

APOPTOSIS EN LEUCEMIA LINFATICA CRONICA

MIRTA GIORDANO

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen La leucemia linfática crónica de células B (LLC-B) es la leucemia de mayor prevalencia en el hemisferio occidental. Se caracteriza por la progresiva acumulación de linfocitos B monoclonales CD5+, con baja expresión de Ig en la superficie. La mayoría de las células LLC-B se encuentran arrestadas en la fase G₀ del ciclo celular, por lo que su acumulación *in vivo* se debería a la inhibición del proceso apoptótico. Esta anomalía se ha relacionado a la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Sin embargo, cuando se cultivan *in vitro* las células LLC-B mueren por apoptosis espontáneamente lo que sugiere la existencia de factores que promueven la supervivencia *in vivo*. Los resultados presentados aquí demuestran que los leucocitos no-malignos, en particular los monocitos y las células NK, son capaces de inhibir la apoptosis de las células LLC-B, al menos en parte, a través de la producción de factores solubles. Los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra interferón- γ o IL-4 contrarrestan sólo parcialmente los efectos protectores de las células accesorias, lo que indica que no son éstas las citoquinas relevantes. El aumento en los niveles de apoptosis de las células LLC-B no está asociado a modificaciones en la expresión de Bcl-2, Fas o Fas ligando. Teniendo en cuenta que la LLC-B se asocia a fenómenos autoinmunes e infecciones recurrentes debido a hipogamaglobulinemia, sería interesante buscar una correlación entre la activación de las respuestas inmunes y la progresión de la enfermedad.

Abstract *Apoptosis in chronic lymphocytic leukemia.* Chronic lymphocytic leukemia of B cells (B-CLL) is the most prevalent leukemia in the Occidental Hemisphere. It is characterized by a progressive accumulation of monoclonal CD5+ B lymphocytes, with low amounts of surface Ig. Most B-CLL cells are arrested in the G₀ phase of the cell cycle; therefore their accumulation *in vivo* appears to result from the inhibition of apoptosis which has been attributed to over-expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2. When cultured *in vitro*, spontaneous apoptosis occurs, suggesting the existence *in vivo* of survival-promoting factors. We here show that non-malignant leukocytes, particularly monocytes and NK cells, are able to inhibit B-CLL cells apoptosis, at least in part, through the release of soluble factors. Neutralizing antibodies directed to interferon- γ or IL-4 only partially abolish the protecting effects of accessory cells suggesting that they are not the main cytokines involved. Increased apoptosis of B-CLL cells is not associated with modifications in the expression of Bcl-2, Fas or Fas ligand. Considering that B-CLL is associated to autoimmune phenomena and recurrent infections due to hypogammaglobulinemia, it should be interesting to correlate the activation of immune responses with disease progression.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, apoptosis, Bcl-2, Fas, cytokines

La leucemia linfática crónica de células B (LLC-B) es la leucemia de mayor prevalencia en el hemisferio occidental; comprende alrededor del 25% de las leucemias que se diagnostican. Es una enfermedad que afecta a personas mayores, con un pico de incidencia en el rango que va de los 60 a los 70 años y una incidencia mayor en hombres que en mujeres, en una relación aproximada de 2:1. La expectativa de vida de los pacientes con LLC-B al momento del diagnóstico es muy variable y

oscila entre aquellos que viven durante años con una enfermedad estable y sin medicación a otros que mueren a los pocos meses aún bajo tratamiento quimioterápico. A pesar de la implementación de nuevos recursos terapéuticos, no ha habido mejoras sustanciales en el tiempo de supervivencia de los pacientes en los últimos 40 años¹.

La LLC-B se caracteriza por la progresiva acumulación en la periferia de linfocitos morfológicamente maduros que presentan un fenotipo caracterizado por la expresión de antígenos pan-B como CD19 y CD20, junto con otros antígenos que no se encuentran en la mayoría de los linfocitos B circulantes como CD5 y CD23. Asimismo, las células LLC-B expresan niveles muy bajos de Ig

en la superficie que, generalmente, es de isotipo M, habiendo en algunos casos co-expresión IgM/IgD².

