



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE LINFOCITOS B
PROVENIENTES DE PACIENTES CON LEUCEMIA
LINFOCÍTICA CRÓNICA Y CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Alejandro Enrique Cornejo Bello como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutora: María Elena Marquez

CARACAS, VENEZUELA
MAYO - 2014

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL (A) Br. ALEJANDRO CORNEJO**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del (la) Br. Alejandro Cornejo, C.I: 20.910.251, titulado "**Estudio de la interacción entre Linfocitos B provenientes de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica y Células Madre Mesenquimales**", para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 21 días del mes de mayo del año 2014, dejando constar que la Prof. Guillermina Alonso actuó como coordinadora del jurado examinador.



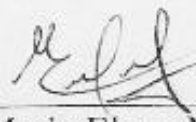
Prof. Elizabeth Merentes



Prof. Cristina Sanoja



Prof. Guillermina Alonso
(Tutor - Coordinador)



Prof. Maria Elena Marquez
(Tutor)

I - Agradecimientos

Agradezco a mi madre, Rosa María Bello por su ejemplo, por enseñarme que siempre debo luchar por cumplir mis metas e intentar ser mejor persona cada día, a mi padre Eduardo Cornejo por apoyarme y ayudarme siempre en todas las decisiones importantes que he tomado, mi abuela Rosa Peña por todo el cariño que me ha dado, A mi abuelo Benjamín Cornejo que aunque no esté con nosotros su cariño sigue y seguirá estando presente; a mi familia por el cariño que siempre me demuestran.

A mis amigos de la Universidad: Yonathan, Roberto, Verónica, Liseth, Migdalia, Oryza y Javier por todos los momentos buenos y difíciles que compartimos durante todos estos años en la carrera, gracias por su paciencia, cariño y compañía. A mis preparadoras favoritas y amigas Farilyn, Ana Victoria (Vicky) y Mariannis, gracias por su cariño y enseñanzas.

A mi tutora la Dra. María Elena Marquez por aceptarme en un proyecto tan interesante y complejo como lo es la inmunología del cáncer, agradezco además de sus consejos, y a la formación de mi criterio científico. A los investigadores del laboratorio de patología celular agradezco por sus recomendaciones en especial a la Dra. Jahelí Fuenmayor por enseñarme a trabajar de forma adecuada en el laboratorio, al resto de los investigadores Drs. Olga, Ingrid, Mayela, Carlos, Cardier y Dylana agradezco su ayuda durante mi estadía en el laboratorio. Agradezco al IVIC por el financiamiento del proyecto.

Gracias a mis compañeros y amigos de laboratorio Ricardo, Ligia, Giselle, Yonathan y Leslie (“La Hermandad”) y a Migda, Karelys, Raquel y Karin por hacerme reír siempre que pudieron y por hacer que el laboratorio fuese como mi segundo hogar.

A la profesora Guillermina Alonso (“Mina”) por su cariño y sus recomendaciones, regaños y críticas constructivas. Al resto de los profesores por ayudarme en la formación de mi criterio científico y conocimiento Biológico. A la prof. Izaskun Petralanda por enseñarme sobre las reflexiones de la vida, la ética y la sociedad. Gracias al jurado por sus correcciones y recomendaciones.

Gracias a la UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, mi querida UCV por darme la oportunidad de ser parte de la casa que vence las sombras. ¡Que Viva la Universidad Autónoma e Independiente! y: *“Que vivan los estudiantes jardín de nuestra alegría, son aves que no se asustan de animal ni policía.....!!! – Violeta Parra”*

“La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda” - Voltaire

II- Resumen

La leucemia linfocítica crónica (CLL) es uno de los tipos de leucemia más frecuente que afecta principalmente a adultos (mayores de 60 años). Esta enfermedad representa un desorden linfoproliferativo indolente caracterizado por una acumulación de linfocitos B (B-CLL) monoclonales a nivel de circulación periférica, ganglios linfáticos y médula ósea. En general, en el cáncer de células sanguíneas, el desarrollo de la enfermedad y la fisiopatología están relacionadas con el concepto de microambiente tumoral. El microambiente es el conjunto de condiciones físico-químicas en el cual se desarrolla una célula, e incluye la interacción con otros tipos celulares y con factores solubles. En las neoplasias y en el caso particular de la CLL, la interacción de las células malignas con las células del estroma proporciona señales anti-apoptóticas y pro-supervivencia en los linfocitos B, esto puede contribuir significativamente a la resistencia a una amplia variedad de tratamientos. En los pacientes con CLL los linfocitos B presentan un largo período de vida *in vivo*, sin embargo, *ex vivo* estas células mueren rápidamente por apoptosis. Estudios recientes sugieren que el contacto de las B-CLL con las células madre mesenquimales (MSC) favorece su supervivencia en condiciones de co-cultivo *in vitro*. Hasta el momento no se conoce bien si es necesario únicamente el contacto directo entre ambas células o son los factores solubles secretados en la interacción los responsables de mantener la supervivencia de las B-CLL. Por otra parte, como consecuencia de la interacción entre estas células, algunas moléculas expresadas sobre las B-CLL pueden ser moduladas. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue estudiar la supervivencia de las B-CLL producto de la interacción con MSC utilizando un sistema de co-cultivo directo e indirecto. Además se evaluó la modulación de algunas moléculas de superficie, entre ellos la molécula CD20, CD25, IgM, CXCR4, CD55 y CD59 antes y después del co-cultivo. Con respecto a la modulación de las B-CLL y las MSC encontramos que luego de dos semanas de co-cultivo, la expresión de moléculas como CD20, IgM y CXCR4 disminuyó de la superficie de las B-CLL mientras que la expresión de CD59 y CD25 aumento. Esta modulación de moléculas de superficie podría tener implicaciones importantes en la patogenia de la enfermedad. Por otro lado logramos mantener la viabilidad de las B-CLL hasta dos semanas de cultivo directo con las MSC. Conseguimos además mantener una viabilidad similar a la obtenida en el co-cultivo directo utilizando un sistema de co-cultivo indirecto (inserto), lo que sugiere que los factores solubles secretados en el co-cultivo juegan un rol importante en la supervivencia de las B-CLL.

III- Lista de abreviaturas

- **Ac:** Anticuerpo.
- **ADCC:** Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, por sus siglas en Ingles: *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*.
- **AKT:** mejor conocida como proteína kinasa B, en Inglés *Protein Kinase B*.
- **ANOVA:** Análisis de varianza, por sus siglas en Ingles; *ANalysis Of VAriance*.
- **ARN:** Ácido ribonucleico por sus siglas en Inglés: *Ribonucleic acid*.
- **BAFF:** Factor activador de linfocitos B, por sus siglas en Ingles: *B-cell activating factor*
- **Bcl-2:** por sus siglas en Inglés: *B-cell lymphoma 2*.
- **B-CLL:** Linfocito B de pacientes con leucemia linfocítica crónica.
- **BCR:** Receptor de linfocitos B, por sus siglas en inglés: *B Cell Receptor*.
- **bFGF:** por sus siglas en Inglés: *Basic Fibroblast Growth Factor*.
- **BSA:** Suero Fetal Bovino, por sus siglas en inglés: *Fetal Bovine Serum*.
- **CD:** por sus siglas en inglés: “*Cluster of Differentiation*”.
- **CD40-L:** CD40 Ligando.
- **CDC:** Lisis mediada por complemento
- **CLL:** Leucemia linfocítica (o linfoide) crónica por su siglas en Inglés: *Chronic lymphocytic leukemia*.
- **CXCL12:** por sus siglas en Inglés: *C-X-C motif chemokine 12*
- **CXCR12:** por sus siglas en Inglés: *Chemokine Receptor type 12*.
- **CXCR13:** por sus siglas en Inglés: *Chemokine Receptor type 13*.
- **CXCR4:** por sus siglas en Inglés: *Chemokine Receptor type 4*.
- **DAF:** factor acelerador de la degradación, por sus siglas en Ingles: *decay accelerating factor*.
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- **FCD:** Célula dendrítica folicular, por sus siglas en inglés: *Follicular Dendritic Cell*.
- **FISH:** por sus siglas en inglés: *Fluorescente in Situ Hibridación*.

- **FITC**: Isotiocianato de Fluoresceína, por sus siglas en inglés: *Fluorescein Isothiocyanate*.
- **g**: Unidades de gravedad.
- **HRF**: factor de restricción homólogo, por sus siglas en Inglés: *homolog restriction factor*.
- **HSC**: célula madre hematopoyética, por sus siglas en inglés: *Hematopoyetic Stem Cell*.
- **HSC**: Células madre hematopoyéticas, por sus siglas en Inglés: *Hematopoyetic Stem Cell*.
- **IgM**: Inmunoglobulina M.
- **IMF**: Intensidad media de fluorescencia.
- **ISCT**: por su siglas en Inglés: “*Internaltional Society for Cellular Therapy*”.
- **IVIC**: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.
- **KDa**: Kilo Dalton.
- **LPS**: lipopolisacárido.
- **MAC**: Complejo de ataque a membrana, por sus siglas en Inglés: *Membrane attack complex*.
- **mARN**: Ácido ribonucleico mensajero por sus siglas en Inglés: *messenger Ribonucleic acid*.
- **MC**: Medio condicionado.
- **MCi**: Medio condicionado de la interacción.
- **MEM**: Medio mínimo esencial de Eagle, por sus siglas en inglés: *Minimum Essential Medium Eagle*.
- **MIRL**: Inhibidor de lisis restrictiva.
- **MSC**: Célula madre mesenquimal por su siglas en inglés: *Mesenchimal Stem Cells*
- **NLC**: por sus siglas en inglés: *Nurse Like Cell*.
- **OMS**: Organización Mundial de la Salud.
- **pAKT**: en Inglés: *phosphorylated Protein Kinase B*.

- **PBS:** Buffer Fosfato Salino, por sus siglas en inglés: *Phosphate Buffered Saline*.
- **PE:** Ficoeritrina o en inglés: *Phycoerythrin*.
- **PE-Cy5:** Ficoeritrina asociada a Cy5.
- **pERK:** por sus siglas en Inglés: *phosphorylated Extracellular-signal-Regulated Kinases*.
- **PI:** Ioduro de Propidio, por sus siglas en inglés: *Propidium Iodide*.
- **PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa, por sus siglas en Ingles: *phosphatidylinositol 3-kinase*.
- **PS:** Fosfatidilserina, por sus siglas en inglés: *Phosphatidylserine*.
- **RPMI:** medio de *Roswell Park Memorial Institute*.
- **SDF-1:** Factor estromal celular derivado por sus siglas en Inglés: *stromal cell-derived factor 1*.
- **SFB:** Suero Fetal Bovino.
- **SYK:** Tirosina quinasa de hígado, por sus siglas en Inglés: *Spleen tyrosine kinase*.
- **T-175:** Frascos de cultivo Roux (o flask) de 175 cm³.
- **T-25:** Frascos de cultivo Roux (o flask) de 25 cm³.
- **T-75:** Frascos de cultivo Roux (o flask) de 75 cm³.
- **TAC:** complejo tetramérico de anticuerpos, por sus siglas en inglés: *Tetrameric Antibody Complex*.
- **TCR:** Receptor de linfocitos T, por sus siglas en inglés: *T Cell Receptor*.
- **TSP-1:** por sus siglas en Inglés: *Thrombospondin 1*.
- **UTC:** Unidad de Terapia Celular del IVIC.
- **VCAM-1:** Molécula de adhesión vascular en el endotelio, por sus siglas en Inglés: *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*.
- **VEGF:** por sus siglas en inglés: Vascular Endothelial Growth Factor.
- **ZAP-70:** Tirosina Kinasa de 70 KDa, por sus siglas en Inglés: *Zeta-chain-Associated Protein Kinase 70*.

Contenido

I - Agradecimientos.....	i
II- Resumen.....	iii
III- Lista de abreviaturas.....	iv
1- Introducción.....	1
1.1- Leucemia.....	1
1.2- Leucemia Linfocítica Crónica.....	2
1.3- Epidemiología.....	3
1.4- Diagnóstico y pronóstico.....	4
1.5- Inmunofenotipo de las B-CLL.....	6
1.6- Células madres mesenquimales.....	6
2- Antecedentes.....	8
3- Objetivos.....	15
4- Materiales y Métodos.....	16
4.1- Materiales.....	16
4.1.2- Medios de Cultivo y soluciones.....	16
4.1.3- Anticuerpos monoclonales y su especificidad.....	17
4.1.3.1- Especificidad de los anticuerpos utilizados para caracterizar las MSC.....	17
4.1.3.2- Especificidad de los anticuerpos utilizados para caracterizar las B-CLL.....	20
4.1.3.3- Otros reactivos y materiales.....	21
4.2- Células madre mesenquimales.....	23
4.2.1- Aislamiento.....	23
4.2.2- Cultivo.....	23
4.2.3- Caracterización.....	25
4.3- B-CLL (linfocitos B de pacientes con leucemia linfocítica crónica).....	26
4.3.1- Aislamiento y purificación.....	26
4.3.2- Caracterización fenotípica inicial y pureza.....	28
4.3.3- Cultivo.....	30
4.3.3.1- Co-cultivos con MSC.....	30
4.3.3.2- Co-cultivos con insertos (ThinCerts™).....	30
4.3.3.3- Cultivos con medio condicionado.....	31
4.3.3.4- Cultivos de B-CLL solo con medio.....	32

4.3.4- Ensayos de viabilidad y detección de moléculas de superficie	32
4.3.4.1- Marcaje con Anexina-V/PI.....	32
4.3.4.2- Ensayo de detección de moléculas de superficie en B-CLL.....	33
4.4- Esquema resumen de los cultivos y ensayos realizados	34
4.5- Análisis de resultados	34
5- Resultados	36
5.1- Caracterización de Células Madre Mesenquimales	36
5.2- Caracterización de los linfocitos B de pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica.....	38
5.3- Variación en la expresión de antígenos de superficie en B-CLL luego del co-cultivo con MSC.....	41
5.4- Viabilidad en ensayos de co-cultivo y medio condicionado	44
6- Discusión.....	49
7- Conclusiones.....	62
8- Recomendaciones.....	63
9- Bibliografía.....	64
10- Anexos	74

1- Introducción

1.1- Leucemia

Las leucemias son neoplasias de células hematopoyéticas que proliferan inicialmente en la médula ósea y posteriormente se diseminan a la sangre e incluso a otros tejidos. Estas células muestran defectos de maduración y su acumulación en la médula ósea determina un frenado de la hematopoyesis normal, a la que terminan sustituyendo, llegando inmaduros la mayor parte de los elementos linfoides o mieloides que pasan a la sangre (Castrillo y Álvarez, 2005). Algunos aspectos generales de la Leucemia son los siguientes:

- a) Las leucemias pueden ser mieloides o linfoides (Figura 1). Aunque semánticamente los “glóbulos blancos” son los actores de las leucemias, también se ha hablado de leucemia de las células plasmáticas o eritroleucemias, cuando la proliferación es de células inmaduras de la serie roja en este último caso.
- b) Cuando la neoplasia empieza en otro lugar diferente a la medula ósea, por ejemplo, en los ganglios linfáticos y luego invade la sangre periférica, se habla de linfoma y no de leucemia primaria, sin embargo la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye las “leucemias linfocíticas” y el “linfoma” en una sola clasificación.
- c) Entre las leucemias primarias se distinguen formas agudas y crónicas. En cada uno de estos grupos hay tipos mieloides y linfoides. Por eso se habla de leucemia linfática aguda (o leucemia aguda mieloblástica), de leucemia mieloides aguda (o leucemia aguda linfoblástica), de leucemia mieloides crónica y de leucemia linfoides crónica (Castrillo y Álvarez, 2005).

