica* (Vol. 103, Número 12, pp. 1956-1968). Ferrata Storti Foundation. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.187583>

- Cerreto, M., Foà, R., & Natoni, A. (2023). The Role of the Microenvironment and Cell Adhesion Molecules in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers*, *15*(5160), 1-24. <https://doi.org/10.3390/cancers15215160>
- Charalambous, A., Schwarzbich, M. A., & Witzens-Harig, M. (2018). Ibrutinib. En *Recent Results in Cancer Research* (Vol. 212, pp. 133-168). Springer Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8_7)
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Rai, K. R., Grever, M. R., Kay, N. E., Schiffer, C. A., Oken, M. M., Keating, M. J., Boldt, D. H., Kempin, S. J., & Foon, K. A. (1988). Guidelines for Clinical Protocols for Chronic Lymphocytic Leukemia: Recommendations of the National Cancer Institute-Sponsored Working Group. *American Journal of Hematology*, *29*, 152-163.
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1999). Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, *94*(6), 1840-1847.
- Deaglio, S., Vaisitti, T., Billington, R., Bergui, L., Omede', P., Genazzani, A. A., & Malavasi, F. (2007). CD38/CD19: a lipid raft-dependent signaling complex in human B cells. *Blood*, *109*(12). <https://doi.org/10.1182/blood>
- Dighiero, G. (2003). Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia*, *17*, 2385-2391. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403154>
- Dighiero, G., & Hamblin, T. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia. En *The Lancet* (Vol. 371, pp. 1017-1029). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60456-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60456-0)
- Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K., Bentz, M., & Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *TheNewEnglandJournalofMedicine*, 1910-1916.
- Dondi, E., & Varin-Blank, N. (2022). The strange case of nurse cells: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, *1*(1), 48-58. <https://hal.science/hal-04024065>
- Dubois, N., Crompton, E., Meuleman, N., Bron, D., Lagneaux, L., & Stamatopoulos, B. (2020). Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the Stromal Microenvironment: Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. En *Frontiers in Oncology* (Vol. 10, Numéro 1422). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01422>
- Eichhorst, B., Hallek, M., & Dreyling, M. (2008). Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *19*(2), 60-62. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn090>
- Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Hillmen, P., Hallek, M., & Buske, C. (2015). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *26*(5), 78-84. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv303>

- Filip, A. A., Ciseł, B., & Wąsik-Szczepanek, E. (2015). Guilty bystanders: nurse-like cells as a model of microenvironmental support for leukemic lymphocytes. *Clinical and Experimental Medicine*, 15, 73-83. <https://doi.org/10.1007/s10238-013-0268-z>
- Fiorcari, S., Maffei, R., Atene, C. G., Potenza, L., Luppi, M., & Marasca, R. (2021). Nurse-like cells and chronic lymphocytic leukemia b cells: A mutualistic crosstalk inside tissue microenvironments. *Cells*, 10(217), 1-12. <https://doi.org/10.3390/cells10020217>
- Fiorcari, S., Maffei, R., Audrito, V., Martinelli, S., Ten Hacken, E., Zucchini, P., Grisendi, G., Potenza, L., Luppi, M., Burger, J. A., Deaglio, S., & Marasca, R. (2016). Ibrutinib modifies the function of monocyte/macrophage population in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, 7(40), 65968-65981. [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
- Fürstenau, M., Hallek, M., & Eichhorst, B. (2019). Sequential and combination treatments with novel agents in chronic lymphocytic leukemia. En *Haematologica* (Vol. 104, Número 11, pp. 2144-2154). Ferrata Storti Foundation. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.208603>
- Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 12, Número 4, pp. 253-268). <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Gandhi, V., & Balakrishnan, K. (2012). CCL2 in chronic lymphocytic leukemia: A macro in microenvironment? *Leukemia and Lymphoma*, 53(10), 1849-1850. <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.688966>
- Gentile, M., Shanafelt, T. D., Rossi, D., Laurenti, L., Mauro, F. R., Molica, S., Cutrona, G., Uccello, G., Campanelli, M., Vigna, E., Tripepi, G., Chaffee, K. G., Parikh, S. A., Bossio, S., Recchia, A. G., Innocenti, I., Pasquale, R., Neri, A., Ferrarini, M., ... Morabito, F. (2016). Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index in newly diagnosed patients. *Blood*, 128(16), 1090-1095. <https://doi.org/10.1002/ajh.24493>
- Ghia, P., Ferreri, A. J. M., & Galigaris-Cappio, F. (2007). Chronic lymphocytic leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 64(3), 234-246. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.04.008>
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Dohner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K. R., Byrd, J. C., Eichhorst, B., O'Brien Susan, Robak, T., Seymour, J. F., & Kipps, T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131(25), 2745-2760.
- Hallek, M., Wanders, L., Ostwald, M., Busch, R., Senekowitsch, R., Stern, S., Schick, H. D., Kuhn-Hallek, I., & Emmerich, B. (1996). Serum  $\beta$ 2-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leukemia & Lymphoma*, 22(5-6), 439-447. <https://doi.org/10.3109/10428199609054782>
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., & Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V H Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 94(6), 1848-1854.