Esta leucemia se asocia con fenómenos de naturaleza autoinmune, en particular, con la producción de autoanticuerpos policlonales de isotipo IgG que están dirigidos contra antígenos de células hematopoyéticas, fundamentalmente contra antígenos de los glóbulos rojos, responsables de la inducción de anemia hemolítica autoinmune en un porcentaje importante de los pacientes. Por otra parte, y en cierta forma paradójicamente a la producción de autoanticuerpos, los pacientes con LLC-B presentan hipogamaglobulinemia a medida que progresa la enfermedad, lo que provoca infecciones bacterianas recurrentes, constituyendo una de las principales causas de morbi/mortalidad en los enfermos^{2, 3}.

Las células LLC-B son esencialmente no proliferantes; más del 99% se encuentran en la fase G₀ del ciclo celular, por lo que su lenta acumulación en la periferia se atribuye a defectos en la apoptosis o muerte celular programada. Se ha intentado asociar estas anomalías en el proceso apoptótico con la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 que es un rasgo característico de las células LLC-B⁴. La proteína Bcl-2 es una de varias proteínas pertenecientes a una misma familia que juegan un papel fundamental en la regulación de la apoptosis celular. El clon leucémico de muchos pacientes con LLC-B expresa, no sólo Bcl-2 sino además otros miembros de esta familia, como por ejemplo Mcl-1 y BAG, que presentan actividad anti-apoptótica, y Bax, capaz de promover la apoptosis celular³. Aún cuando existen discrepancias entre los grupos de trabajo no se ha podido

correlacionar inequívocamente mayor expresión de Bcl-2 en LLC-B con un estadio más avanzado de la enfermedad. En cambio, parecería que existe una asociación entre una mayor relación Bcl-2:Bax con resistencia al tratamiento y progresión de la leucemia⁵.

A pesar de su resistencia a morir por apoptosis *in vivo*, cuando se las cultiva *in vitro*, las células LLC-B mueren por apoptosis con relativa facilidad, lo que sugiere la existencia de factores del microambiente *in vivo* que regulan la sobrevivencia de las células leucémicas³. Estas señales moduladoras de la apoptosis celular provendrían esencialmente de los leucocitos que acompañan a las células LLC-B en la circulación, es decir de los monocitos, los linfocitos T y las células NK. Numerosos estudios han demostrado diversas anomalías, tanto en la distribución como en el fenotipo y funcionalidad de estas poblaciones leucocitarias en LLC-B. Así por ejemplo, los monocitos presentan una mayor expresión de antígenos de activación como moléculas de histocompatibilidad de clase II, receptores para el complemento (CR3) y receptores para el fragmento Fc de la IgG (RFcγ)⁶. Las células NK suelen presentar una capacidad citotóxica disminuida⁷. En cuanto a los linfocitos T, si bien su porcentaje está disminuido debido a la expansión del clon leucémico, en muchos pacientes se observa un aumento en su número absoluto⁷. Además, se ha encontrado una alteración en la relación de las subpoblaciones T CD4+/CD8+, por un aumento de las células CD8+ que se ha adjudicado a cambios en la distribución de las poblaciones T, con prevalencia de las CD4+ en médula ósea y en los ganglios comprometidos⁸. Cabe destacar, asimismo, que

TABLA 1.- Proporción de los leucocitos accesorios no-malignos en la sangre periférica de los pacientes estudiados

| Paciente | Estadio RAI | Leucocitos/mm ³ | % de leucocitos no-malignos | | | | |
|----------|----------------|----------------------------|-----------------------------|------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | Monocitos | Células NK | Linf. T CD4+ | Linf. T CD8+ | Linf. B CD5- |
| M.N. | 0 | 11 500 | 3.0 | 2.0 | 16.0 | 6.0 | 0.4 |
| J.T. | 0 | 11 700 | 5.5 | 11.0 | 15.0 | 28.0 | 0.9 |
| O.V. | 0 | 11 000 | 4.0 | 3.6 | 18.0 | 3.0 | 6.0 |
| M.R. | 0 | 11 200 | 1.2 | 21.0 | 5.3 | 3.1 | 0.4 |
| J.S. | 0 | 17 400 | 2.7 | 3.0 | 12.5 | 4.7 | 0.8 |
| N.D. | 0 | 17 100 | 1.2 | 2.0 | 3.1 | 2.0 | 0.5 |
| A.P. | 0 | 17 500 | 4.0 | 5.0 | 5.0 | 9.5 | 3.2 |
| M.S. | 0 | 30 400 | 3.1 | 4.3 | 7.1 | 2.9 | 0.4 |
| J.N. | I | 20 000 | 2.1 | 2.3 | 5.3 | 5.0 | 1.3 |
| A.T. | II | 16 200 | 2.5 | 2.5 | 1.8 | 5.0 | 1.2 |
| A.D. | II | 25 500 | 3.2 | 4.8 | 7.5 | 4.7 | 2.1 |
| P.I. | II | 33 500 | 10.0 | 10.9 | 14.0 | 9.0 | 0.9 |
| R.I. | II | 38 600 | 0.7 | 1.3 | 1.8 | 3.5 | 0.6 |
| E.V. | II | 46 400 | 3.0 | 4.6 | 5.4 | 2.6 | 0.8 |
| M.V. | II | 91 000 | 2.3 | 3.6 | 3.7 | 1.7 | 1.5 |