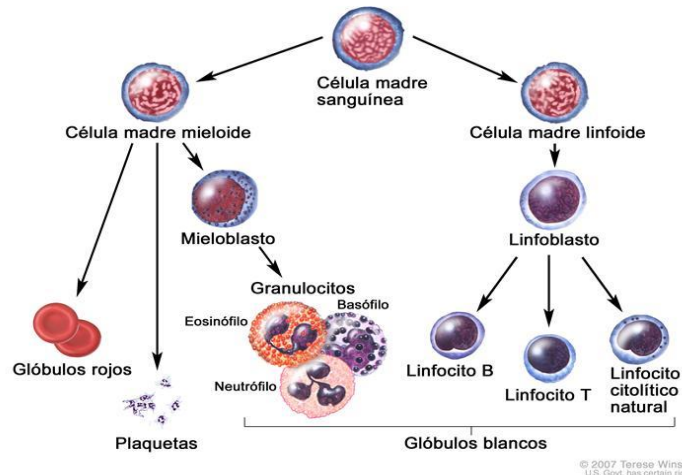


Figura 1. Árbol hematopoyético simplificado. Las leucemias pueden afectar los linajes linfoides o mieloides. La leucemia linfocítica crónica afecta a los linfocitos B. Tomado de © 2007 Terese Winslow. U.S Govt. Instituto Nacional del Cáncer (www.cancer.gov).

1.2- Leucemia Linfocítica Crónica

La Leucemia Linfocítica crónica (CLL por su siglas en Inglés: *Chronic lymphocytic leukemia*) es una enfermedad maligna, progresiva e indolente caracterizada por una proliferación descontrolada de linfocitos B monoclonales defectuosos en el proceso de apoptosis (Ding y col., 2009). La consecuencia directa de este desorden es la acumulación de linfocitos B, maduros desde el punto de vista morfológico, pero inmunológicamente inmaduros (no inmunocompetentes), en la sangre y la médula ósea, asociada con hiperplasia de tejido linfóide (Davids y Burger, 2012). Los síntomas pueden estar ausentes o presentarse linfadenopatía, esplenomegalia, hepatomegalia y síntomas inespecíficos referentes a la anemia (malestar y fatiga). La acumulación de células B anormales se debe a un proceso dinámico entre las tasas de producción y muerte, donde la primera es mucho mayor que la segunda. Este desequilibrio puede ocurrir por un aumento del número de células B, una disminución en el proceso de muerte celular, o bien simultáneamente. En esta enfermedad se ha considerado que dicha acumulación ocurre por células deficientes en el proceso de apoptosis debido a defectos en el material genético (Jelinek y col., 2001; Chiorazzi y col., 2005; Messmer y col., 2005). Se ha propuesto que estas células permanecen en la fase G_0/G_1 del ciclo celular, evitando ser eliminadas por el proceso de muerte celular programada, esto trae como consecuencia la resistencia a los tratamientos de quimioterapia (Burger y col., 2000).

1.3- Epidemiología

La CLL es la leucemia crónica más frecuente del adulto en países occidentales y constituye el 30% de todas las leucemias en los Estados Unidos y Europa (Foon, 1995). En contraste, en Japón la CLL representa sólo 2% de los casos y en China el 12% (Asou y col., 1993). Respecto a Latinoamérica, algunos estudios parecen indicar que la CLL es poco frecuente en México, especialmente en mestizos mexicanos, la CLL se diagnosticó sólo en 9% de los casos de leucemia del adulto y en 5% de los pacientes nativos (Ruiz-Argüelles y col., 1999). Recientemente, en Venezuela se reportó una alta frecuencia de europeos entre los pacientes diagnosticados sugiriendo la posibilidad de una mayor susceptibilidad para la CLL en individuos europeos en comparación a mestizos latinoamericanos (Marquez y col., 2012). Del mismo modo, la incidencia es significativamente menor en la población hispana residente en Florida (Estados Unidos) comparada con la población de blancos no hispanos (Trapido y col., 1994). La CLL es más común en personas de 60 años de edad en adelante (Figura 2). La incidencia de la enfermedad aumenta desde menos de uno por cada 100.000 en personas de 40 a 44 años de edad, a más de 30 por cada 100.000 en personas de 80 años en adelante (Siegel y col., 2012).

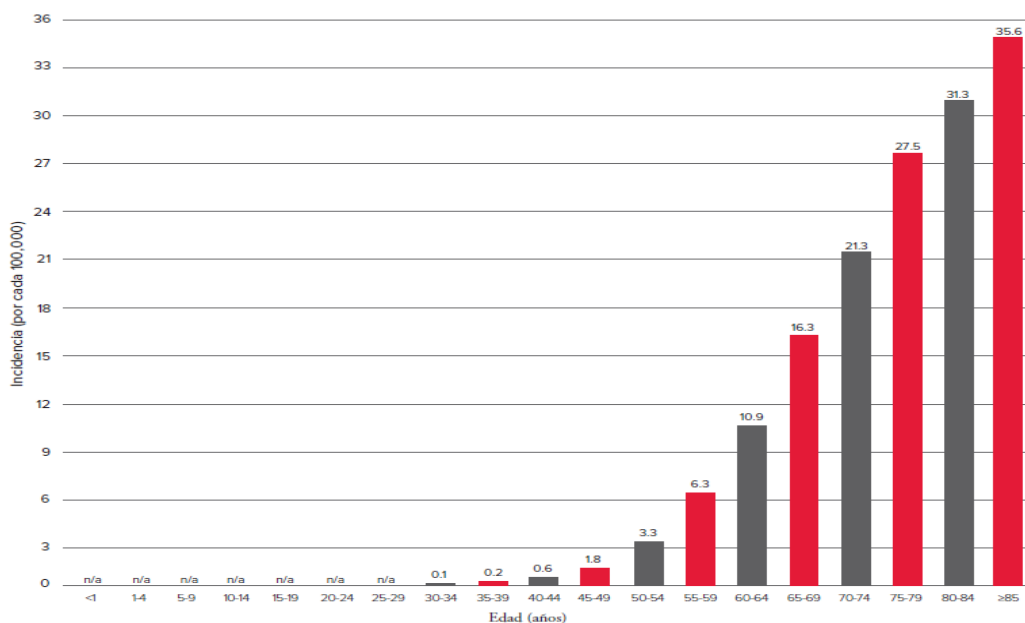


Figura 2. Incidencia de la leucemia linfocítica crónica por grupos etarios (2004-2008). El eje horizontal muestra las edades en intervalos de 5 años. El eje vertical muestra la frecuencia de nuevos casos de CLL por cada 100.000 personas en un grupo etario en particular en EEUU. Tomado de *SEER Cancer Statistics Review* (Jemal y col., 2008). *National Cancer Institute*, Bethesda, MD, (http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008).

1.4- Diagnóstico y pronóstico

El curso clínico de la enfermedad suele ser variable y difícil de predecir. La media de la supervivencia de la enfermedad suele ser de 5-7 años; sin embargo, en algunos pacientes el curso clínico es más indolente, y nunca requieren terapias. En otros casos la enfermedad avanza muy rápidamente sobreviviendo en promedio solo de 1,5-2 años. Esto demuestra que el curso de la enfermedad suele ser heterogéneo (Foon y col., 1990; Rozman y Montserrat, 1995). Existen dos sistemas de clasificación mundialmente conocidos, los cuales se basan en sus características clínicas. Estos son, el sistema *Rai* y el sistema *Binet* (Rai y col., 1975; Binet y col., 1981). (Tablas 1 y 2). Estos sistemas permiten clasificar a los pacientes según el estadio de la enfermedad, con la finalidad de lograr tratamientos específicos. La anemia y la trombocitopenia son las principales variables de pronóstico adverso. Sin embargo, estos sistemas de clasificación no permiten predecir la evolución de la enfermedad sobre todo en los estadios más tempranos. Es por esta razón que se han venido desarrollando marcadores pronósticos de la enfermedad.

Tabla 1. Sistema de clasificación *Rai*

Estadio	Definición	Supervivencia
Estadio 0: Riesgo bajo.	Linfocitosis (sangre o médula ósea).	> 10 años
Estadio I y II: Riesgo Intermedio.	Linfocitosis y adenomegalia, Linfocitosis hepatomegalia y/o esplenomegalia, con o sin adenomegalia.	7 años
Estadio III y IV: Riesgo alto.	Linfocitosis más anemia (Hb < 11g/L con o sin crecimiento de ganglios, bazo e hígado. Linfocitosis más trombocitopenia (plaquetas < 100x10 ⁹ /L), con o sin anemia o crecimiento de ganglios, bazo e hígado	1,5 a 3 años

Tomado de (Rai y col., 1975).

Tabla 2. Sistema de clasificación *Binet*

Estadio	Signos al momento del diagnostico
A	Aumento anormal de la cantidad de linfocitos B en sangre periférica y menos de 3 zonas de tejido linfoide palpable. (ausencia de anemia y trombocitopenia)
B	Aumento anormal de la cantidad de linfocitos en la sangre circulante y más de tres zonas de tejido linfoide agrandado palpable (ausencia de anemia y trombocitopenia)
C	Igual que B pero con anemia (Hemoglobina <11 g/dL) o bajos conteos de plaquetas (plaquetas <100.000/ μ L).

Tomado de (Binet y col., 1981).

Actualmente existen varios marcadores pronóstico de la enfermedad (Dighiero y Hamblin, 2008) cuyo diagnóstico permite establecer mejor la necesidad y el tipo de terapia en pacientes que se encuentran en los primeros estadios de la enfermedad (generalmente asintomáticos). Algunos de estos marcadores pronóstico son:

- Estado mutacional del gen de la cadena pesada de la región variable de la inmunoglobulina (IgV_H): el hallazgo de un número significativo de mutaciones en esta región está relacionado con la mediana de supervivencia que excede los 20 a 25 años. La ausencia de mutaciones se relaciona con una mediana de supervivencia menor de 8 a 10 años (Hamblin y col., 1999; Kharfan-Dabaja y col., 2008). Por lo que el estado mutacional no mutado del IgV_H se considera mal pronóstico.
- La proteína tirosina quinasa (70 KDa) ZAP-70, la cual ha sido propuesta como sustituta del estado mutacional por su menor complejidad metodológica. La positividad al ZAP-70 (que implica presencia de la proteína en linfocitos B malignos), en los pacientes que no han sido tratados con anterioridad y que son asintomáticos (>30%) está relacionada con una supervivencia menor (6–10 años), mientras que un ZAP-70 negativo se

relaciona con una media de supervivencia de más de 15 años. (Crespo y col., 2003; Krober y col., 2006).

- Anomalías cromosómicas determinadas mediante hibridación fluorescente in situ (HFIS). Las anomalías cromosómicas han sido relacionadas con el pronóstico de la enfermedad tanto en estudios prospectivos como retrospectivos y se ha visto una evolución clonal. Algunos ejemplos: la delección de 13q- se considera favorable (con una media de supervivencia general de 17 años, en un estudio prospectivo). Las trisomías 12 y 11q- tienen pronósticos menos favorables con una media de 9 a 11 años en un estudio (Dohner y col., 2000; Shanafelt y col., 2006).
- Expresión de la molécula CD38 en linfocitos B: La positividad de CD38 (presencia del antígeno de superficie) se correlaciona con un pronóstico desfavorable, pero existe una tasa de 30% de falsos positivos y 50% de falsos negativos, en los cuales se utiliza la presencia de la mutación en el gen de la IgV_H como método de referencia para el pronóstico (Damle y col., 1999; Ghia y col., 2003).

1.5- Inmunofenotipo de las B-CLL

Las células CLL co-expresan antígenos de células T como CD5 y antígenos de células B como CD19, CD20 y CD23. Los niveles de inmunoglobulinas de membrana, CD20 y CD79b son considerablemente bajos con respecto a los encontrados en células B normales. Cada clon de célula leucémica tiene restringida la expresión de las cadenas livianas *Kappa* o *Lambda* de inmunoglobulinas. Por otro lado, las células B que no expresan CD5 (no leucémicas), suelen expresar altos niveles de CD20 e Ig de superficie (Moreau y col., 1997; Ginaldi y col., 1998; Campo y col., 2008).

1.6- Células madres mesenquimales

La médula ósea (BM, por sus siglas en inglés: *Bone Marrow*) está constituida por una población heterogénea de células, en la cual se han identificado dos grupos principales de células madre adultas: las células madres hematopoyéticas (HSC, por su significado en inglés: *Hematopoietic Stem Cells*) que dan origen a las células

del tejido sanguíneo, y las células madre mesenquimales (MSC, *Mesenchymal Stem Cells*) (Beyer y Da Silva, 2006)

Las células madre mesenquimales (MSC por su siglas en inglés *Mesenchymal Stem Cells*) son un tipo de células madre multipotentes no-hematopoyéticas, presentes en la médula ósea (entre el 0,001-0,01%) y en otros órganos y tejidos, que pueden ser aisladas fácilmente, además pueden ser cultivadas y manipuladas *in vitro* (Yamanaka y col., 2008). Las MSC poseen un gran potencial terapéutico y son usadas en algunos tipos de terapias celulares. Las células madre mesenquimales se originan en la capa germinal mesodermal, tienen morfología tipo fibroblastoide, son células adherentes y se pueden diferenciar *in vitro* en osteocitos, condrocitos, adipocitos, mioblastos, cardiomiocitos, neuronas y astrocitos (Salem y Thiemermann, 2010). “*The Mesenchymal and Tissue Stem Cells Committee of the International Society for Cellular Therapy*” (ISCT) propuso los siguientes criterios para definir las MSC (Dominici y col., 2006):

- Las MSC deben adherirse al plástico cuando se mantienen en condiciones normales de cultivo.
- Más del 95% de la población de MSC debe expresar los antígenos específicos de superficie CD105, CD73 y CD90, adicionalmente, estas células no deben expresar (menos del 2% positivas) CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA de clase II.
- Las células deben ser capaces de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándares de diferenciación celular *in vitro*.

2- Antecedentes

A finales de los años ochenta, Collins y colaboradores observaron que las células B provenientes de sangre periférica de pacientes con leucemia linfocítica crónica, no podían ser mantenidas en condiciones estándares de cultivo (*ex vivo*) durante más de 30 horas, debido a que una proporción significativa de estas células morían por apoptosis de forma espontánea (Collins y col., 1989). En su trabajo evalúan la morfología de las células apoptóticas por microscopía de luz y electrónica. También realizan un ensayo con Ioduro de Propidio y un ensayo de fragmentación del ADN por electroforesis para determinar apoptosis. Los autores concluyen que el hallazgo de que las células B-CLL pueden morir espontáneamente *in vitro* tiene varias implicaciones y sugieren en primer lugar, que se deben evaluar las funciones de las B-CLL y sus interacciones con otros tipos celulares. En segundo lugar, consideran necesario una comprensión de los mecanismos implicados en la inducción de la apoptosis en esta enfermedad, lo cual podría ayudar en el diseño de nuevos blancos terapéuticos (Collins y col., 1989).

No fue sino hasta la década de los noventa que Panayiotidis y colaboradores observaron que las células estromales de médula ósea previenen la apoptosis *in vitro* de las CLL. En su trabajo compararon la viabilidad de células CLL crecidas en medio solo y en co-cultivo con las células estromales obteniendo en este último un aumento significativo en la supervivencia de las B-CLL. Los autores sugieren que el microambiente proporcionado por las células estromales es condición necesaria y suficiente para mantener la supervivencia de las células *ex vivo*, logrando conservar las células hasta 6 semanas. Además destacan la importancia de las interacciones mediadas por moléculas de adhesión como las integrinas. Concluyen que los sistemas de co-cultivo *in vitro* estandarizados para este tipo celular pueden ser usados para analizar los requisitos de crecimiento de las CLL y la quimiosensibilidad en un entorno *in vitro* que simula al entorno *in vivo* (Panayiotidis y col., 1996).

Ese mismo año, Vincent y colaboradores destacaron la importancia de las proteínas de adhesión en la patogenia del CLL. Demostraron que la expresión de la integrina $\alpha 4/\beta 1$ permite la interacción entre los linfocitos B leucémicos y las

moléculas de adhesión vascular en el endotelio (VCAM-1). También describen otras proteínas de adhesión implicadas en la migración e invasión de las CLL a otros tejidos (Vincent y col., 1996).

