

ASOCIACION ENTRE LEUCEMIA LINFATICA CRONICA Y ANEMIA HEMOLITICA AUTOINMUNE

**JEREMIAS GALLETI, PABLO MORANDE, CRISTIAN CAÑONES, MERCEDES BORGE,
 FERNANDO BEZARES, ROMINA GAMBERALE, MIRTA GIORDANO**

*Laboratorio de Inmunología Oncológica, Instituto de Investigaciones Hematológicas,
 Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

Resumen La leucemia linfática crónica (LLC) se asocia frecuentemente con anemia hemolítica autoinmune (AHA), pero los mecanismos responsables no se han dilucidado todavía. En la AHA los autoanticuerpos están dirigidos mayormente contra las proteínas del eritrocito banda 3 (B3), complejo Rh o glicoforinas. Nosotros investigamos la posibilidad de que las células LLC inicien la respuesta autoinmune actuando como células presentadoras de la proteína B3 a linfocitos T autorreactivos en el contexto de una coestimulación apropiada. En primer lugar, demostramos que las células LLC son capaces de unir e incorporar B3, pero no proteínas irrelevantes. El sitio de unión a B3 en las células leucémicas es sensible a la digestión por proteasas y neuraminidasa lo que sugiere que se trataría de una glicoproteína de membrana. Cuando las células LLC se ensayaron como células presentadoras de B3, encontramos que eran incapaces de inducir proliferación T a menos que se activaran a través de CD40. En estas condiciones, las células LLC pulsadas con B3 lograron estimular las respuestas T específicas en alrededor del 50% de las muestras evaluadas. Nuestros resultados muestran que las células LLC pueden unir y capturar en forma específica B3 y, luego de ser activadas, pueden inducir la proliferación de linfocitos T autorreactivos. Proponemos que el clon leucémico iniciaría la respuesta autoagresiva contra los glóbulos rojos actuando como una población de células presentadoras del antígeno B3.

Palabras clave: leucemia linfática crónica, anemia hemolítica autoinmune, banda 3

Abstract *Association between chronic lymphocytic leukemia and autoimmune hemolytic anemia.* The mechanisms underlying the frequent association between chronic lymphocytic leukemia (CLL) and autoimmune hemolytic anemia (AHA) remain ill-defined. In AHA autoantibodies are mostly directed to the erythrocyte proteins band 3 (B3), Rh complex or glycoporphins. We explored the possibility that CLL cells could initiate the autoimmune response by presenting B3 to T cells in the context of appropriate costimulation. We first demonstrated that CLL cells are capable to bind and subsequently take up B3, but not other irrelevant proteins. The binding site for B3 in CLL cells is sensitive to protease and neuraminidase activity suggesting the involvement of a membrane glycoprotein. When CLL cells were used as antigen presenting cells for B3 we found that they were unable to induce T cell proliferation unless they were activated by CD40 engagement. Under these conditions, B3-pulsed CLL cells became capable of stimulating specific T cell responses in about 50% of the samples studied. Our results show that CLL cells can specifically bind and capture B3 and, after being activated, they can induce T cell proliferation. We propose that the leukemic clone could initiate the autoaggressive response to erythrocytes by acting as a population of B3-antigen presenting cells.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, autoimmune hemolytic anemia, band 3

Los desórdenes autoinmunes provocados por autoanticuerpos son frecuentes en los pacientes con leucemia linfática crónica (LLC)^{1,2}. En particular, un porcentaje importante desarrolla anemia hemolítica autoinmune (AHA) durante el transcurso de la leucemia, siendo los principales factores de riesgo el estadio avanzado de la enfermedad y los tratamientos quimioterápicos con nucleósidos de adenosina². Los autoanticuerpos responsables de inducir la AHA en LLC son, en la mayoría de los casos, policlonales y de isotipo IgG, lo que indica que