existe en una gran proporción de los enfermos expansión oligoclonal tanto en las poblaciones T CD4+ como en las CD8⁺. Trabajos recientes han demostrado que los linfocitos T de los pacientes tienden a producir un patrón de citoquinas preferentemente del perfil TH2, con predominio de la secreción de IL-4¹⁰.

Se considera que las células del clon leucémico no son ajenas a estas anomalías. De hecho, las células LLC-B constituyen la mayor proporción de los leucocitos circulantes, expresan moléculas capaces de reconocer ligandos específicos sobre la membrana de los linfocitos T, de los monocitos y de las células NK, poseen receptores para diversas citoquinas, como IL-2, IL-4 e interferón γ y, además, ellas mismas secretan citoquinas que pueden afectarlas de manera autócrina o afectar a otros leucocitos^{3, 7}. En resumen, existiría una activa interacción de las células LLC-B con los leucocitos no-malignos accesorios a través de factores solubles y/o de contacto célula a célula.

El objetivo de nuestro estudio fue investigar el papel de los leucocitos accesorios en la supervivencia de las células LLC-B. A tal fin utilizamos un sistema de cultivo *in vitro* prolongado en ausencia de estímulos exógenos. Brevemente, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de los pacientes por centrifugación en gradientes de densidad y luego se purificaron las células leucémicas mediante la depleción de los leucocitos normales con anticuerpos monoclonales específicos para monocitos (anti-CD14), células NK (anti-CD56) y linfocitos T (anti-CD3) junto con perlas magnéticas (dynabeads). Por esta metodología es posible obtener poblaciones de células LLC-B altamente purificadas (> 98%). A conti-

nuación, las células leucémicas puras o acompañadas por los leucocitos no-malignos se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico a una concentración de 2×10^6 células/ml y se cultivaron en microplacas de 96 pocillos en una estufa gaseada con 5% de CO₂ a 37°C. Diariamente, se cuantificaron los niveles de apoptosis mediante dos metodologías: microscopía de fluorescencia con el colorante naranja de acridina y bromuro de etidio y citometría de flujo, midiendo el pico de ADN hipodiploide con yoduro de propidio¹¹.

La mayoría de los pacientes analizados se encontraban en los estadios más tempranos de la enfermedad y no habían recibido tratamiento hasta el momento del estudio. Como se observa en la Tabla 1, resulta evidente la heterogeneidad en las poblaciones de leucocitos accesorios entre los distintos pacientes. A pesar de esta heterogeneidad nosotros encontramos, en todos los casos estudiados, que las células leucémicas mueren por apoptosis mucho antes cuando se cultivan puras que cuando están acompañadas de células accesorias (Figura 1). Este aumento en los niveles de apoptosis de las células LLC-B en cultivo no correlaciona con una disminución en la expresión de Bcl-2, ni con el aumento en la expresión de las proteínas del sistema Fas/Fas ligando (datos no mostrados).