En 1998, Lagneaux y colaboradores concluyeron en su trabajo que las células B-CLL podían ser rescatadas del proceso de apoptosis si están en contacto con células estromales de médula ósea *in vitro*, pero que esto no ocurría con las células B normales. Estos resultados, sugirieron que la regulación de la supervivencia de estas células está dada, en parte, por el producto del proto-oncogen bcl-2 mediado por las señales de las células estromales, de estar ausente estas señales las células perdían la proteína anti-apoptótica bcl-2. También sugirieron que la interacción entre las células estromales y las B-CLL era mediada en parte por las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ (Lagneaux y col., 1998). La sobreexpresión del producto del gen bcl-2 en las células B en esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1993 por Hanada y colaboradores (Hanada y col., 1993)

Por otra parte, Burger y colaboradores demostraron en 1999 que el receptor CXCR4 está presente (como proteína de superficie y en forma de ARNm) en CLL y que además es funcionalmente activo. Se sugirió que el receptor participa en el proceso de quimiotaxis en el fenómeno de recirculación (*Homing*) de las CLL *in vivo*, siendo la médula ósea uno de los principales órganos implicados. También demostraron que la actividad del receptor puede ser inhibida mediante tratamientos con anti-CXCR4 (mAbs), SDF-1 α o toxina de Pertussis en un ensayo de quimiotaxis *in vitro*. El ensayo consistía básicamente en separar las células mediante un dispositivo especial conocido como inserto de tamaño de poro adecuado, de modo que se colocan las células estromales creciendo en el fondo de un pozo, y encima el dispositivo con las B-CLL, si ocurre quimiotaxis, las células atravesarán la membrana hacia las células estromales. Los autores demostraron que los inhibidores de CXCR4 podían detener la actividad migratoria en estos ensayos (Burger y col., 1999).

Entre los años 2000 y 2003 se destacan trabajos que evalúan algunos de los rasgos distintivos de la histopatología de las B-CLL en los órganos linfoides,

principalmente de los compartimientos de proliferación focales de pro-linfocitos y para-inmunoblastos que dan lugar a los llamados pseudofolículos o centros de proliferación. Los centros de proliferación se ubican en los nódulos linfáticos y la médula ósea (Figura 3A y 3B) (Pileri y col., 2000; Molica y col., 2002; Caligaris-Cappio, 2003). Las interacciones entre la CLL y las células accesorias en los centros de proliferación son críticas para proporcionar señales de crecimiento y la supervivencia de las células B-CLL, induciendo su proliferación. Dicha interacción se asemeja a las interacciones entre las células B normales estimuladas con antígenos y células accesorias (células presentadoras de antígeno y células T).

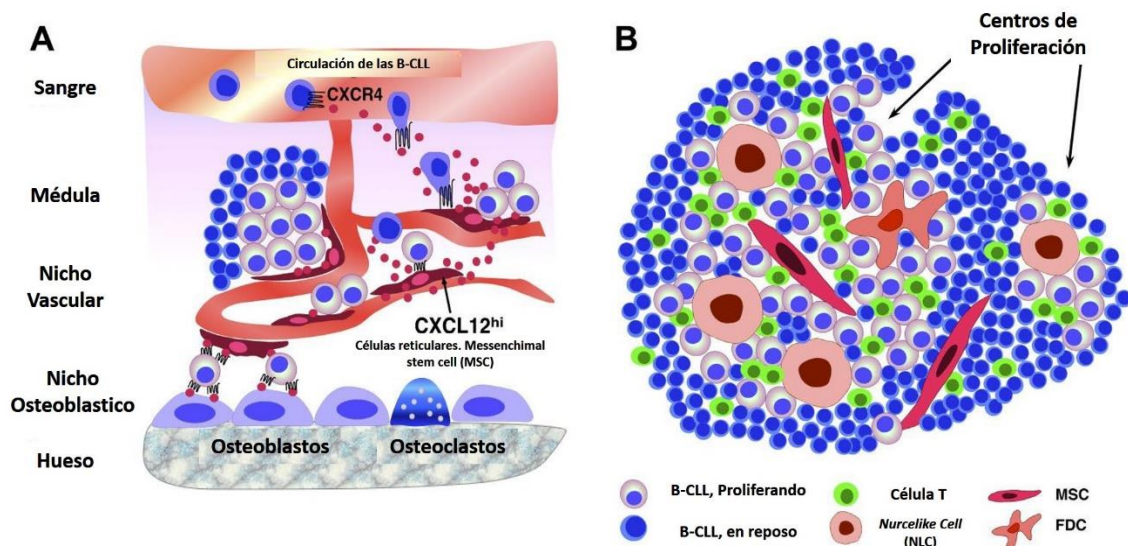


Figura 3. Microambientes en (A) Médula y (B) Tejido linfático en pacientes con CLL. (A) MSC (flecha), se encuentran dispersas por toda la cavidad ósea y co-localizadas en la vasculatura formando los llamados "nichos vasculares". Estas células secretan constitutivamente altos niveles de la quimiocina CXCL12 (SDF-1) y CXCR4. Estas citoquinas atraen a las B-CLL al microambiente celular en médula ósea. (B) Esquema de disposición de los centros de proliferación de CLL en los tejidos linfoides secundarios. Las células de CLL y otras células del linfoma pueden interactuar con una variedad de células accesorias, tales como MSC, NLC (*nurse like cells*) o células derivadas de los monocitos, FDC (*Follicular dendritic cells*) y células T. La formación de los centros de proliferación es un sello distintivo en la histopatología de la CLL. Tomado y modificado de (Burger y Montserrat, 2013).

Trabajos más recientes, como el publicado por Kay y colaboradores en el 2007, lograron mantener cultivos de CLL con otros elementos derivados de médula ósea como células con morfología fibroblastoide, células endoteliales, adipocitos y células fagocíticas. Demostraron que la interacción de estos componentes celulares no solo protegía a las células CLL de la forma espontánea de apoptosis característica, sino también de la apoptosis inducida por drogas. Sugieren que uno de los mecanismos importantes implicados en la patogenia de la enfermedad es la neovascularización o formación de nuevos vasos sanguíneos alrededor de los

centros de proliferación de las B-CLL en la médula ósea. Los autores determinan aumento de al menos dos citoquinas pro-angiogénicas como bFGF, VEGF, y la disminución de proteínas anti angiogénicas como TSP-1 en condiciones de co-cultivo. Todo esto sugiere que el microambiente celular en la médula ósea de los pacientes no solo favorece la supervivencia sino también la propagación de las células malignas (Kay y col., 2007).

Los trabajos realizados en torno a la leucemia linfocítica crónica permitieron definir la importancia del microambiente celular en esta patología. Burger y colaboradores definen en el 2010 que un microambiente es una colección de células y factores extracelulares (como mensajeros químicos), que conforman un entorno local que promueve la supervivencia y proliferación de las células leucémicas. Se han descrito algunas de las células que conforman el microambiente de las CLL, entre ellas se encuentran las células estromales de médula ósea; las células T, que expresan marcadores estimuladores (CD40L) que favorecen el desarrollo de las CLL y facilitan la comunicación con las células presentadoras de antígeno, y esta interacción permite que las B-CLL no se dirijan a apoptosis debido a que reciben señales que promueven su supervivencia (Granziero y col., 2001). También se ha reportado que la sangre de pacientes con CLL contiene células que pueden diferenciarse en células NCL-adherentes (*nurse like cells*) que protegen a las CLL de apoptosis espontánea e inducida (Burger y col., 2000).

En el 2009, Ding y colaboradores determinan que las células madre mesenquimales de médula ósea también ejercen un efecto anti-apoptótico sobre las B-CLL, incluso en condiciones de apoptosis inducida con compuestos antineoplásicos como la fludarabina (Fludara®). También demuestran que el co-cultivo de estas dos células produce regulación positiva en las B-CLL de algunos marcadores como CD71, CD25, CD69 y CD70. Los autores concluyen que entre las MSC y las B-CLL ocurre un proceso de activación bi-direccional evidenciado por la activación de la vía de señalización intracelular de pAKT y pERK. Este trabajo resalta la importancia del microambiente de las B-CLL en médula ósea, y se resalta la importancia de las células madre mesenquimales, por sobre el resto de los

elementos estromales en medula ósea en la patogenia de la enfermedad. En la Figura 4 se observa la infiltración de las B-CLL en medula ósea estableciendo el microambiente de estas células junto con los elementos estromales y las MSC (Ding y col., 2009).

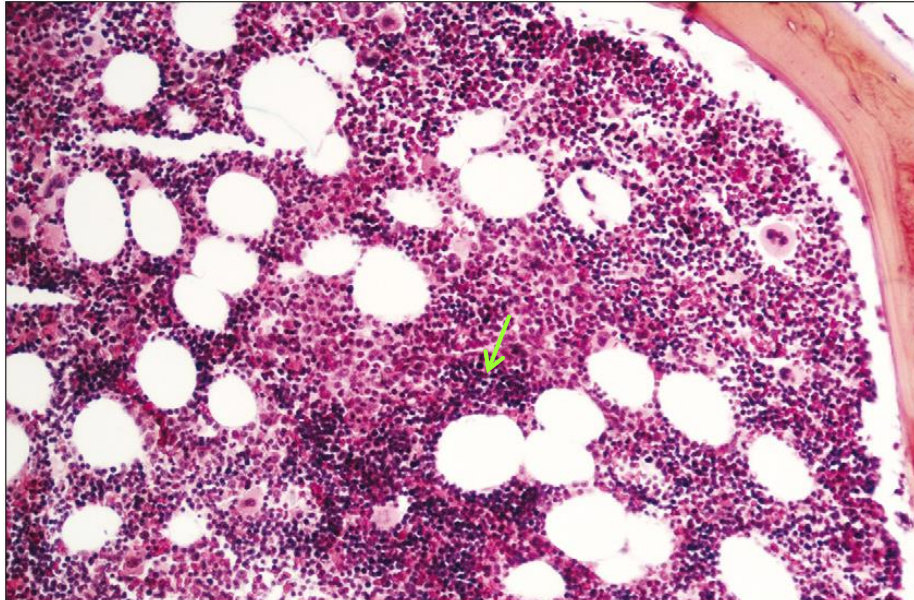


Figura 4. Infiltración de B-CLL en medula ósea. Microfotografía de luz de una sección a través de la médula ósea en un caso de la CLL con una tinción hematoxilina-eosina. Un número anormal de los linfocitos (púrpura, señalados con una flecha verde) se ven infiltrados entre otros tipos celulares en la médula ósea. Magnificación desconocida. Tomado de CNRI/Science Photo Library (www.sciencephoto.com).

Ese mismo año, Kurtova y colaboradores demostraron que diversos tipos de células estromales de medula ósea podía proteger a las B-CLL de apoptosis, incluidas líneas celulares estromales humanas como StromaNKtert, líneas celulares de murino como M210B4, y células mesenquimales humanas de pacientes con CLL y de pacientes sanos. Se observó el efecto de protección durante las 40 horas posteriores de establecidos los co-cultivos con las diferentes líneas celulares, encontrando pocas diferencias entre ellas. En este trabajo se demuestra que todas las células madre mesenquimales fueron capaces de inducir sobrevivencia sobre las B-CLL (Kurtova y col., 2009), lo que permite usar libremente células madre mesenquimales alogénicas en los ensayos de co-cultivo.

La Figura 5 resume algunas de las interacciones descritas entre las B-CLL y las células accesorias. Destacan las interacciones con las NLC y MSC mediadas por citoquinas. Las NLC, expresan quimiocinas como CXCL12 y CXCL13, mientras

que las MSC predominantemente expresan CXCL12. Las integrinas, en particular la integrina VLA-4 (CD49d), expresadas en la superficie de las células de CLL, cooperan con los receptores de quimiocinas en el establecimiento de la adhesión célula-célula, a través de sus respectivos ligandos en las células del estroma (VCAM-1 y fibronectina/FN). Sin embargo, la naturaleza y la fuente de los antígenos y su modo de presentación a las células de CLL, son en gran parte desconocidos. El estímulo del complejo BCR (BCR y CD79_{a, b}) induce la señalización cascada abajo y la activación de SYK, BTK, y PI3K; dicha activación vía BCR hace que las células B-CLL secreten altos niveles de las quimiocinas CCL3 y CCL4, que son atractivos de células T. Las células T interactúan vía CD40 con las B-CLL (Burger y Montserrat, 2013).

En la actualidad, numerosas evidencias sugieren que el desarrollo y progreso de la CLL depende de la interacción de las células con su microambiente, por esta razón las nuevas estrategias terapéuticas parecen apuntar a la interrupción de dicha interacción. Estos nuevos agentes terapéuticos estarían orientados a suprimir el efecto protector de las células del microambiente sobre las células malignas y vencer los mecanismos de resistencia. Estos nuevos tratamientos podrían incluso ser combinados con agentes terapéuticos convencionales (como quimioterapia y quimioinmunoterapia) y así crear un efecto sinérgico (Audrito y col., 2013).

En este trabajo, hacemos especial énfasis en el estudio de las interacciones de las B-CLL con las MSC. Como se describió anteriormente, existen antecedentes que demuestran una supervivencia mayor de las B-CLL cuando están en co-cultivo con las MSC, pero son pocas las evidencias que permiten establecer el mecanismo de interacción definitivo entre estos dos tipos celulares. Algunos autores se inclinan a sugerir que dicha interacción depende del contacto directo de estos dos tipos celulares, y otros sugieren más bien que la interacción depende de factores solubles secretados por las células madre mesenquimales.

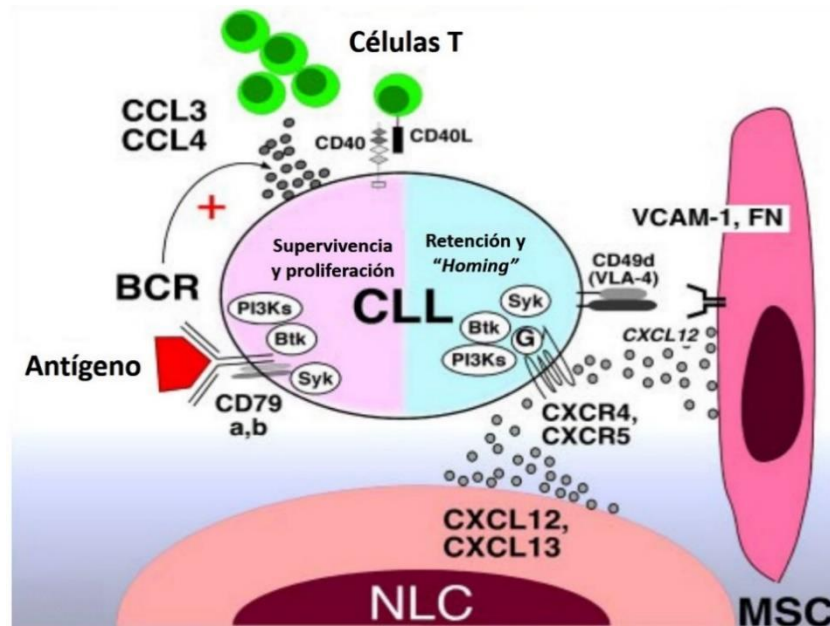


Figura 5. Interacciones moleculares entre las células de CLL y el estroma de la médula ósea y/o microambientes en tejidos linfoides. La estimulación vía BCR quinasa asociadas pueden influir en la supervivencia CLL. El contacto entre las células de CLL y NLC o células madre mesenquimales (MSC) es establecido y mantenido por los receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión expresadas en células de CLL. SYK, BTK, y las PI3K están involucrados en los receptores de quimiocinas, la molécula de adhesión de señalización y activación vía BCR. La naturaleza y la fuente de antígenos y su modo de presentación a las células de CLL son en gran parte desconocidos. Tomado y modificado de (Burger y Montserrat, 2013).

Además de estos aspectos es importante evaluar cómo se altera algunos antígenos de superficie en las CLL luego del co-cultivo con las MSC que podrían estar influyendo en el desarrollo de la enfermedad. Entre estos el receptor CXCR4 para la quimiocina CXCL12 que participa como ya se mencionó en el proceso de quimiotaxis. La molécula CD25 marcador de activación celular, la expresión del receptor BCR (IgM) y de la molécula CD20 que es el ligando de uno de los anticuerpos terapéuticos comerciales (*Rituximab*) usados para el tratamiento de esta enfermedad, así como determinar la expresión de proteínas de regulación de complemento (CD55 y CD59) que podrían estar afectando la efectividad de Rituximab. Un mejor conocimiento de la interacción entre el B-CLL y las MSC permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas o el perfeccionamiento de otras ya existentes para pacientes que padezcan de esta enfermedad.

3- Objetivos

Objetivo General

- Estudiar *in vitro* la interacción entre linfocitos B provenientes de pacientes con leucemia Linfocítica Crónica, y células madre mesenquimales de médula ósea humana.