son secretados por plasmocitos diferenciados a partir de linfocitos B no malignos y con la colaboración de linfocitos T CD4⁺^{1,2}. Es decir que aun cuando las células leucémicas LLC pueden secretar inmunoglobulinas al ser activadas *in vitro*, se acepta que no son ellas la fuente de los anticuerpos patogénicos. En cambio, la respuesta autoinmune se iniciaría cuando los antígenos eritrocitarios son presentados, en forma adecuada, a linfocitos T autorreactivos que se expanden clonalmente y colaboran con linfocitos B específicos para los citados autoantígenos. La presencia de linfocitos B y T autorreactivos contra antígenos eritrocitarios no implica necesariamente enfermedad ya que existen distintos mecanismos de tole-

rancia periférica para controlar su expansión, como por ejemplo la presencia de linfocitos T regulatorios naturales ($CD4^+ CD25^+$) que cumplen una función supresora de la respuesta autoinmune³.

Los mecanismos responsables de la asociación entre AHA y LLC no han sido dilucidados hasta el momento. El modelo más aceptado propone que la aparición del fenómeno autoinmune sería consecuencia de la inmunodeficiencia característica de la LLC. De hecho, estos pacientes presentan hipogamaglobulinemia, escasa o nula respuesta frente a la inmunización con neoantígenos, reversión en la relación entre linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, deficiente respuesta de células NK, entre otros defectos inmunes^{4, 5}. Como se señalara anteriormente, el tratamiento quimioterapéutico de los pacientes con análogos de nucleósidos, como la fludarabina, favorece la aparición o agravamiento de la AHA². Teniendo en cuenta que la fludarabina es un potente inmunosupresor que no sólo afecta a las células LLC sino también a los linfocitos T, se atribuye la mayor incidencia de AHA post-fludarabina a la eliminación preferencial de las células T regulatorias. En este sentido, Beyer y col⁶ han reportado que la fludarabina disminuye la frecuencia y actividad de los linfocitos T $CD4^+ CD25^+$ en pacientes LLC. Este modelo que adjudica a la inmunosupresión típica de la LLC un papel preponderante en la inducción de la AHA deja, sin embargo, una pregunta clave sin responder: ¿Por qué se inducen autoanticuerpos contra antígenos eritrocitarios y no contra otros blancos antigénicos? Para intentar responder a esta pregunta es necesario tener en cuenta que los glóbulos rojos se destruyen normalmente en el bazo dando lugar a altas concentraciones de proteínas eritrocitarias que podrían ser capturadas, procesadas y presentadas a linfocitos T autorreactivos, no sólo por células presentadoras de antígeno tradicionales (dendríticas, macrófagos, monocitos) sino también por células LLC. La posibilidad de que las células LLC presenten antígenos eritrocitarios fue explorada por Hall y col⁷, quienes encontraron que efectivamente estas células leucémicas son capaces de activar linfocitos T específicos para el antígeno Rh. Sin embargo, dado que los linfocitos B no son eficientes para capturar antígenos del entorno por endocitosis en fase fluida, es difícil entender de qué manera las células LLC podrían capturar e incorporar al antígeno Rh para iniciar el proceso autoinmune.

En relación a las proteínas eritrocitarias que actúan como blancos antigénicos en AHA, se han identificado al menos tres que son reconocidas por los autoanticuerpos: B3, complejo Rh y glicoforinas^{8, 9}. Mediante ensayos en los que la IgG patogénica se hace reaccionar con eritrocitos marcados radiactivamente para luego solubilizar las membranas y analizar los productos por SDS-PAGE y autorradiografía, se encontró reactividad contra B3, sola o en combinación con las otras dos en el 80% de las muestras estudiadas⁸. B3 es el intercambiador

aniónico Cl^-/HCO_3^- y cumple importantes funciones estructurales, siendo la proteína de membrana más abundante en el eritrocito¹⁰.