Para determinar si la acción anti-apoptótica ejercida por las células accesorias podía atribuirse a la secreción de uno o más factores solubles o, si se requiere contacto celular, se llevaron a cabo cultivos en camaritas especiales (*transwells*) donde las células leucémicas puras se encuentran separadas de las mononucleares totales

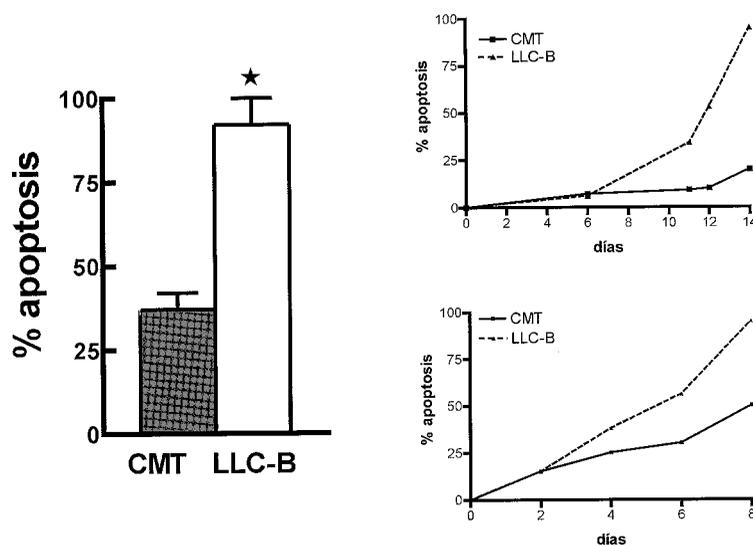


Fig. 1.- Aumento de la supervivencia de células LLC-B en cultivo debido a la presencia de leucocitos accesorios. Las células leucémicas acompañadas de leucocitos accesorios (CMT) o puras (LLC-B) se cultivaron *in vitro* a una concentración de 3×10^6 /ml en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal. Se muestran los porcentajes de apoptosis (media \pm ES) de 15 pacientes y las cinéticas de supervivencia de dos ejemplos representativos. * $p < 0,01$.

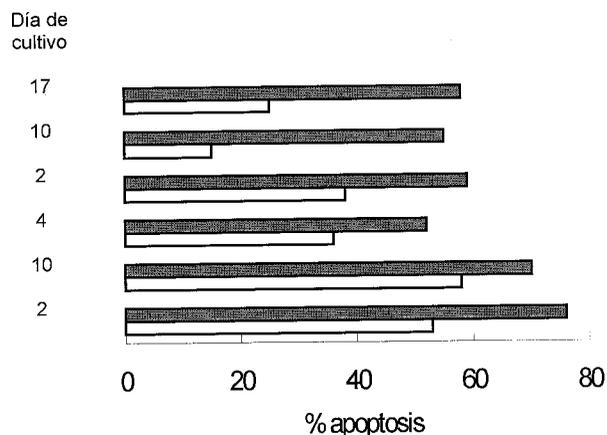


Fig. 2.- Participación de factores solubles en la inhibición de la apoptosis de células LLC-B por leucocitos accesorios. Las células leucémicas purificadas se co-cultivaron en *Transwells* con CMT (barra blanca) o LLC-B (barra gris), midiéndose los niveles de apoptosis de las mismas a distintos días de cultivo. Se muestran los resultados obtenidos en 6 pacientes con cinéticas de sobrevida diferentes.

mediante una membrana que permite el pasaje de macromoléculas pero no de células. Como se observa en la Figura 2, los niveles de apoptosis de las células LLC-B puras son mucho menores cuando se co-cultivan con leucocitos no-malignos; lo que indicaría que las células accesorias prolongan la sobrevida de las células leucémicas, al menos parcialmente, a través de la secreción de uno o más factores solubles anti-apoptóticos. En un intento por identificar estos factores, llevamos a cabo cultivos en presencia de anticuerpos neutralizantes contra las dos citoquinas que en la bibliografía muestran los efectos anti-apoptóticos más claros: IL-4 e IFN γ ^{3, 7, 11}. Los resultados encontrados fueron heterógeneos. Si bien en la mayoría de los pacientes estudiados la presencia de estos anticuerpos en el cultivo de las células mononucleares totales aumenta los niveles de apoptosis, no se logra bloquear completamente la actividad anti-apoptótica de los leucocitos accesorios, lo que indicaría que tanto IL-4 como el IFN γ son sólo parcialmente responsables del aumento en la sobrevida de las células LLC-B. Existirían, por tanto, otros factores solubles o no que participan en el efecto anti-apoptótico de los leucocitos accesorios.