Objetivos específicos

- Determinar la supervivencia de los linfocitos B de pacientes con CLL luego de ser cultivados sobre una monocapa de MSC.
- Determinar la supervivencia de los linfocitos B de pacientes con CLL luego de ser cultivados con MSC separados por un inserto o luego de su cultivo con medio condicionado de MSC.
- Determinar la variación en la expresión de antígenos de superficie en las B-CLL luego de los co-cultivos con MSC.

4- Materiales y Métodos

4.1- Materiales

4.1.2- Medios de Cultivo y soluciones

Preparación de α -MEM-CHANG: El medio α -MEM-CHANG es una mezcla de diversos medios comerciales y sueros que fue estandarizada para el cultivo de MSC en el Laboratorio de Patología Celular y Molecular y la Unidad de Terapia Celular (UTC) en el IVIC (Triana y Villa, 2009). El medio se compone de un 58% de α -MEM 1X (*Mínimum Essensial Medium*) (Invitrogen™), 18% CHANG B 1X (IrvineScientific ®), 20% suero fetal bovino para células madre 1X (SBF Life technologies™), 2% de CHANG C 1X (IrvineScientific ®), 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina 10,0 μ g/mL; estreptomina 0,85%) (Invitrogen™) y 1% de L-Glutamina (200 mM) (Invitrogen™). Este medio se almacena a 4°C (Triana y Villa, 2009).

Preparación de medio de criopreservación para MSC: se preparó con 80% de suero fetal bovino para células madre, 10% de α -MEM 1X (Invitrogen™) y 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma™). El medio se puede almacenar durante una semana protegido de la luz a -20°C.

Medio condicionado (MC): este tipo de medio contiene componentes biológicamente activos obtenidos a partir de células previamente cultivadas, que han liberado al medio sustancias que pueden afectar ciertas funciones celulares. Se obtiene de sobrenadantes de los cultivos con un 70-80% de confluencia y se almacena a -20°C luego de centrifugar a 320 g para eliminar cualquier resto de células.

Medio condicionado de la interacción (MCi): contiene al igual que el medio condicionado los componentes biológicamente activos obtenidos a partir de células previamente cultivadas, pero se obtiene de sobrenadantes de co-cultivos de B-CLL y MSC luego de la primera semana de co-cultivo, se almacena igualmente a -20°C luego de centrifugar a 320 g para eliminar cualquier resto de células.

Buffer Fosfato Salino (PBS) (10X) pH 7,2: en 800 mL de agua destilada se disolvieron 80 g de cloruro de sodio (NaCl), 11,5 g de fosfato hidrogenado de sodio (Na₂HPO₄), 2 g de fosfato di-hidrogenado de potasio (KH₂PO₄) y 2 g de cloruro de potasio (KCl), y se ajustó el pH a 7,2 con ácido clorhídrico (HCl) y se llevó a 1 L como volumen final. Esta solución fue almacenada a 4°C.

Buffer Fosfato Salino (PBS) (1X) pH 7,2: se añadió 450 mL de agua destilada a 50 mL de PBS 10X pH 7,2. Esta mezcla se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm y se almacenó a 4°C.

Buffer Fosfato Salino (PBS) (1X) pH 7,2 al 1% de SFB: la solución PBS 1X fue suplementado con 1% de SFB (Gibco) y se conservó a 4°C.

Buffer Fosfato Salino (PBS) (1X) pH 7,2 al 2% de SFB: la solución PBS 1X fue suplementado con 2% de SFB (Gibco) y se conservó a 4°C.

Buffer de unión del estuche comercial de Anexina-V/ Ioduro de Propidio (1X): se añadieron 1 mL del Buffer proporcionado en el estuche comercial en 10 mL del *Buffer Fosfato Salino (PBS) (1X) pH 7,2*.

4.1.3- Anticuerpos monoclonales y su especificidad

4.1.3.1- Especificidad de los anticuerpos utilizados para caracterizar las MSC

Se evaluó la expresión de diferentes moléculas en la superficie de las MSC de medula ósea humanas para caracterizar las mismas. Se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra las siguientes moléculas humanas:

Anti-CD29: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con PE clon MAR4 que reconoce las moléculas CD29 o integrina beta 1 (ITG-β1), una integrina que actúa como receptor de membrana durante la adhesión celular para las proteínas de la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, colágeno, laminina y vitronectina

(Carlos y Harlan, 1994). Esta proteína se expresa en numerosos tipos celulares, incluidas células T activadas, plaquetas, células endoteliales y células dendríticas (Mcintyre y col., 1991).

Anti-CD31: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con FITC clon WM59 que reconoce las moléculas CD31 o PECAM-1, una glicoproteína de membrana que se expresa constitucionalmente en la superficie de células endoteliales, plaquetas y algunos leucocitos. CD31 interviene en la adhesión leucocitaria al endotelio (Deans y Moseley, 2000).

Anti-CD34: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con FITC clon 8G12 que reconoce las moléculas CD34, una sialomucina expresada en progenitores hematopoyéticos y tejido vascular. Es una molécula de adhesión (Deans y Moseley, 2000).

Anti-CD45: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con FITC clon 2D1 que reconoce las moléculas CD45, una proteína tirosina fosfatasa conocida como el antígeno común leucocitario, expresada en células hematopoyéticas, excepto eritrocitos y plaquetas (Fainboim y Geffner, 2005).

Anti-CD49b: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con FITC clon AK-7 que reconoce las moléculas CD49b expresadas en la superficie de varios tipos de células incluyendo células T, células NK, fibroblastos y plaquetas. CD49b es una integrina involucrada en la adhesión celular que también participa en la señalización celular (Moroi y Jung, 1997).

Anti-CD73: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con PE clon AD2 que reconoce las moléculas CD73 (ecto-5'-nucleotidasa), proteína expresada en la superficie de células T y B, que cataliza la conversión de purinas y pirimidinas en ribonucleótidos y deoxirribonucleótidos monofosfatos al correspondiente nucleósido. Sirve como molécula co-estimuladora de células T inactivadas (Resta y Thompson, 1997).

Anti-CD90: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con PE clon 5E10 que reconoce las moléculas CD90 o Thy-1 expresadas en la superficie celular de células madre mesenquimales, timocitos, neuronas, células madre hematopoyéticas. CD90

es una glicoproteína de membrana que puede estar involucrada en la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular, regeneración nerviosa, apoptosis e inflamación (Ades y col., 1980).

Anti-CD14: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con PE clon 61D3 que reconoce moléculas de CD14. Esta es una glicoproteína de 53-55 KDa unida a GPI. CD14 se expresa en monocitos, macrófagos interfoliculares y algunas células dendríticas. Los complejos de LPS y LBP (proteína de unión al LPS) se unen con alta afinidad a los monocitos a través de la superficie CD14 (Schlossman y Bloumsell, 1995).

Anti-CD116: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con PE clon hGMCSFR-M1 que reconoce moléculas CD116. El anticuerpo hGMCSFR-M1 reacciona con la subunidad (GM-RFCE) del complejo receptor humano del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. La cadena α parece transmitir la mayor parte de las señales biológicas. GM-RFCE se expresan por una variedad de líneas celulares mieloides, células hematopoyéticas y no hematopoyéticas tumorales, y tipos de células normales, incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas mieloides, células endoteliales, fibroblastos, y trofoblastos placentarios (Eder y col., 1994).

Anti-CD105: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con FITC clon 266 que reconoce moléculas CD105. CD105 presenta una proteína de membrana con homodímero de subunidades de 95 KDa que se encuentran en las células y los sincitios de los trofoblastos de la placenta endoteliales vasculares. CD105 se expresa débilmente en los fibroblastos del estroma (Wang y col., 1993).

Isotipo: Anticuerpo monoclonal de ratón, control IgG1 conjugado con PE clon MOPC-21 y control IgG2a conjugado con FITC clon G155-178. Este anticuerpo, usado como control negativo, es específico contra la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que no está presente ni es inducible en los tejidos de mamíferos (BD® US).

4.1.3.2- Especificidad de los anticuerpos utilizados para caracterizar las B-CLL

Se evaluó la expresión de diferentes moléculas en la superficie de las células B leucémicas para lo cual se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra las siguientes moléculas humanas:

Anti-CD5: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con PE clon UCHT2 que reconoce las moléculas CD5, un antígeno asociado a células T, que también se expresa en subpoblaciones de células B. CD5 media la transducción de señales (Yamaguchi y col., 2002).

Anti-CD19: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con FITC clon V3-119 que reconoce las moléculas CD19 que se expresa específicamente en células B. CD19, forma un complejo en conjunto con CD81 y CD21, actúa como un correceptor, mejora la señalización y el procesamiento del antígeno por los receptores de las células B en respuesta al antígeno (Ingle y col., 2008).

Anti-CD20: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con FITC clon B9E9 que reconoce las moléculas CD20 que se expresa específicamente en células B. CD20 es una proteína transmembrana que interviene en el crecimiento, activación y mantenimiento de las células (Cragg y col., 2005).

Anti-CD25: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con PE clon ACT-1 que reconoce las moléculas CD25, una proteína transmembrana que forma parte del receptor IL-2, que también actúa en la homeostasis de esta interleucina. CD25 se expresa en células T activadas, células B activadas, precursores mieloides, timocitos y oligodendrocitos (Miyamoto y col., 2010).

Anti-CD55: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con PE clon JS11 que reconoce las moléculas CD55 humanas. CD55 es también conocida como factor acelerador de la degradación (DAF, por sus siglas en inglés) es una proteína fijada covalentemente en la membrana plasmática y se encarga de disociar la convertasa C3 por lo que actúa regulando la vía clásica y alterna del sistema de complemento. (Kindt y col., 2007).

Anti-CD59: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a PE clon p282 (H19) que reconoce las moléculas CD59 humanas. CD59 también conocido como factor de restricción homólogo (*HRF*, por sus siglas en inglés), o también llamado inhibidor de lisis reactiva (*MIRL*, por sus siglas en inglés) evita el ensamblaje de poli-C9 y bloquean la formación del complejo de ataque a membrana (*MAC*, por sus siglas en inglés) (Kindt y col., 2007).

Anti-CXCR4: Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a PE-Cy5 clon 12G5 que reconoce el receptor CXCR4 (CD184) humanas. CXCR4 es un miembro de la familia de receptores de quimiocinas acoplado a proteína G con siete dominios que abarcan la membrana, funciona como un correceptor para IL-2 (Bleul y col., 1997; Mcknight y col., 1997).

Anti-IgM (BCR): Anticuerpo monoclonal de ratón conjugado a PE clon R5111 que reconoce la IgM de membrana. Este anticuerpo es especialmente útil para la subtipificación de células pre-B de la leucemia linfoblástica aguda, células B de leucemia linfoblástica aguda y crónica de células, entre otros. La mayoría de las células B y células plasmáticas maduras, expresa esta inmunoglobulina en su superficie (Gandini y col., 1993).

Isotipo: Anticuerpo monoclonal de ratón, control IgG1 conjugado con PE clon MOPC-21 y control IgG2a conjugado con FITC clon G155-178. Este anticuerpo, usado como control negativo, es específico contra la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que no está presente ni es inducible en los tejidos de mamíferos. (BD® US).

4.1.3.3- Otros reactivos y materiales

Ficoll-Hypaque™: el Ficoll es un polisacárido hidrofílico que genera un gradiente de densidad que es utilizado generalmente para la separación de células mononucleares de sangre periférica (d=1,077 g/mL). (GE Healthcare ®)

TrypLE™ Express (Invitrogen™): tripsina recombinante que se utiliza para despegar células adherentes en sistemas de cultivos, la tripsina se deja actuar durante 5 minutos a 37°C. El TrypLE™ se caracteriza por tener propiedad auto-

proteolítica por lo que se degrada pasado un tiempo y evita daño celular en el cultivo en el cual se use.

RosetteSep: cóctel de anticuerpos RosetteSep, cuya técnica se basa en la selección negativa de las células B, mediante su incubación con anticuerpos monoclonales específicos tanto para antígenos expresados por las células no deseadas, como para la glicoforina A presente en los glóbulos rojos, seguido de la centrifugación sobre un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. De esta manera, se precipitan las poblaciones celulares no deseadas (linfocitos T, NK, monocitos, polimorfonucleares y plaquetas) que se encuentran formando rosetas con los glóbulos rojos y se obtienen poblaciones celulares altamente enriquecidas en células deseadas.

Estuche I de detección Anexina-V/FITC: contiene Anexina-V conjugada con el fluorocromo FITC en un buffer acuoso compuesto por BSA y 0,09% de azida de sodio; una solución colorante de yoduro de propídeo (PI) de 2,0 mL en PBS (pH 7,4) y un buffer de unión de Anexina-V. La Anexina-V es una proteína que se une a fosfolípidos dependiendo del calcio (Ca^{2+}), que tiene alta afinidad por la fosfatidilserina (PS). Este compuesto se une a las células cuando éstas exponen la PS. Como la externalización de PS ocurre en estadios tempranos de la apoptosis, el marcaje con Anexina-V-FITC pueden identificar la apoptosis en los primeros estadios. Este marcaje precede la pérdida de la integridad de la membrana que acompaña los estadios tardíos de la muerte celular que resulta tanto de la apoptosis como de la necrosis. De esta manera, este marcaje está típicamente acompañado de un colorante vital como el PI, que permite identificar células apoptóticas (positivo para Anexina-V y negativo para PI) (BD pharmingen™).

Inserto (membrana de *ThinCerts*™ de *Greiner bio-one*): una cesta de plástico translúcida de poliestireno, que se adapta a las placas de 24 pozos de *Greiner bio-one* y que en el fondo contiene un entramado de polietileno tereftalato que forma una membrana permeable de tamaño de poro 1 μm o 3 μm .

Citómetro de flujo *FACScalibur* (*Becton-Dickinson*): junto con el programa de análisis *CellQuest*™ y *CellQuest*™ Pro.

4.2- Células madre mesenquimales

4.2.1- Aislamiento

Antes de establecer los co-cultivos con las B-CLL se prepararon, con aproximadamente una semana de anticipación, los cultivos de células madre mesenquimales de médula ósea humana. Las células madre mesenquimales procedían de pacientes con patologías traumatológicas pero sanos desde el punto de vista hematológico, a los que se les ha practicado aspiración de médula ósea para protocolos de regeneración ósea (bajo consentimiento informado) aprobado por el comité de bioética del Hospital Universitario y del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (ver *Anexos*). El aspirado de médula ósea se realizó en el Hospital Universitario, las células fueron aisladas en la Unidad de Terapia Celular (UTC) en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para este estudio se usaron las células de dos donantes previamente caracterizadas por citometría de flujo y ensayos de diferenciación *in vitro* y posteriormente almacenadas por criopreservación en la UTC. Las células fueron descongeladas para su uso y se emplearon los cultivos entre el pase tres y cuatro para establecer los co-cultivos.

4.2.2- Cultivo

Para realizar los cultivos de MSC, se procedió a descongelar un vial de células de la UTC (pase dos) previa autorización, el vial se descongeló a baño de maría en condiciones de asepsia por algunos minutos en medio α -MEM-CHANG en condiciones de asepsia. Con las células descongeladas se realizó una caracterización por citometría de flujo con los marcadores de superficie típicos de células madre mesenquimales y se expandieron las células. Para expandir el cultivo se sembraron 4×10^4 células por mL en varios T-25 (*CellStar*® *Greiner Bio-One*) (Vf= 5 mL) para iniciar los cultivos, los T-25 se almacenaron en una incubadora a 37°C con 5% CO₂ hasta obtener una confluencia de 70-80%, la mitad del medio de cultivo fue sustituida por medio fresco cada dos días para mantener los factores celulares.