- Hanna, B. S., Öztürk, S., & Seiffert, M. (2019). Beyond bystanders: Myeloid cells in chronic lymphocytic leukemia. *Molecular Immunology*, *110*, 77-87.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.11.014>
- Herishanu, Y., Katz, B. Z., Lipsky, A., & Wiestner, A. (2013). Biology of Chronic Lymphocytic Leukemia in Different Microenvironments. Clinical and Therapeutic Implications. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *27*(2), 173-206.  
<https://doi.org/10.1016/j.hoc.2013.01.002>
- Jia, L., Clear, A., Liu, F.-T., Matthews, J., Uddin, N., Mccarthy, A., Hoxha, E., Durance, C., Iqbal, S., & Gribben, J. G. (2014). Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *123*(11), 1709-1719.  
<https://doi.org/10.1182/blood>
- Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., O'Brien, S., Gribben, J., & Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.96>
- Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G., & Dalla-Favera, R. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*, *17*(1), 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.019>
- Korubo, K. I., Uchekukwu, ;, Okite, P., & Ezeugwu, S. I. (2021). *Chronic Lymphocytic Leukemia: Prognostic Factors at Presentation in a Resource-Limited Center*.  
<https://doi.org/10.1200/GO.20>
- Kurtova, A. V, Balakrishnan, K., Chen, R., Ding, W., Schnabl, S., Quiroga, M. P., Sivina, M., Wierda, W. G., Estrov, Z., Keating, M. J., Shehata, M., Jä, U., Gandhi, V., Kay, N. E., Plunkett, W., & Burger, J. A. (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*, 4441-4450.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-07>
- Lewis, C. E., & Pollard, J. W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. En *Cancer Research* (Vol. 66, Número 2, pp. 605-612).  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4005>
- Lindström, V., Aittoniemi, J., Jylhävä, J., Eklund, C., Hurme, M., Paavonen, T., Oja, S. S., Itälä-Remes, M., & Sinisalo, M. (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and expression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, *12*(5), 363–365. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2012.06.001>
- Lucas, F., Larkin, K., Gregory, C. T., Orwick, S., Doong, T.-J., Lozanski, A., Lozanski, G., Misra, S., Ngankeu, A., Ozer, H. G., Sampath, D., Thangavadivel, S., Yilmaz, S. A., Rogers, K. A., Byrd, J. C., Woyach, J. A., & Blachly, J. S. (2020). Letter to Blood Novel BCL2 mutations in venetoclax-resistant, ibrutinib-resistant CLL patients with BTK/PLCG2 mutations. *Blood*, *135*(24), 2192-2195. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/135/24/2192/1744058/bloodbld2019003722.pdf>

- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., & Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. En *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 14, Número 7, pp. 399-416). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.217>
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *TRENDS in Immunology*, 23(11), 549-555. [http://immunology.trends.com/1471-4906/02/\\$-seefrontmatter](http://immunology.trends.com/1471-4906/02/$-seefrontmatter)
- Markham, A. (2014). Idelalisib: First global approval. *Drugs*, 74(14), 1701-1707. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0285-6>
- Mesaros, O., Jimbu, L., Neaga, A., Popescu, C., Berceanu, I., Tomuleasa, C., Fetica, B., & Zdrenghea, M. (2020). Macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia: Nurse-like cells are the caretakers of leukemic cells. *Biomedicines*, 8(516), 1-17. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8110516>
- Messmer, B. T., Messmer, D., Allen, S. L., Kolitz, J. E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E. J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R. N., Wasil, T., Rai, K. R., Hellerstein, M. K., & Chiorazzi, N. (2005). In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 755-764. <https://doi.org/10.1172/jci200523409>
- Mohammad, I. S., Lin, K., Oates, M., Khan, U. T., Burger, J., Pettitt, A. R., & Zhuang, J. (2021). Development of a cell-line model to mimic the pro-survival effect of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 62(1), 45-57. <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1811274>
- Moreno, C. (2020). Standard treatment approaches for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia after frontline chemoimmunotherapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Progra*, 2020, 33-40. <http://ashpublications.org/hematology/article-pdf/2020/1/33/1794769/hem2020000086c.pdf>
- Nabhan, C., Aschebrook-Kilfoy, B., Chiu, B. C. H., Smith, S. M., Shanafelt, T. D., Evens, A. M., & Kay, N. E. (2014). The impact of race, ethnicity, age and sex on clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis in the modern era. *Leukemia and Lymphoma*, 55(12), 2778-2784. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.898758>
- Nakhoda, S., Vistarop, A., & Wang, Y. L. (2023). Resistance to BTK inhibition in CLL and non-Hodgkin lymphoma. En *British Journal of Haematology* (Vol. 200, Número 2, pp. 137-149). <https://doi.org/10.1111/bjh.18418>
- Paget, S. (1889). DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet*, 133(3421), 571-573.
- Pekarsky, Y., & Croce, C. M. (2015). Role of miR-15/16 in CLL. En *Cell Death and Differentiation* (Vol. 22, Número 1, pp. 6-11). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.87>
- Piggin, A., Bayly, E., & Tam, C. S. (2017). Novel agents versus chemotherapy as frontline treatment of CLL. *Leukemia and Lymphoma*, 58(6), 1320-1324. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1280606>

- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, *46*(2), 219-234.
- Rawstron, A. C., Kreuzer, K. A., Soosapilla, A., Spacek, M., Stehlikova, O., Gambell, P., McIver-Brown, N., Villamor, N., Psarra, K., Arroz, M., Milani, R., de la Serna, J., Cedena, M. T., Jaksic, O., Nomdedeu, J., Moreno, C., Rigolin, G. M., Cuneo, A., Johansen, P., ... Montserrat, E. (2018). Reproducible Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemia by Flow Cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *94B*, 121-128. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21595>
- Robak, T. (2005). Therapy of Chronic Lymphocytic Leukaemia with Purine Nucleoside Analogues: Facts and Controversies. *Drugs Aging*, *22*(12), 983-1012.
- Rozman, C., & Montserrat, E. (1995). Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal Of Medicine*, *333*, 1052-1057.
- Sharma, S., & Rai, K. R. (2019). Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options. En *Cancer* (Vol. 125, pp. 1432-1440). <https://doi.org/10.1002/cncr.31931>
- Sociedad de Hematología del Uruguay. (2021). *Presentación Datos Registro*. [https://www.shu.com.uy/images\\_hematologia/info\\_util/registro\\_leucemias/registro\\_leucemia\\_2021.pdf](https://www.shu.com.uy/images_hematologia/info_util/registro_leucemias/registro_leucemia_2021.pdf)
- Svanberg, R., Janum, S., Patten, P. E. M., Ramsay, A. G., & Niemann, C. U. (2021). Targeting the tumor microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *106*(9), 2312-2324. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.268037>
- Taghiloo, S., & Asgarian-Omran, H. (2024). Cross-talk between leukemic and immune cells at the tumor microenvironment in chronic lymphocytic leukemia: An update review. *European Journal of Haematology*, *113*(1), 4-15. <https://doi.org/10.1111/ejh.14224>
- Tausch, E., Close, W., Dolnik, A., Bloehdorn, J., Chyla, B., Bullinger, L., Döhner, H., Mertens, D., & Stilgenbauer, S. (2019). Venetoclax resistance and acquired BCL2 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *104*(9), 434-437.
- ten Hacken, E., & Burger, J. A. (2016). Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1863*(3), 401-413. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.009>
- The 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. *The Lancet Oncology*, *17*(6), 779-790. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30029-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30029-8)
- Tsukada, N., Burger, J. A., Zvaifler N.J., & Kipps, T. J. (2002). Distinctive features of «nurselike» cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *99*(3), 1030-1037.
- vom Stein, A. F., Hallek, M., & Nguyen, P. H. (2024). Role of the tumor microenvironment in CLL pathogenesis. *Seminars in Hematology*, *61*, 142-154. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2023.12.004>