Teniendo en cuenta que B3 es el blanco antigénico prevalente en AHA, el objetivo de nuestro trabajo fue investigar el papel de esta proteína en el desarrollo de la AHA en pacientes con LLC. A tal fin purificamos B3 a partir de eritrocitos de distintos donadores sanos mediante una modificación del método de Casey¹¹ y determinamos, en primer lugar, si las células LLC son capaces de unir esta proteína ya que, como se mencionara anteriormente para el Rh, los linfocitos B sólo funcionan como células presentadoras de antígeno eficientes cuando pueden concentrar la proteína antigénica en la membrana a través de receptores específicos. Mediante el empleo de B3 biotinilada y análisis por citometría de flujo encontramos que las células LLC, pero no los linfocitos T ni las células NK, son capaces de unir B3 (Fig. 1). Como proteínas controles de pegado inespecífico se utilizaron espectrina y albúmina biotiniladas, no encontrándose unión de ninguna de ambas a las células LLC (datos no mostrados). Dado que la unión de B3 a las células LLC muestra evidencia de saturabilidad a concentraciones mayores de 20 $\mu g/ml$ y pudo ser parcialmente desplazada por un exceso de proteína no marcada, es posible concluir que se trata de una unión específica. Con el objetivo de caracterizar el sitio de unión de B3 a las células LLC se trataron las mismas con proteasas, observándose una marcada inhibición de la capacidad de unión, lo que sugiere la participación de proteínas de la membrana. Teniendo en cuenta que el tratamiento con neuraminidasa también redujo la capacidad de unión de B3 a las células LLC es posible concluir que la(s) proteína(s) involucradas están sializadas (datos no mostrados). Por otra parte, se evaluó si las células LLC son capaces de incorporar B3 una vez que ésta se encuentra unida a la membrana. Para ello se realizaron ensayos de endocitosis que permitieron concluir que las células leucémicas incorporan la proteína, lo que resulta imprescindible para su posterior procesamiento y presentación. Cabe mencionar que la capacidad de unión de B3 fue ensayada también en células mononucleares periféricas de donadores no leucémicos, encontrándose que los monocitos y los linfocitos B unen B3, no así los linfocitos T ni las células NK. En resumen, nuestros resultados demuestran que uno de los principales blancos antigénicos en AHA, la proteína eritrocitaria B3, puede ser reconocida específicamente y capturada por células LLC, monocitos y linfocitos B circulantes.

El evento clave para el inicio de un proceso autoinmune como la AHA consiste en la activación de linfocitos T autorreactivos que serán los que estimulen a los linfocitos B específicos para diferenciarlos en células plasmáticas productoras de los anticuerpos patogénicos. Por lo tanto resulta imprescindible demostrar la existen-

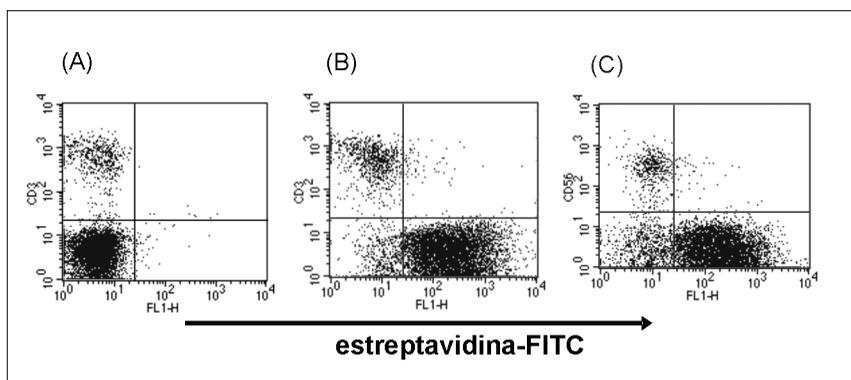


Fig. 1.– Unión de la proteína B3 a las células LLC. Se marcaron células mononucleares de sangre periférica de muestras de pacientes LLC con B3 biotinilada y anticuerpos anti-CD3 PE y anti-CD56 PerCP. La unión de B3 biotinilada se evidenció utilizando estreptavidina-FITC. Las células se analizaron por citometría de flujo. Se muestra gráficos de *dot plot* representativos de 25 muestras analizadas. (A) células sin B3 biotinilada expuestas a estreptavidina-FITC por 30 minutos en frío, (B y C) células incubadas con 5 µg/ml de B3 biotinilada durante 30 minutos en frío, lavadas 3 veces con solución fisiológica y expuestas a estreptavidina-FITC.