Luego de obtenida la confluencia deseada, se procedió a despegar las células del fondo de los frascos de cultivo, primero se descartó el sobrenadante y

se agregaron 5 mL de TrypLE™ por frasco (*Invitrogen™*) (tripsina recombinante), se dejó actuar durante 5 minutos a 37°C en la incubadora, luego se verificó que las células se habían despegado en un microscopio de fase invertida, los sobrenadantes se transfirieron a un tubo plástico (*Falcon™*), se lavó con medio α -MEM-CHANG y se centrifugó a 161 g (centrifuga HERMLE z 360k) durante 10 minutos con freno a temperatura ambiente. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 2 mL de medio α -MEM-CHANG. Posteriormente se contaron las células en la cámara de Neubauer, se agregaron 10 μ L de la suspensión celular en un eppendorf y se le agregó 10 μ L del colorante azul de tripano; se colocaron 10 μ L de la mezcla en el hematocitómetro (o cámara de Neubauer) y se observó al microscopio a 10X de aumento. El colorante azul de tripano tiñe las células muertas de color azul, lo que permite estimar la viabilidad de células además de estimar la concentración del cultivo. Se utilizó la siguiente relación matemática para estimar la concentración celular en la suspensión:

$$\text{Concentración (cel/mL)} = \frac{\text{número de células contadas viables} \times 10.000}{\text{Número de cuadros contados} \times \text{dilución}}$$

Una vez estimada la concentración de la suspensión celular se procedió a repartir las células en frascos de cultivo y placas para realizar los ensayos de co-cultivo con las B-CLL. Se sembraron 2 frascos T-25 con una concentración de 4×10^5 células por mL para un volumen final de 5 mL por frasco y una placa de cultivo de 24 pozos (*CellStar® Greiner Bio-One*) con una concentración de 8×10^4 por mL para un volumen final de 0,5 mL por pozo. Para llegar a las concentraciones de células indicadas se utilizó medio α -MEM-CHANG para diluir la suspensión celular. Los cultivos de MSC se almacenaron en una incubadora a 37°C con 5% CO₂. La mitad del medio de cultivo fue sustituida por medio fresco cada dos días para mantener los factores celulares, para los frascos T-25 se extrajeron 2,5 mL y se agregaron 2,5 mL de medio fresco; para las placas de 24 pozos se extrajeron 0,25 mL de medio y se agregaron 0,25 mL de medio fresco. Este protocolo se realizó una semana antes de establecer los co-cultivos para cada uno de los pacientes de leucemia que se usó en este trabajo.

4.2.3- Caracterización

Se realizó una caracterización adicional de las MSC de cada vial que se descongeló de la UTC. Una vez descongeladas y contadas las células se distribuyeron a razón de 2×10^5 células por cada marcaje que se realizó. Se evaluaron los siguientes marcadores de superficie en las MSC: CD45, HLA-DR, CD34, CD90, CD49b, CD29, CD73 y CD31 utilizando los siguientes anticuerpos conjugados a un fluorocromo:

Tabla 3. Anticuerpos de detección usados para las MSC

Anticuerpo	Fluorocromo conjugado	Casa comercial
α -CD34	FITC	BD ®
α -CD90	PE	BD ®
α -CD49b	FITC	BD ®
α -CD14	PE	eBioscience ®
α -CD45	FITC	BD ®
α -CD116	PE	BD ®
α -CD31	FITC	BD ®
α -CD29	PE	BD ®
α -CD105	FITC	BD ®
α -CD73	PE	BD ®
Isotipo IgG _{2a}	FITC	BD ®
Isotipo IgG ₁	PE	BD ®

“ α -...”dirigido contra, específico a anti; Isotiocianato de fluoresceína: FITC por sus siglas en Inglés; Ficoeritrina: PE por sus siglas en Inglés. La cantidad de anticuerpo agregada es la recomendada por la casa comercial.

Adicionalmente se usó un control de autofluorescencia (en la que se agregaron solo las células sin adicionar ningún anticuerpo de detección); como se contaba con varios anticuerpos de detección conjugados a fluorocromos que emiten en diferentes espectros de fluorescencia además con un citómetro de flujo que permite detectar más de dos espectros de fluorescencia al mismo tiempo, se realizaron las siguientes combinaciones de anticuerpos de detección: Autofluorescencia; Isotipo IgG₁/IgG_{2a}; α -CD34/ α -CD90; α -CD49b/ α -CD14; α -CD45/ α -CD116; α -CD31/ α -CD29 y α -CD105/ α -CD73. Los anticuerpos se incubaron

durante 20 minutos en frío y protegido de la luz. Luego se lavaron con PBS-SFB 1% y se centrifugaron a 362 g (centrifuga eppendorf 5415 C) durante 10 minutos. Al finalizar el lavado se resuspendió el botón celular en PBS 1X y se transfirió el volumen a los tubos de citometría y se realizó la lectura en el citómetro de flujo FACScalibur (*Becton-Dickinson*TM).

4.3- B-CLL (linfocitos B de pacientes con leucemia linfocítica crónica)

4.3.1- Aislamiento y purificación

Las muestras de sangre procedieron de pacientes diagnosticados con leucemia linfocítica crónica que acudieron a la consulta del Banco Municipal de Sangre del D.C. (Fundasangre ©). Todos los pacientes que aparecen en este estudio firmaron un consentimiento informado con aprobación del comité de bioética del Banco de sangre del D.C. y del IVIC (ver *Anexos*). Las muestras fueron recolectadas con solución anticoagulante, aproximadamente 6 mL por paciente. Las células B se aislaron de las muestras de sangre usando el coctel de anticuerpos monoclonales del estuche comercial *RosetteSep*® (*StemCell technologies*®) en condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar. Este coctel de anticuerpos consiste en un complejo tetramérico (TAC) que se une tanto a la glicoforina A presente en los eritrocitos como antígenos presentes en las células no deseadas (CD2⁺, CD3⁺, CD16⁺, CD56⁺, CD36⁺, CD66b⁺), de manera que selecciona de forma negativa las células B. El complejo tetramérico (TAC) al unirse a la glicoforina A y a las células no deseadas forma un inmunocomplejo (rosetas), que puede ser separado centrifugando a través de un gradiente de densidad *Ficoll*TM (Figura 6).

Al tubo con la sangre se le añadieron 50 µL del coctel *RosetteSep*® (*StemCell technologies*®) por cada mL de sangre. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos agitando periódicamente. Luego de 20 minutos, se agregaron 4 mL de PBS-SFB 2% para diluir la muestra. En un tubo de 15 ml se agregaron 4 mL de *Ficoll*TM (*GE Healthcare*®), la muestra diluida con PBS-SFB 2% se transfirió al tubo con el *Ficoll*TM. Se centrifugó a 447 g durante 30 minutos sin freno. Posteriormente se procedió a aspirar la capa de células enriquecidas en linfocitos B que se

encuentra en la interfase entre el *Ficoll*[™] y el plasma como se detalla en la Figura 6. Las células B aisladas se transfirieron a un tubo estéril. Luego se realizaron dos lavados para eliminar el *Ficoll*[™] residual, el suero y las plaquetas; un lavado a 161 g y un segundo lavado a 90,6 g con PBS-SFB 2% ambos con freno durante 10 minutos (Protocolo de *Stemcell Technologies* Inc.).

Luego de los lavados, se resuspendió el botón celular en 5 mL de medio α -MEM-CHANG y se contaron las células con una tinción de azul de tripano, usando un hematocitómetro (o cámara de Neubauer) agregando 10 μ L de la suspensión celular y 10 μ L del colorante. Conocida la concentración de la suspensión celular y su viabilidad inicial se procedió a establecer los co-cultivos, a realizar la caracterización fenotípica inicial y verificación de pureza por citometría de flujo.

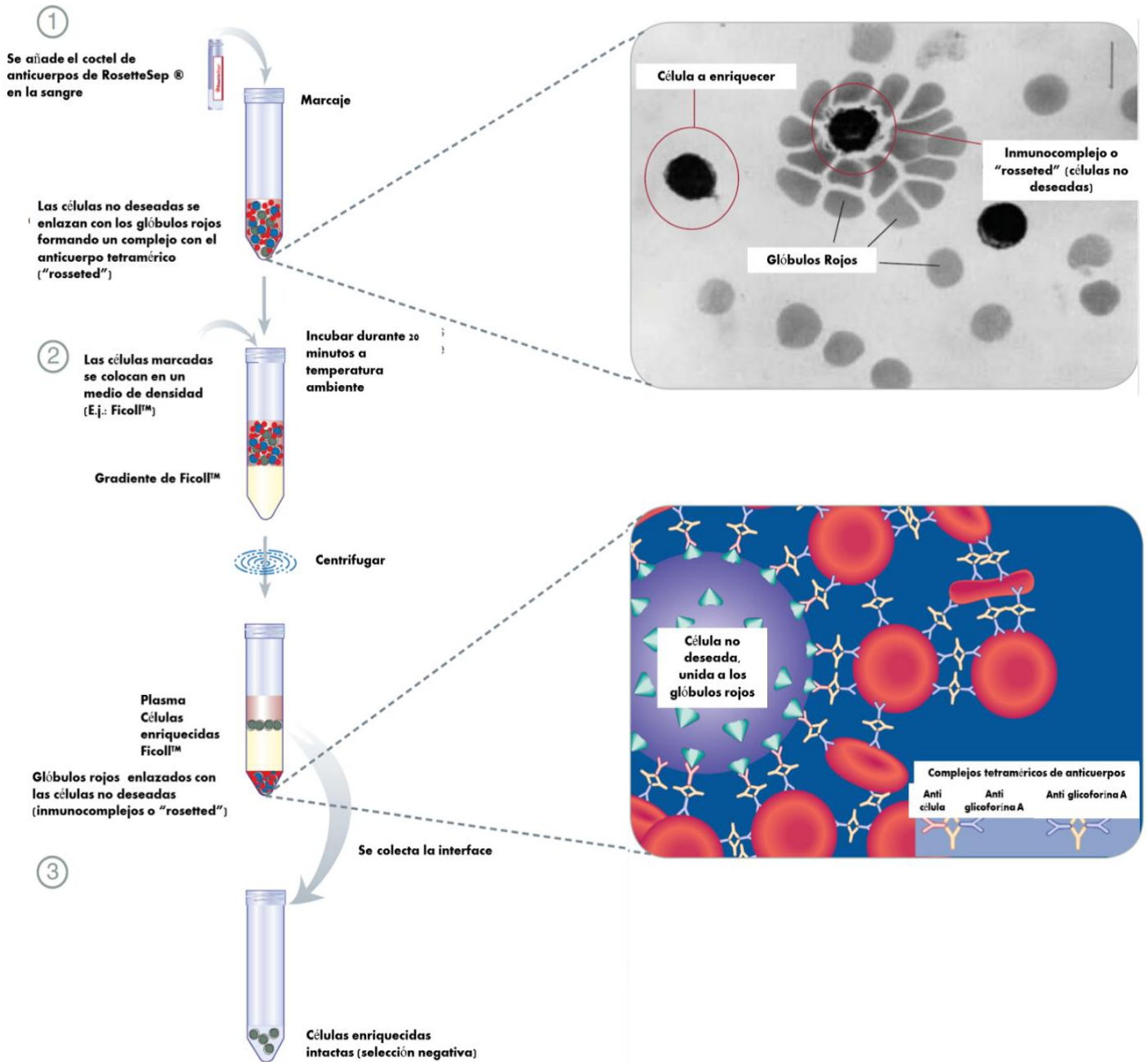


Figura 6. Metodología general de RosetteSep® (1) Se agregó el coctel de anticuerpos. (2) Se centrifugó a 447 g junto con un gradiente de densidad. (3) Se colectó la fracción enriquecida en la célula de interés. Nótese en la microscopía de luz la formación de las rosetas. Tomado y modificado de *StemCell technologies®*.

4.3.2- Caracterización fenotípica inicial y pureza

Se realizó una caracterización inicial y evaluación de la pureza de las B-CLL aisladas para cada paciente estudiado en este proyecto. Una vez aisladas las B-CLL mediante el estuche comercial de RosetteSep se distribuyeron las células a razón de 2×10^5 células por cada marcaje que se realizó. Se evaluaron los siguientes

marcadores de superficie en las B-CLL: CD20, IgM, CD19, CD5, CD55, CD59, CXCR4 y CD25 utilizando los siguientes anticuerpos conjugados a un fluorocromo:

Tabla 4. Anticuerpos de detección usados para las B-CLL

Anticuerpo	Fluorocromo conjugado	Casa comercial
α -CD20	FITC	<i>Inmunotech™</i>
IgM	PE	<i>Dako®</i>
CD19	FITC	<i>Inmunotech™</i>
CD5	PE	<i>BD®</i>
CD55	PE	<i>Biolegend™</i>
CD59	PE	<i>Biolegend™</i>
CXCR4	PE-Cy5	<i>eBioscience™</i>
CD25	PE	<i>MACS®</i>
Isotipo IgG ₁	PE	<i>BD®</i>
Isotipo IgG _{2a}	FITC	<i>BD®</i>

“ α -...” dirigido contra, específico a anti; Isotiocianato de fluoresceína: FITC por sus siglas en Inglés; Ficoeritrina: PE por sus siglas en Inglés; PE-Cy5 Complejo ficoeritrina y Cy5. La cantidad de anticuerpo agregada es la recomendada por la casa comercial.

Adicionalmente se usó un control de Autofluorescencia (en la que se agregaron solo las células sin adicionar ningún anticuerpo de detección); como se contaba con varios anticuerpos de detección en diferentes espectros de fluorescencia se realizaron las siguientes combinaciones de anticuerpos de detección: Autofluorescencia; Isotipo IgG₁/IgG_{2a}; CD20/IgM; CD19/CD5; CD55; CD59 y CXCR4/CD25. Los anticuerpos se incubaron durante 20 minutos en frío y protegido de la luz. Luego se lavaron con PBS-SFB 1% y se centrifugaron a 362 g (centrifuga *ependorf* 5415 C) durante 10 minutos. A finalizar el lavado se resuspendió el botón celular en PBS 1X y se transfirió el volumen a los tubos de citometría y se realizó la lectura en el citómetro de flujo *FACScalibur* (*Becton-Dickinson™*). Para evaluar la pureza de la suspensión celular enriquecida en B-CLL se evaluó la co-expresión de los antígenos CD19 y CD5 en un diagrama de puntos, el porcentaje de células que expresan ambos antígenos nos permitió determinar el porcentaje de pureza.

4.3.3- Cultivo

Con la suspensión celular ya aislada y caracterizada, y los cultivos de MSC ya establecidos se procedió a establecer los co-cultivos, para cada paciente analizado en este trabajo se realizaron los mismos ensayos que se describen a continuación:

4.3.3.1- Co-cultivos con MSC

Se ajustó la concentración de células aisladas a 5×10^6 células por mL de medio α -MEM-CHANG; de los cultivos de MSC en frascos T-25 se extrajo 1 mL de medio y se agregó 1 mL de la suspensión celular de B-CLL junto con las MSC ya en cultivo. En los co-cultivos realizados en los frascos T-25 se evaluó la variación en la expresión de ciertas moléculas de superficie a las dos semanas a partir del momento en el que se establecieron los co-cultivos. Para las placas de 24 pozos se ajustó la concentración a 2×10^6 células por mL; de los cultivos de MSC en placas de 24 pozos se extrajeron 0,25 mL de medio en 4 pozos y se agregaron 0,25 mL de la suspensión celular de B-CLL en los 4 pozos de modo que ahora ambos tipos celulares se encuentran creciendo en los pozos. Para llegar a las concentraciones de células indicadas se utilizó medio α -MEM-CHANG para diluir la suspensión celular. Estos cultivos se mantuvieron durante dos semanas en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% CO_2 y sustituyendo aproximadamente la mitad del volumen del medio por medio fresco cada tres días.

4.3.3.2- Co-cultivos con insertos (*ThinCerts*[™])

Usando la misma placa en la que previamente se sembraron las MSC, se ajustó la concentración de la suspensión celular de B-CLL aislada a 2×10^6 células por mL; se extrajeron 0,25 mL de medio en 4 pozos y se colocaron dos dispositivos *ThinCerts*[™] o inserto de tamaño de poro 3 μm en dos de los pozos de MSC, y dos de tamaño de poro 1 μm . Se agregaron 0,25 mL (0.5×10^6 células) de la suspensión celular de B-CLL en la parte superior de los insertos de modo que los co-cultivos quedaron establecidos tal y como indica la Figura 7 para un volumen final de 0,5 mL por pozo. Para llegar a las concentraciones de células indicadas se utilizó medio α -MEM-CHANG para diluir la suspensión celular. Estos cultivos se mantuvieron

durante dos semanas en una atmosfera húmeda a 37°C con 5% CO₂ y sustituyendo aproximadamente la mitad del volumen del medio por medio fresco cada tres días.