Se hicieron, a continuación, depleciones parciales de cada una de las poblaciones de leucocitos no-malignos con el objeto de determinar si alguna de ellas jugaba un papel preponderante en los efectos reguladores de la apoptosis observados. Efectivamente, se encontró que los monocitos, y en menor medida las células NK, son los responsables de prolongar la sobrevida de las células LLC-B. Los linfocitos T, por el contrario, no protegen

de la apoptosis a las células leucémicas (% de apoptosis en células mononucleares totales (CMT): 34 ± 5 ; en células depletadas de monocitos (CD14): 69 ± 2 ; en células depletadas de NK (CD56): 48 ± 3 y en células depletadas de linfocitos T (CD3): 29 ± 4 , media \pm ES, $n=7$, $p<0.01$ CMT vs CD14⁺ y CMT vs CD56⁺).

Cuando los monocitos y las células NK son activadas por ciertos estímulos son capaces de liberar al medio citoquinas que, en nuestro caso, podrían ser responsables de la inhibición de la apoptosis de las células leucémicas. Nosotros habíamos demostrado previamente que la activación de monocitos y células NK con distinto tipo de complejos inmunes inhibe, no sólo la apoptosis espontánea de células LLC-B, sino también la inducida por agentes quimioterapéuticos como fludarabina, clorambucilo y glucocorticoides¹⁰. Los resultados descritos aquí extienden los hallazgos anteriores y señalan a estas poblaciones celulares como importantes reguladores de la sobrevida de las células malignas en LLC-B.

Entre las enfermedades oncohematológicas, la LLC-B es el ejemplo más típico de patología originada en defectos a nivel del proceso apoptótico. Sin embargo, no ha sido posible hasta el momento encontrar una alteración molecular común a todos los pacientes que demuestre, en forma inequívoca, ser la responsable de prolongar la sobrevida de las células LLC-B en circulación. Nuestras evidencias experimentales sugieren que los factores del microambiente celular, en particular aquellas señales inducidas por los leucocitos accesorios no-malignos, podrían jugar un papel importante como reguladores de la sobrevida de las células leucémicas. Sería por lo tanto de interés tratar de correlacionar el estado general del paciente, por ejemplo si está cursando una infección y cuál es el patógeno responsable o si presenta alguna manifestación autoinmune, con la progresión de la leucemia.

Bibliografía:

1. O'Brien S, del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; 85:307-18.
2. Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL. The French Cooperative Group on CLL. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. *Blood* 1991;78: 1901-14.
3. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999; 17:399-408.
4. Reed J.C. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia: implications for therapy. *Semin Hematol* 1998; 35 (Suppl):3-13.
5. McConkey D, Chandra J, Wright S., et al. Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of BCL-2 and BAX. *J Immunol* 1996; 156:2624-30.
6. Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Abnormal blood

- monocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1998; 48: 4812-6.
7. Bartik MM, Welker D, Kay NE. Impairments in immune cell function in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1998; 25: 27-33.
 8. Busmanis I, Hussein S, Feleppa F, Rockman S, Begley CG. B cell chronic lymphocytic leukemia with florid reactive CD4+ T cell lymphocytosis in lymph nodes. *Leuk Lymphoma* 1993; 9: 153-6.
 9. Rezvany MR, Jeddi-Tehrani M, Osterborg A, Kimby E, Wigzell H, Mellstedt H. Oligoclonal TCRBV gene usage in B-cell chronic lymphocytic leukemia: major perturbations are preferentially seen within the CD4 T-cell subset. *Blood* 1999; 94: 1063-9.
 10. de Toter D, Reato G, Mauro F, et al. IL4 production and increased CD30 expression by a unique CD8+ T-cell subset in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;104:589-99.
 11. Gamberale R, Geffner JR, Trevani A, et al. Immune complexes inhibit apoptosis of chronic lymphocytic leukaemia B cells. *Br J Haematol* 1999; 107:870-6.
 12. Osorio LM, Jondal M, Aguilar-Santelises M. Regulation of B-CLL apoptosis through membrane receptors and Bcl-2 family proteins. *Leuk. Lymphoma* 1998; 30: 247-56.

- - - -

La emoción placentera asociada al acto de descubrir es tan grande, que se comprende perfectamente aquella sublime locura de Arquímedes, de quien cuentan los historiadores que, fuera de sí por la resolución de un problema profundamente meditado, salió casi desnudo de su casa lanzando el famoso *Eureka*: "¡Lo he encontrado!"

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

Reglas y consejos sobre investigación científica. Los tónicos de la voluntad.
7ª edición, Madrid, 1935, p 88