cia de clones autorreactivos contra B3 en el repertorio de linfocitos T normales. Con este objetivo realizamos cultivos celulares de células mononucleares periféricas de donadores normales y encontramos respuestas proliferativas significativas para un autoantígeno (índice de estimulación mayor a 2) en aproximadamente la mitad de los casos (datos no mostrados). Teniendo en cuenta la existencia de clones T autorreactivos para B3 y la capacidad de unión y endocitosis para esta proteína que presentan las células LLC, una explicación posible para la asociación entre AHA y LLC sería que las células leucémicas actúan como presentadoras aberrantes de B3. Sin embargo, se sabe que las células LLC son ineficientes como células presentadoras de antígeno debido a que expresan bajo niveles de moléculas co-estimuladoras¹². En distintos sistemas antígeno específicos se ha logrado revertir esta baja respuesta mediante la estimulación de las células LLC a través de CD40¹³. Tomando estos datos en consideración, se cultivaron células LLC sobre fibroblastos transfectados con CD40 ligado (CD40L) y se usaron como presentadoras de B3 a linfocitos T autólogos. Encontramos que las células LLC estimuladas, que expresan altos niveles de CD80 y CD86 (datos no mostrados), pudieron inducir la proliferación de linfocitos T específicos para B3 en aproximadamente la mitad de las muestras ensayadas (Fig. 2).

Considerados en conjunto, nuestros resultados sugieren que, bajo condiciones apropiadas, las células LLC pueden funcionar como presentadoras de la proteína B3 induciendo la proliferación de linfocitos T autorreactivos. Es interesante destacar que los pacientes con LLC suelen presentar esplenomegalia por infiltración leucémica a medida que progresa la enfermedad y que dicha infil-

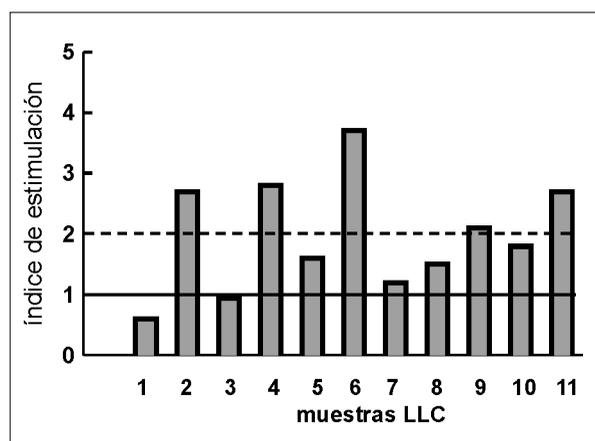


Fig. 2.– Proliferación de linfocitos T inducida por células LLC pulsadas con B3. Se purificaron células LLC de sangre periférica por centrifugación en Ficoll-Triyosom y posterior depleción de los leucocitos T, NK y monocitos utilizando anticuerpos monoclonales específicos y perlas magnéticas. Las células LLC se estimularon incubándolas 18 h sobre fibroblastos transfectados con CD40 ligado. Finalmente las células LLC se pulsaron durante 18 h con B3 (10 µg/ml), se trataron con mitomicina C para inhibir la proliferación y se usaron como células presentadoras del antígeno B3. Los linfocitos T autólogos se purificaron por separación magnética y se co-cultivaron durante 7 días con las células LLC pulsadas o no con B3. Se evaluó la incorporación de 3H-timidina durante las últimas 18 h de cultivo. Los resultados se expresan como índice de estimulación que se calcula como la razón entre las cpm de los cultivos en presencia de las células LLC pulsadas con B3 y las cpm de los cultivos controles. Valores superiores a 2 se consideran respuesta positiva (línea de puntos). La incorporación basal fue de 1000-5000 cpm (línea llena).