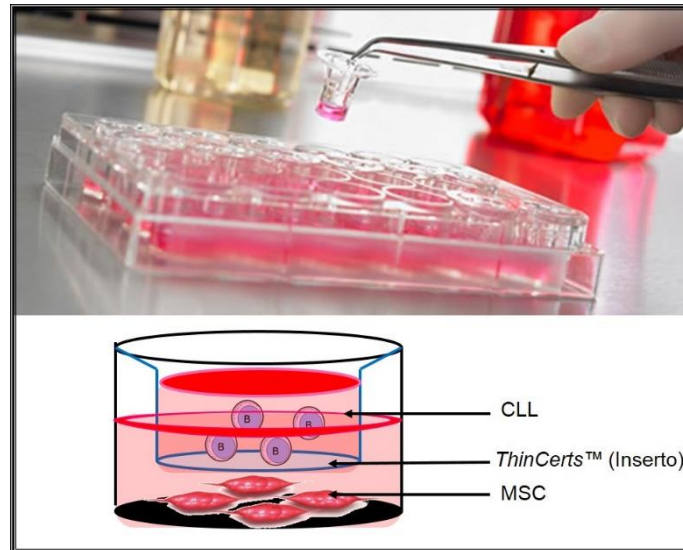


Figura 7. Dispositivo *ThinCerts*[™] o inserto (arriba) el dispositivo se manipula con una pinza estéril para proteger el cultivo de la contaminación. Esquema de colocación del dispositivo en el co-cultivo, las células madre mesenquimales se cultivaron en el fondo del pozo, luego se colocó el dispositivo con los linfocitos B de pacientes con CLL (abajo).

4.3.3.3- Cultivos con medio condicionado

Usando otra placa de cultivo de 24 pozos en la que no están sembradas MSC, se ajustó la concentración de la suspensión celular de B-CLL aisladas a 2×10^6 células por mL y se agregaron 0,25 mL en dos pozos, en esos mismos pozos se agregaron 0,15 mL de medio fresco, y luego 0,10 mL de medio condicionado (MC) en uno de los pozos y 0,10 mL de medio condicionado de la interacción (MCi) al pozo restante. El volumen final por pozo fue de 0,5 mL. De esta forma la relación fue de 80% medio fresco y 20% medio condicionado. El medio condicionado de MSC se obtuvo de cultivos de estas células con un 70-80% de confluencia a los cuales no se les había sustituido el medio en los últimos tres días. El medio condicionado de la interacción se obtuvo de co-cultivos de células madre mesenquimales con B-CLL a los cuales no se les había sustituido el medio en los últimos tres días. Estos cultivos se mantuvieron durante dos semanas en una atmosfera húmeda a 37°C con 5% CO₂ y sustituyendo aproximadamente la mitad del volumen del medio por la mezcla de medio condicionado-medio fresco cada tres días.

4.3.3.4- Cultivos de B-CLL solo con medio

Usando la misma placa en la que se previamente se sembraron las B-CLL con medio condicionado, se ajustó la concentración de la suspensión celular de B-CLL aisladas a 2×10^6 células por mL y se agregaron 0,25 mL por pozo en cuatro pozos, se agregaron 0,25 mL de medio fresco para un volumen final de 0,5 mL. Estos cultivos se mantuvieron durante dos semanas en una atmosfera húmeda a 37°C con 5% CO₂ y sustituyendo aproximadamente la mitad del volumen del medio por medio fresco cada tres días.

4.3.4- Ensayos de viabilidad y detección de moléculas de superficie

4.3.4.1- Marcaje con Anexina-V/PI

Luego de transcurridas una y dos semanas de establecidos los co-cultivos, los cultivos con medio condicionado y con medio solo, se evaluó la viabilidad de las B-CLL usando el estuche comercial *FITC Annexin-V Apoptosis Detection Kit I* (BD *pharmingen*TM). En los co-cultivos con MSC se extrajo el sobrenadante de dos pozos resuspendiendo gentilmente las células B dentro de cada pozo con la pipeta, el volumen se transfirió a un tubo eppendorf y se lavó con 1 mL de PBS 1X a 362 g (centrifuga eppendorf 5415 C) durante 10 minutos. Para los co-cultivos con el dispositivo de *ThinCerts*TM de 3 µm, se extrajo el volumen de uno de los pozos por encima del dispositivo resuspendiendo con la pipeta gentilmente, el volumen se transfirió a un tubo eppendorf y se lavó con 1 mL de PBS 1X a 362 g (centrifuga eppendorf 5415 C) durante 10 minutos. En el caso del dispositivo de *ThinCerts*TM de 3 µm se evaluó también las células que atravesaron la membrana, de modo que se retiró el inserto y se extrajo el sobrenadante del pozo y se lavó de la misma forma con PBS 1X. Para los co-cultivos con el dispositivo de *ThinCerts*TM de 1 µm se extrajo el volumen del dispositivo por encima de uno de los pozos, resuspendiendo con la pipeta gentilmente la suspensión celular, se lavó igualmente con PBS 1X. Para las B-CLL con medio condicionado y medio solo se extrajo el volumen del pozo, se transfirió a un eppendorf y se lavó con PBS 1X de la misma forma.

Luego de los lavados, las células se resuspendieron en 100 µL del Buffer de unión (1X) proporcionado en el estuche comercial. En ese volumen se agregaron 5

μL de Anexina-V-FITC y 5 μL de PI. Se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego se agregaron 200 μL del buffer de unión y se procedió a la lectura en el citómetro de flujo. Este protocolo se realizó de la misma manera tanto para evaluar la viabilidad en la semana uno, como en la semana dos. En la semana dos no se evaluaron los medios condicionados (MC y MCi)

Con esta metodología se evaluó la viabilidad de las B-CLL durante la primera y segunda semana luego de establecer los cultivos con las B-CLL (Figura 9). El uso combinado de la Anexina-V-FITC y el IP permitió identificar las células vivas (no marcadas), células apoptóticas (se marcan con Anexina-V-FITC o con Anexina-V-FITC y PE) y células necróticas (se marcan solo con PI).

4.3.4.2- Ensayo de detección de moléculas de superficie en B-CLL

A partir de los co-cultivos establecidos en los frascos T-25 se evaluó la expresión de los marcadores de la tabla 4 (menos CD5 y CD19) a las dos semanas de establecidos los co-cultivos. Se extrajo el volumen del T-25 y se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL, se lavó con 10 mL PBS-SFB 1X y se centrifugo a 90,6 g. El botón celular se resuspendió en PBS-SFB 1% y se contaron las células con una tinción de azul de tripano, usando un hematocitómetro (o cámara de Neubauer) agregando 10 μL de la suspensión celular y 10 μL del colorante. Conocida la concentración de la suspensión celular se ajustó a 2×10^6 células con PBS-SFB 1% y se repartieron 100 μL de la suspensión en cada tubo eppendorf para el marcaje, como se contaba con varios anticuerpos de detección en diferentes espectros de fluorescencia se realizaron las siguientes combinaciones de anticuerpos de detección: autofluorescencia; Isotipo IgG₁/IgG_{2a}; CD20/IgM; CD55; CD59 y CXCR4/CD25, para un total de 5 tubos. Los anticuerpos se incubaron durante 20 minutos en frío y protegido de la luz. Luego se lavaron con PBS-SFB 1% y se centrifugaron a 362 g (centrifuga eppendorf 5415 C) durante 10 minutos. A finalizar el lavado se resuspendió el botón celular en PBS 1X y se transfirió el volumen a los tubos de citometría y se realizó la lectura en el citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson™).

4.4- Esquema resumen de los cultivos y ensayos realizados

En la Figura 8 se resume en un esquema general de los experimentos y ensayos realizados en el proyecto

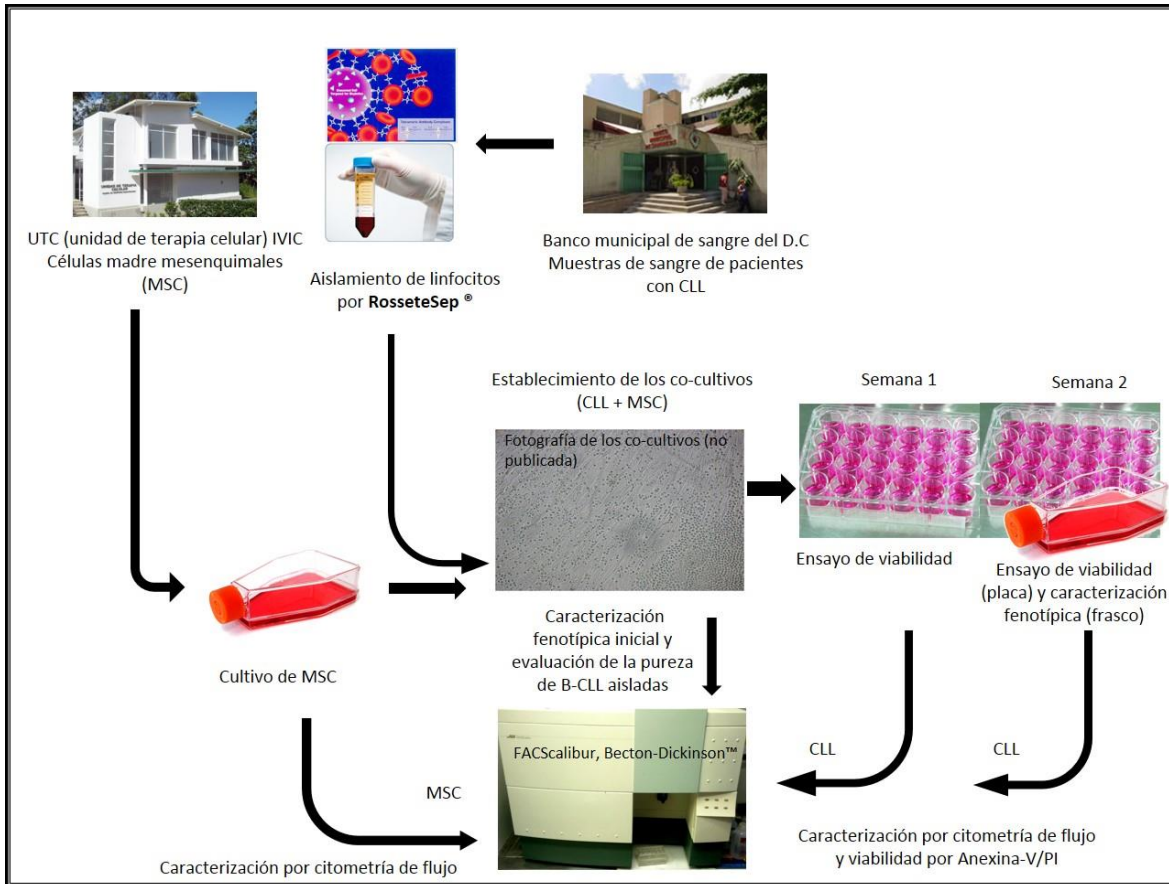


Figura 8. Esquema resumen de la metodología de cultivo, co-cultivo, caracterización y determinación de la viabilidad. Las células B-CLL y MSC fueron aisladas, se establecieron los co-cultivos, y se evaluaron la viabilidad de las B-CLL durante dos semanas y expresión de marcadores en la superficie solo en la semana dos.

4.5- Análisis de resultados

El análisis de los resultados de citometría de flujo se realizó utilizando el programa *CellQuest™* y *CellQuest™ pro* (BD Biosciences) del citómetro *FACScalibur* de *BD™*. Algunos gráficos de los resultados de citometría de flujo son mostrados utilizando el programa *FCS 4 Express™ Image Cytometry* de la compañía *De Novo™*.

Para determinar el porcentaje de células vivas en los histogramas para los marcajes dirigidos a antígenos de superficie se usó el control "isotipo" como límite inferior o valor de corte para considerar un resultado positivo, el valor de intensidad media de fluorescencia es reportado por el programa de citometría de flujo.

Para los experimentos de viabilidad se usó como control en los gráficos de puntos el valor de autofluorescencia, el cual sirvió para establecer los cuadrantes en el análisis de viabilidad por Anexina-V/ Ioduro de Propidio, tal como reporta la casa comercial del estuche. El porcentaje de células no marcadas ubicadas en el cuadrante inferior izquierdo corresponde a las células vivas. Las células necróticas se ubican en el cuadrante superior izquierdo y las células apoptóticas en el cuadrante inferior derecho. Las células que son doblemente marcadas, ubicadas en el cuadrante superior derecho (Necróticas-Apoptóticas) se consideran dentro del porcentaje de células apoptóticas. El programa de citometría de flujo calcula el porcentaje de células en cada cuadrante.

Para determinar las diferencias tanto entre los porcentajes de células positivas y las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de los antígenos de superficie se usó un análisis de t de student pareado comparando los resultados de la expresión inicial con los obtenidos a la segunda semana, para cada antígeno de superficie analizado en las B-CLL por citometría de flujo. Para comparar las diferencias estadísticamente significativas entre las células vivas de los cultivos se empleó la prueba de análisis de varianza de una vía (*ANOVA* por sus siglas en Ingles) y se compararon los porcentajes de células vivas obtenidos en las diferentes condiciones en la semana 1 y en la semana 2 (se realizó un análisis diferente para cada semana). Los resultados obtenidos con los medios condicionados también se analizaron utilizando un *ANOVA*. También se compararon los porcentajes de apoptosis en las diferentes condiciones luego de la primera semana de co-cultivo con un *ANOVA*.

5- Resultados

5.1- Caracterización de Células Madre Mesenquimales

Se evaluó la expresión de marcadores de linaje típicos de MSC en los dos pacientes utilizados luego de descongelar las células con la finalidad de corroborar sus características de MSC humanas. Las MSC de estos pacientes fueron previamente caracterizadas mediante citometría de flujo y por su capacidad de diferenciación en diferentes linajes antes de la criopreservación, mostrando capacidad de diferenciación osteogénico, condrogénico y adipogénico. En la Figura 9 se reporta un ejemplo representativo, de una caracterización fenotípica realizada por citometría de flujo de las MSC obtenidas de uno de los pacientes utilizados en este proyecto.

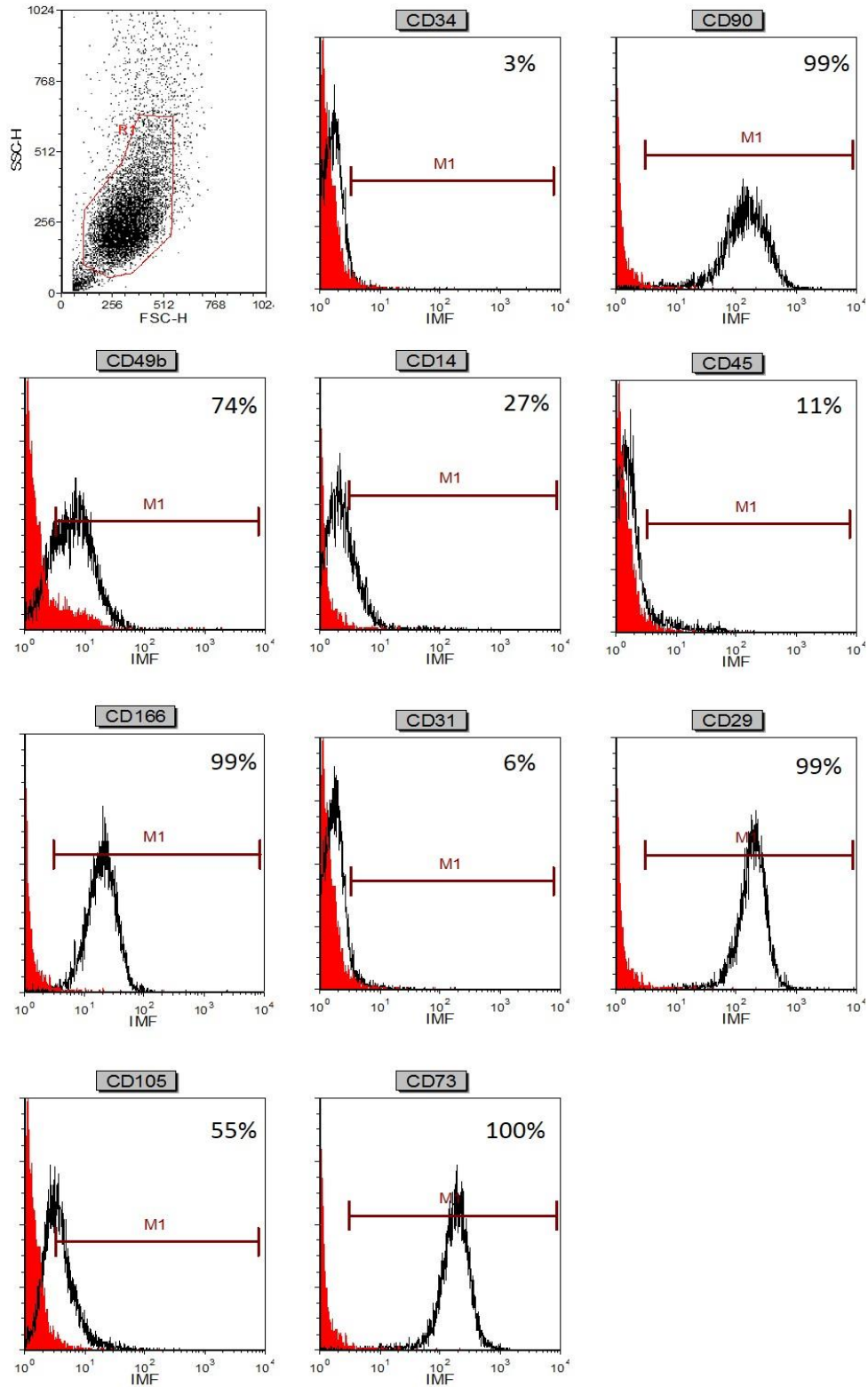


Figura 9. Histogramas y grafico de puntos obtenidos a partir de la citometría de flujo de las células mesenquimales de un paciente donde se reporta, una elevada expresión en la superficie de las moléculas CD90, CD49b, CD116, CD29, CD105, CD73 y ausencia o baja expresión de las moléculas CD34, CD14, CD45, y CD31. El porcentaje de células positivas determinado por la región M1 se ha obtenido utilizando el control del isotipo (Histograma Rojo). El eje "Y" corresponde al número de eventos del citómetro de flujo.