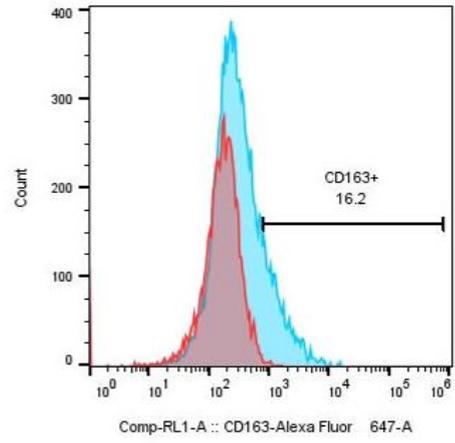
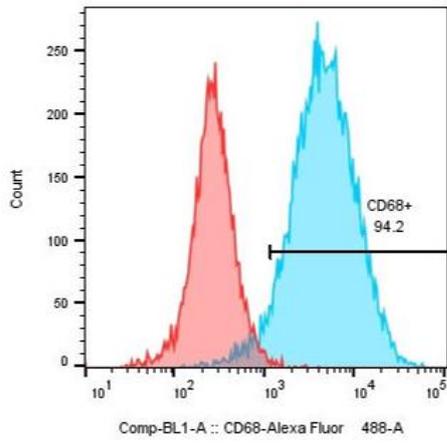
- Yosifov, D. Y., Wolf, C., Stilgenbauer, S., & Mertens, D. (2019). From biology to therapy: The CLL success story. En *HemaSphere* (Vol. 3, Número 2).  
<https://doi.org/10.1097/HS9.000000000000175>
- Ysebaert, L., & Fournié, J. J. (2011). Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 52(7), 1404-1406. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.568078>
- Zaaboub, R., Vimeux, L., Contremoulins, V., Cymbalista, F., Lévy, V., Donnadieu, E., Varin-Blank, N., Martin, A., & Dondi, E. (2022). Nurselike cells sequester B cells in disorganized lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia via alternative production of CCL21. *Blood Advances*, 6(16), 4691-4704. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006169>
- Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. En *Nature Reviews Cancer* (Vol. 10, Número 1, pp. 37-50). <https://doi.org/10.1038/nrc2764>

## VII. Anexo

**Tabla 1-Anexo.** Datos clínicos sobre las muestras provenientes de pacientes con LLC utilizadas en el presente proyecto.

Identificación	Edad	Sexo	GB totales	Linfocitosis	FISH*	Perfil IGHV**	Estadio
LLC1	76	M	-	626770	s/alt citog	Mutado	C
LLC2	75	M	48500	42500	-	No mutado	B
LLC3	61	M	-	900000	Normal	No mutado	-
LLC4	57	M	316800	304500	del(11q)	No mutado	III-C
LLC5	69	F	128000	119900	Sin alteraciones	Mutado	A
LLC6	52	M	-	421000	tris12	No mutado	C
LLC7	60	F	-	-	-	Mutado	B
LLC8	79	M	-	-	Sin alteraciones	Mutado	A
LLC9	-	-	237500	-	-	No mutado	-
LLC10	68	M	206000	195000	del(13q)	Mutado	II-B
LLC11	71	M	-	93000	tris12	Mutado	IV
LLC12	60	M	166780	156000	-	No mutado	B
LLC13	63	F	105000	102400	-	No mutado	C
LLC14	76	F	22000	19100	del(13q), monosomia Cr_6	No mutado	A
LLC15	62	M	110600	103000	-	No mutado	B
LLC16	72	F	237700	224600	tris12	No mutado	IIIC
LLC17	44	M	-	183000	Normal	No mutado	B
LLC18	63	F	29860	24500	tris12, del(13q)	Mutado	IA
LLC19	61	M	314000	303000	Normal	No mutado	C
LLC20	79	F	105000	112000	-	No mutado	II-B

\*FISH:Hibridación fluorescente in situ. \*\*IGHV:Región variable del gen de las inmunoglobulinas.



**Figura 1-Anexo.** Evaluación de los marcadores de NLC (CD68, CD163) en la línea celular THP-1 diferenciada a M0.