tración precede frecuentemente la aparición de la AHA¹⁴. Dado que el bazo es el sitio fisiológico de destrucción de los eritrocitos, las células LLC infiltrantes se verán expuestas a altas concentraciones de proteínas eritrocitarias como B3. Nosotros proponemos un modelo en el cual las células LLC estimuladas en el tejido esplénico por interacción con células estromales, mieloides y linfocitos T CD40L⁺¹⁵ capturan y procesan B3 para luego activar linfocitos T autorreactivos. Es posible que la maquinaria de procesamiento de las células LLC permita la presentación de péptidos crípticos de la proteína, diferentes a los que son presentados por los monocitos, células dendríticas y demás poblaciones presentadoras de antígeno convencionales. Queda por determinar cuáles son los epitopes dominantes para los linfocitos T que responden a B3 y si estas poblaciones se encuentran expandidas en los pacientes LLC con AHA.

Teniendo en cuenta que la AHA es una de las principales causas de morbi/mortalidad en los pacientes LLC, consideramos que es de fundamental importancia clarificar el proceso patogénico. Conocer de qué manera se inicia y cómo se desarrollan las primeras etapas de este proceso posibilitaría el desarrollo de estrategias terapéuticas superadoras del tratamiento clásico con glucocorticoides que, si bien es efectivo en la mayoría de los casos para controlar la hemólisis, profundiza la inmunosupresión característica de la LLC.

Bibliografía

1. Ward JH. Autoimmunity in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2001; 2: 253-7.
2. Hamblin TJ. Autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33: 230-9.
3. Zwar TD, van Driel IR, Gleeson PA. Guarding the immune system: suppression of autoimmunity by CD4+CD25+ immunoregulatory T cells. *Immunol Cell Biol* 2006; 84: 487-501.
4. Ravandi F, O'Brien S. Immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55:197-209.
5. Scrivener S, Goddard RV, Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 383-9.
6. Beyer M y col. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 2005; 106: 2018-25.
7. Hall AM, Vickers MA, McLeod E, Barker RN. Rh autoantigen presentation to helper T cells in chronic lymphocytic leukemia by malignant B cells. *Blood* 2005; 105: 2007-15.
8. Leddy JP, Falany JL, Kissel GE, Passador ST, Rosenfeld SI. Erythrocyte membrane proteins reactive with human (warm-reacting) anti-red cell autoantibodies. *J Clin Invest* 1993; 91: 1672-9.
9. Victoria EJ, Pierce SW, Branks MJ, Masoureddis SP. IgG red blood cell autoantibodies in autoimmune hemolytic anemia bind to epitopes on red blood cell membrane band 3 Glycoprotein. *J Lab Clin Med* 1990;115: 74-88.
10. Kay MM. Band 3 and its alterations in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-je-grand)* 2004; 50: 117-38.
11. Casey JR, Lieberman DM, Reithmeier RA. Purification and characterization of band 3 protein. *Methods Enzymol* 1989;173: 494-512.
12. Dazzi F, D'Andrea E, Biasi G, et al. Failure of B cells of chronic lymphocytic leukemia in presenting soluble and alloantigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 75: 26-32.
13. Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* 1993; 177: 925-35.
14. Zhang B, Lewis SM. The splenomegaly of myeloproliferative and lymphoproliferative disorders: splenic cellularity and vascularity. *Eur J Haematol* 1989; 43: 63-6.
15. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 380-8.

La juventud debe tener ideales elevados y pensar en alcanzar grandes cosas, porque si la vida rebaja siempre y no se logra sino una parte de lo que se ansía, soñando muy alto alcanzareis mucho más. Las conquistas del presente son sueños juveniles realizados y que alguna vez se tuvieron por imposibles.

Bernardo A. Houssay (1887-1971)