La Figura 9 muestra una elevada expresión en la superficie de las MSC de las moléculas CD90, CD49b, CD116, CD29, CD105, CD73 y baja expresión de las moléculas CD34, CD14, CD45, y CD31.

Luego de realizada la caracterización, se realizó el cultivo de MSC en las placas de 24 pozos y en los frascos de cultivo T25. La figura 10 muestra un cultivo de MSC con distintas confluencias, A: 20%, B: 70%, C: 100%. En esta fotografía se evidencia la propiedad de adherencia al plástico formando una monocapa y su morfología típica fibroblastoide.

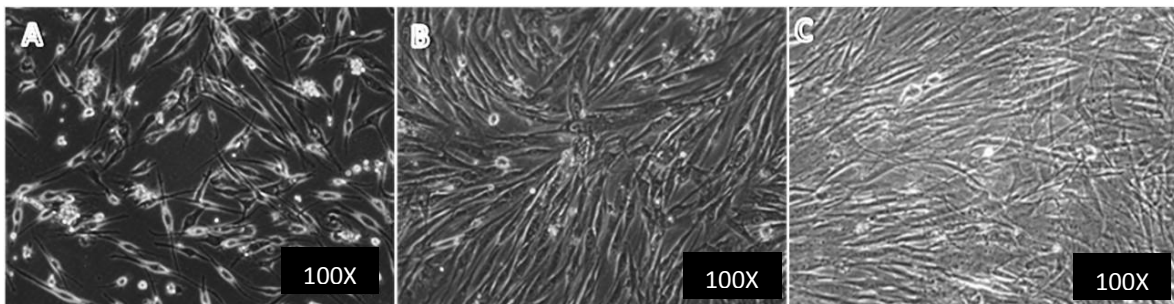


Figura 10: fotografía de cultivo de MSC a diferentes confluencias. A: 20% de confluencia, B: 70% de confluencia, C: 100% de confluencia. Se evidencia la morfología típica fibroblastoide. Las fotografías fueron capturadas usando una cámara CMOS Camera: IS1000/ IS500/ IS300/ IS130 acoplada a un microscopio de fase invertida Zeiss, en un aumento de 100X y mediante una interfaz proporcionada por el programa IScapture ver. 2.6 de Xintu Photonics Co., Ltd.

5.2- Caracterización de los linfocitos B de pacientes con Leucemia

Linfocítica Crónica

Una vez aislados los linfocitos B a partir de la muestra de sangre mediante el método de *RosetteSep*[®] (*StemCell technologies*[®]) se realizó una citometría de flujo para determinar su pureza y sus características fenotípicas iniciales. La Figura 11 muestra un diagrama de puntos (*Dot plot*) en donde se observa la expresión de las moléculas CD5 y CD19, las cuales son expresadas en los linfocitos B leucémicos.

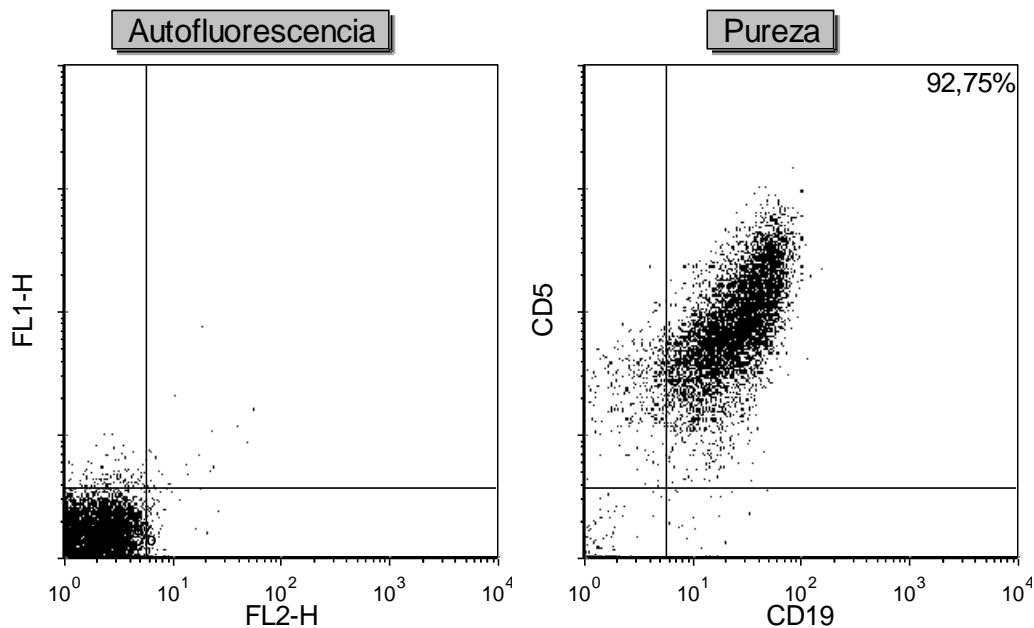


Figura 11: Diagrama de puntos para un paciente representativo luego del aislamiento de los linfocitos B. En el primer diagrama se muestra el control de autofluorescencia el cual sirve para fijar el valor de corte. En segundo diagrama se muestra la población celular (B-CLL) que co-expresó las moléculas CD5 y CD19 con un porcentaje de 92,75%.

En Figura 11 se muestra la población celular que co-expresan los antígenos CD5/CD19 y que corresponde a las B-CLL. Esta población representa cerca del 92,75% de las células aisladas. Se obtuvieron porcentajes similares (>90%) de pureza de las B-CLL, en todos los pacientes analizados.

En la Figura 12 se presenta el Inmunofenotipo inicial de los linfocitos B provenientes de un paciente con CLL, en la que se muestran los histogramas para las diferentes moléculas analizadas CD20, IgM, CD55, CD59, CXCR4 y CD25. En cada histograma encontramos el porcentaje de células positivas obtenido a partir de la comparación con su respectivo control de isotipo (población coloreada en rojo en el histograma). También se muestra la distribución de las B-CLL según su tamaño versus su granularidad celular.

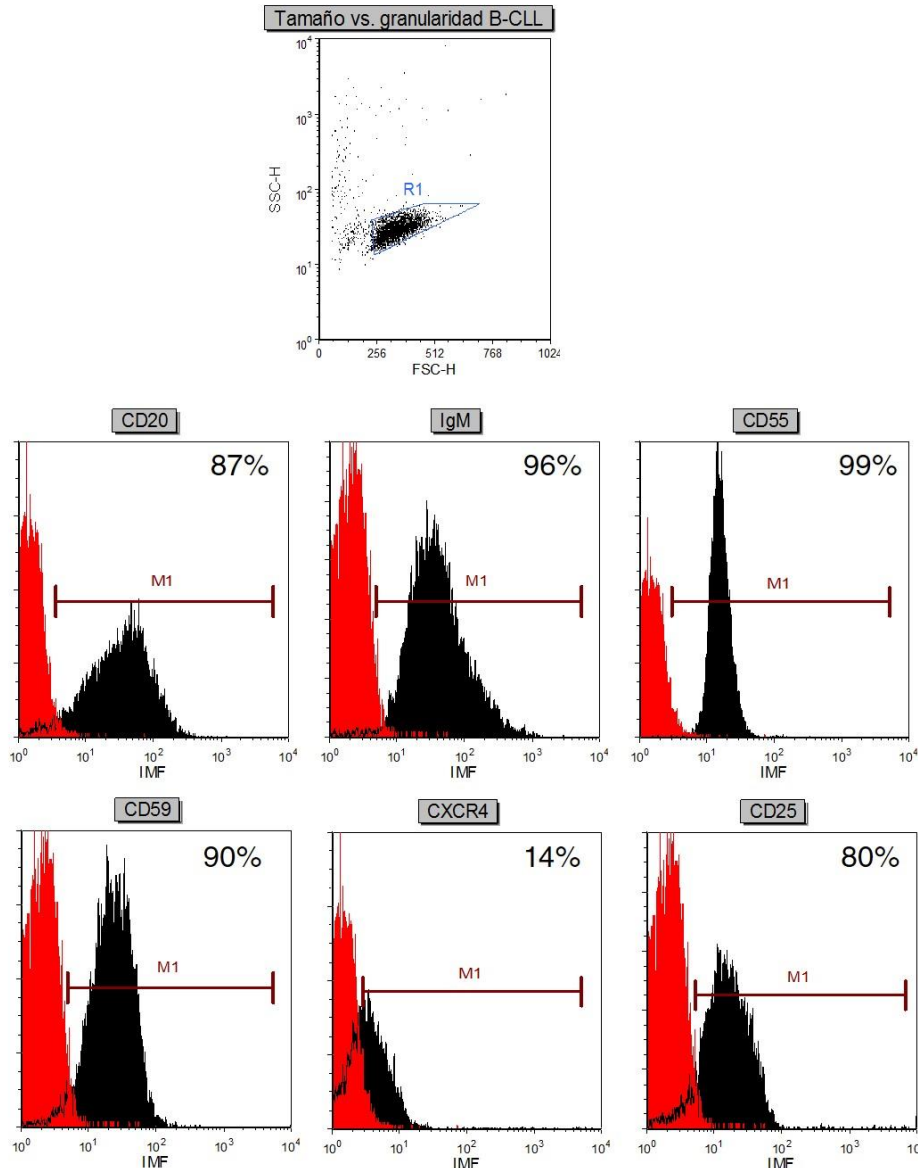


Figura 12. Ejemplo del análisis por citometría de flujo de las B-CLL de un paciente. En la parte superior se muestra un diagrama de tamaño vs. Granularidad con la población de linfocitos B seleccionada. En la parte inferior se muestran los histogramas con los diferentes marcadores evaluados inicialmente, el control de isotipo se muestra como la población en rojo en cada marcaje, en negro la población que expresa ese marcador. El porcentaje de células positivas determinado por la región M1 se ha obtenido utilizando el control del isotipo (Histograma Rojo).

En general el porcentaje inicial de células positivas para CD20, CD55 y CD59 fue siempre elevado (entre un 90 a un 100% de las células en los pacientes analizados); por otro lado el porcentaje de células positivas para IgM fue bastante variable inicialmente, con pacientes con un porcentaje de células positivas superior al 90% como en el ejemplo de la Figura 12 y otros pacientes con un porcentaje inferior al 30% de células positivas. Al igual que con CD20, el porcentaje de células positivas para CXCR4 fue también muy variable, con pacientes con un porcentaje

de células positivas muy bajo como el ejemplo de la Figura 12, y otros con porcentajes superiores al 50%. CD25 fue otro marcador variable entre los pacientes analizados, con porcentajes de células positivas que iban desde 30 al 80%.

5.3- Variación en la expresión de antígenos de superficie en B-CLL luego del co-cultivo con MSC

Una vez realizada la caracterización de las B-CLL inicial y establecidos los co-cultivos con las MSC, se evaluó la expresión de estos mismos marcadores en las B-CLL luego de dos semanas de co-cultivo para determinar si habían diferencias con respecto a la expresión inicial. Para determinar dicha variación se tomaron en cuenta dos parámetros diferentes; el porcentaje de células positivas para ese marcador y su intensidad media de fluorescencia (IMF).

En la Figura 13 se muestran las gráficas de los promedios obtenidos de los porcentajes de células positivas (con sus respectivos errores estándares) de todas las moléculas analizadas, en donde podemos comparar el porcentaje de células positivas antes de realizar el co-cultivo y luego de dos semanas de co-cultivo con MSC. No se observaron diferencias significativas para las moléculas CD20, IgM, CD55 y CD59 en donde los porcentajes de células positivas se mantuvieron casi sin variación a las dos semanas de co-cultivo con las MSC. A diferencia de CXCR4, la cual mostró una disminución significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje de células positivas luego del co-cultivo con MSC. Por su parte, CD25 mostró un aumento significativo ($p < 0,01$) en el número de células positivas luego del co-cultivo.

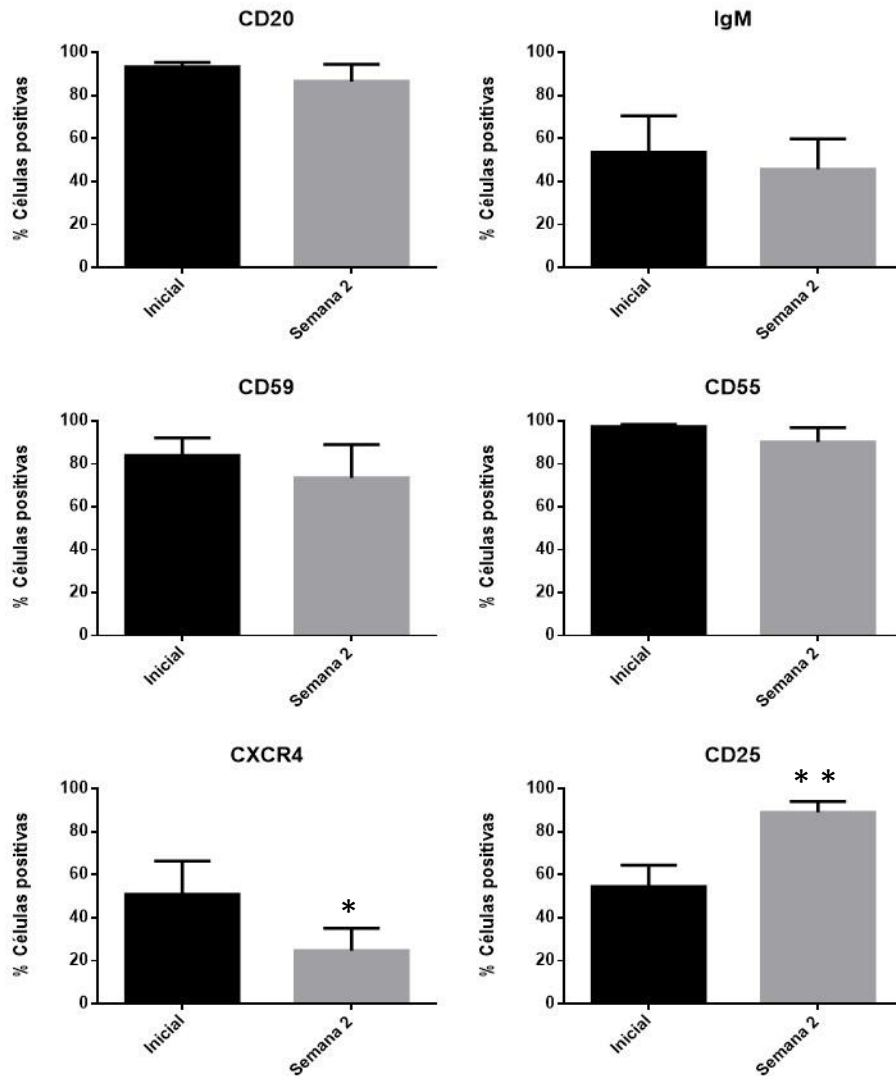


Figura 13. Análisis del porcentaje de células positivas para los antígenos de superficie en B-CLL. Gráficos de barra en los que se representa el promedio del porcentaje de células positivas (con sus respectivos errores estándares) de cada uno de los antígenos de superficie evaluados en las B-CLL y donde se comparan su valor inicial con el obtenido por citometría de flujo luego de dos semanas de co-cultivo con las MSC. Se muestra los antígenos de superficie evaluados; CD20 (n=8), IgM (n=6); CD55 (n=6), CD59 (n=6), CXCR4 (n=6), CD25 (n=7). Se evidenció una disminución significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje de células positivas para CXCR4 luego de las dos semanas de co-cultivo con las MSC, también se evidenció un aumento significativo ($p < 0,01$) en el porcentaje de células positivas para CD25 luego de dos semanas de co-cultivo con MSC.

Al mismo tiempo, se evaluó la variación en la IMF de las moléculas de superficie analizadas en las B-CLL antes y después del co-cultivo con MSC; el valor de la IMF permite determinar han aumentado o disminuido la cantidad de copias del receptor expresadas sobre la superficie celular. La Figura 14 muestra las gráficas de los promedios obtenidos con su respectivo error estándar, de la IMF inicial y de la obtenida luego de dos semanas de co-cultivo con las B-CLL. Algunos antígenos de superficie mostraron una disminución estadísticamente significativa, tal como CD20 ($p < 0,01$) e IgM ($p < 0,05$), luego del co-

cultivo con MSC. A diferencia de la molécula CD59 la cual mostro un aumento significativo ($p < 0,05$) al ser co-cultivadas con las MSC. Para el caso de CD55, CXCR4 y CD25 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en sus IMF luego de las dos semanas de co-cultivo.

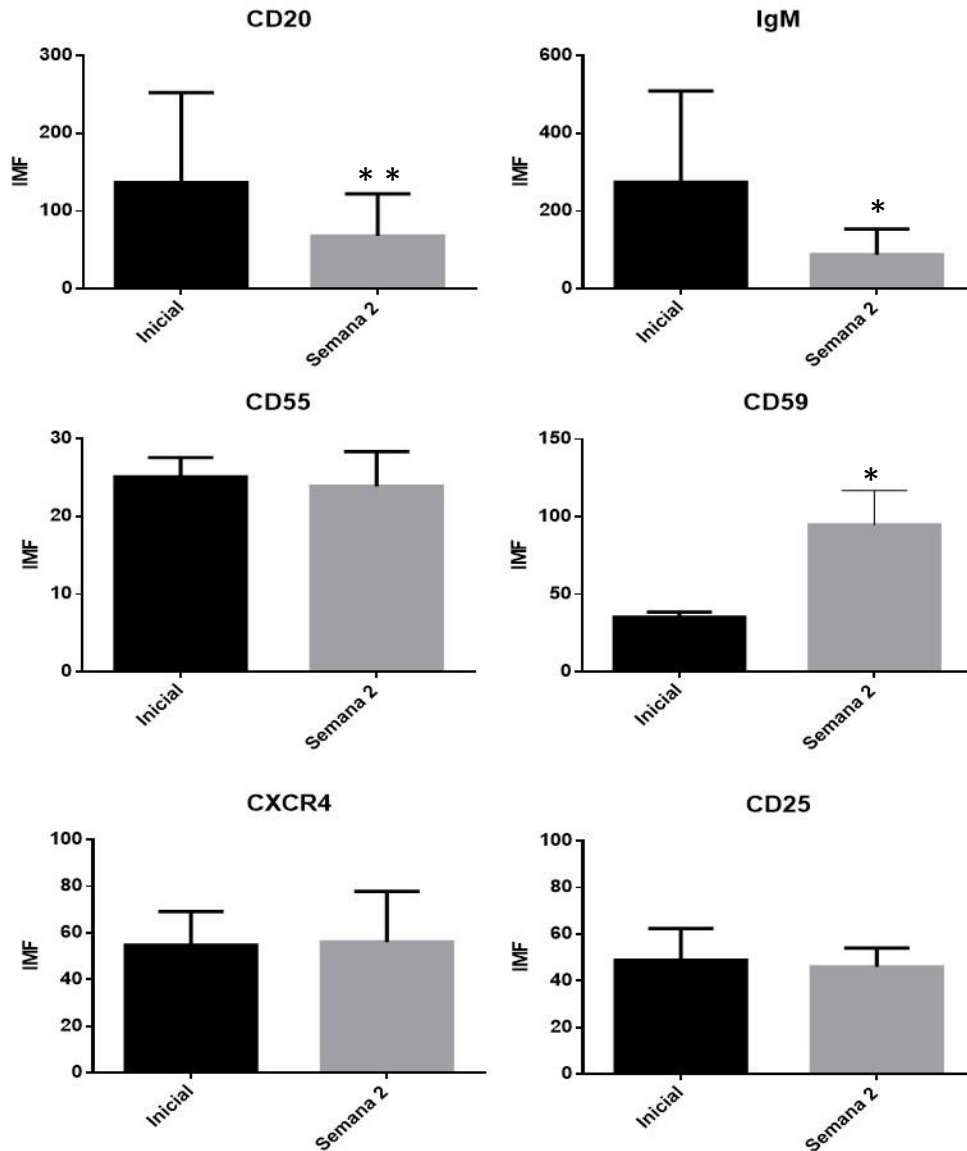


Figura 14. Análisis de la intensidad media de fluorescencia para los antígenos de superficie en B-CLL. Gráficos de barra en los que se representa la intensidad media de fluorescencia promedio (con sus respectivos errores estándares) de cada uno de los antígenos de superficie evaluados en las B-CLL y donde se comparan su valor inicial con el obtenido por citometría de flujo luego de dos semanas de co-cultivo con las MSC. Se muestra los antígenos de superficie evaluados; CD20 (n=8), IgM (n=6); CD55 (n=6), CD59 (n=6), CXCR4 (n=6), CD25 (n=7). Se evidenció una disminución significativa en la IMF para CD20 ($p < 0,01$) e IgM ($p < 0,05$) luego de las dos semanas de co-cultivo con las MSC, también se evidenció un aumento significativo ($p < 0,05$) en la IMF para CD25 luego de dos semanas de co-cultivo con MSC.

5.4- Viabilidad en ensayos de co-cultivo y medio condicionado

En los ensayos de cultivo que se realizaron en placas de 24 pozos se evaluó la viabilidad de las B-CLL en condiciones de co-cultivo con MSC y solo con medio, la Figura 15 se muestra en el panel A una fotografía realizada en un microscopio de fase invertida luego de una semana de cultivo donde destacan las B-CLL (flecha azul) de forma esférica en co-cultivo con las MSC (flecha roja) con morfología fibroblastoide; en el panel B se muestra una fotografía realizada en un microscopio de fase invertida luego de una semana de cultivo donde destacan las B-CLL creciendo solo con medio, los círculos rojos indican células con una morfología aparentemente apoptótica o necrótica (células muertas).

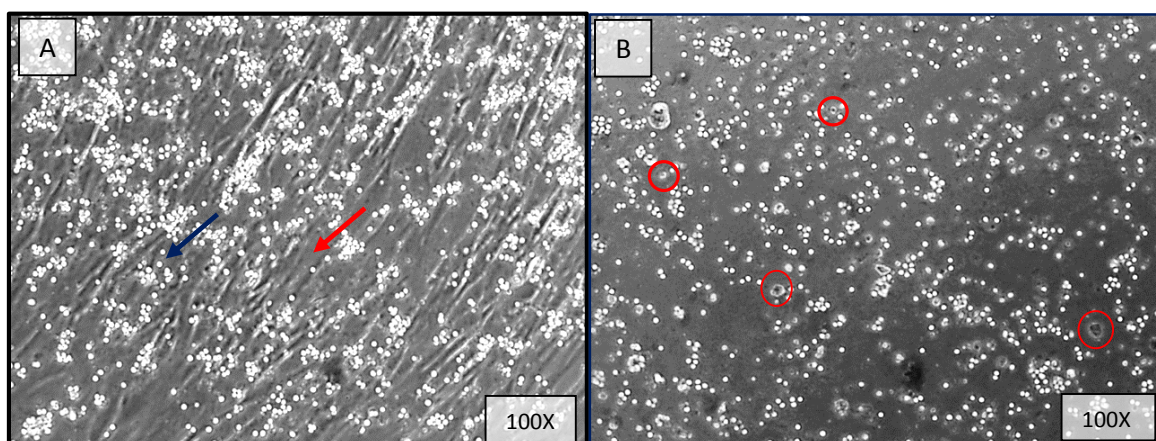


Figura 15. (A) Fotografía de una microscopía de luz luego de una semana de cultivo donde destacan las B-CLL (flecha azul) de morfología esférica en co-cultivo con las MSC (flecha roja) con morfología típica tipo fibroblasto; (B) Fotografía de una microscopía de luz luego de una semana de cultivo donde destacan las B-CLL solas, la círculo rojos destacan células con una morfología aparentemente apoptótica o necrótica (células muertas). Las fotografías fueron capturadas usando una cámara CMOS Camera: IS1000/ IS500/ IS300/ IS130 acoplada a un microscopio de fase invertida Zeiss, en un aumento de 100X y mediante una interfaz proporcionada por el programa IScapture ver. 2.6 de Xintu Photonics Co., Ltd.

Una vez realizados los cultivos, se evaluó el porcentaje de células B-CLL vivas luego de la primera y segunda semana de establecidos los mismos, utilizando el ensayo de Anexina-V/ Ioduro de propídio en las distintas condiciones de cultivo establecidas. En la Figura 16 (A) se muestra un ejemplo representativo de los resultados obtenidos de un ensayo de evaluación de la viabilidad por citometría de flujo a un paciente con CLL. Se puede observar el gráfico de tamaño vs. granularidad, seguido del control de autofluorescencia y los gráficos de porcentaje de células B-CLL vivas cultivadas solo con medio, las B-CLL en co-cultivo con MSC

y las B-CLL co-cultivadas con las MSC pero separadas por un inserto de 1 μm (*ThinCerts*TM). En el gráfico de tamaño vs. granularidad aparece seleccionada la población de linfocitos B dentro de una región en el gráfico; la autofluorescencia permite establecer el punto de corte para diferenciar un resultado positivo y uno negativo. En los gráficos de anexina-V versus ioduro de propídio se puede observar como los porcentajes de células vivas para las células B-CLL cultivadas en contacto directo con las MSC es de 84% y separadas por la membrana de 1 μm son prácticamente los mismos (83%) y estos a su vez son mayores del porcentaje obtenido al cultivar las células solas (con medio de cultivo) el cual resulto de 38%, el cual es significativamente menor (Figura 16A).

En la Figura 16 (B) se reporta una gráfica, con los promedios de los resultados obtenidos de los pacientes analizados, del porcentaje de células B-CLL vivas con sus respectiva barra de error estándar, en los diferentes tipos de cultivos establecidos, a la primera y segunda semana de establecidos los cultivos con las MSC. Se realizó un Análisis de Varianza para cada semana y las pruebas de comparaciones múltiples (*Tukey*) para comparar si hay diferencias significativas entre las diferentes condiciones de cultivo también a cada semana. Algunas de las células B-CLL colocadas en el inserto de 3 μm atravesaron el inserto luego de una semana de cultivo, por esta razón se decidió evaluar el porcentaje de células vivas en la fracción de células que permaneció en la parte superior del inserto (que no atravesó la membrana) y las que atravesaron la membrana que se encuentran ahora en contacto con las células madre mesenquimales debajo del inserto; además se realizaron ensayos con un inserto de tamaño de poro menor (1 μm); con este inserto las B-CLL no atravesaron la membrana, ni durante la primera ni la segunda semana de cultivo. El ANOVA arrojó diferencias muy significativas ($p=0,001$) para la semana 1 de cultivo. La prueba de comparaciones múltiples (*Tukey*) no mostró diferencias para las condiciones de B-CLL + MSC ($n=8$), fracción sin contacto ($n=8$) y fracción en contacto ($n=8$) en el inserto de 3 μm , y B-CLL + MSC separadas por el inserto de 1 μm ($n=5$), por otro lado si comparamos todas las condiciones con las B-CLL cultivadas solo con medio de cultivo la prueba de Tukey arroja diferencias significativas. De igual forma para la semana dos, el ANOVA arrojó diferencias

mucho más significativas ($p=0,0001$), la prueba de comparaciones múltiples (*Tukey*) mostro diferencias significativas entre las condiciones de co-cultivo, CLL + MSC ($n=5$), fracción sin contacto ($n=5$) y fracción en contacto ($n=5$) en el inserto de 3 μm , y CLL + MSC separadas por el inserto de 1 μm ($n=4$), comparadas con las B-CLL cultivadas solo con medio ($n=5$), siendo el porcentaje de células vivas significativamente menor en esta última condición.

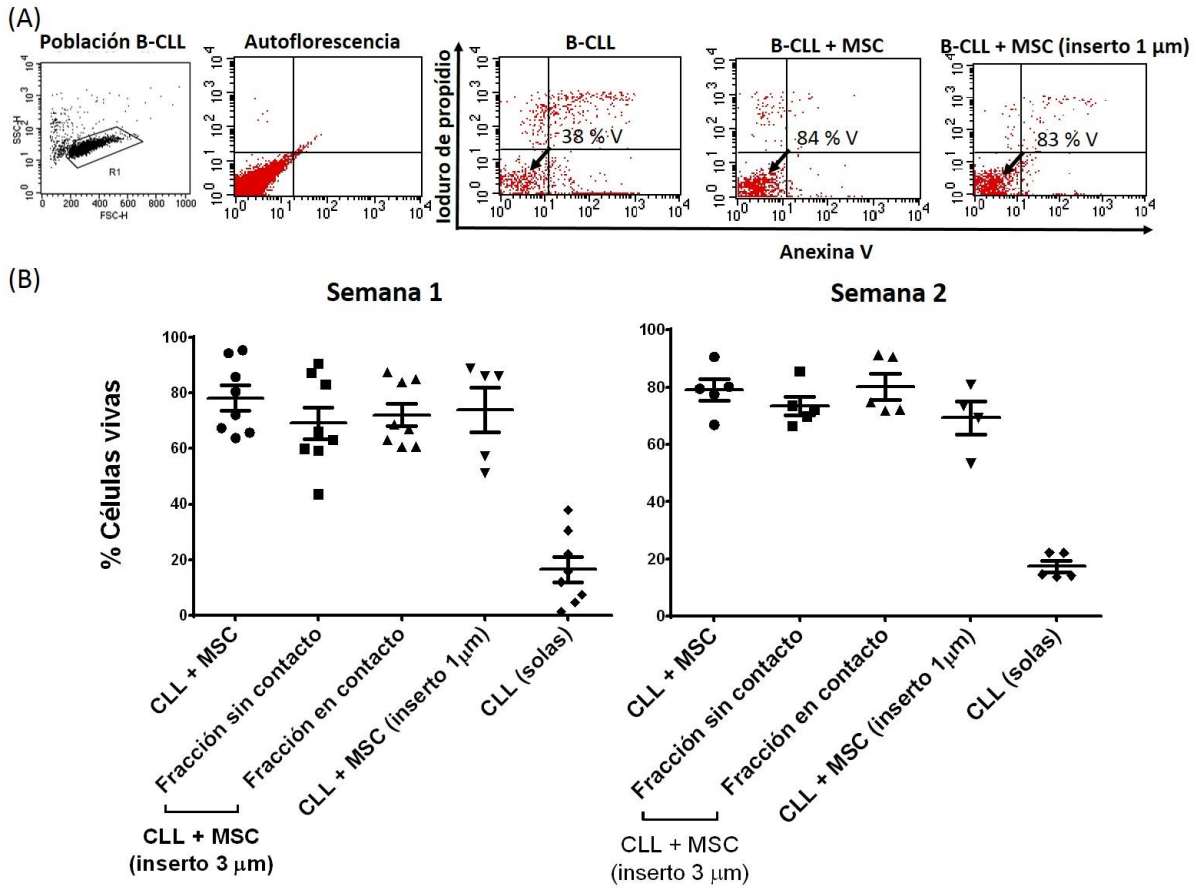


Figura 16. Análisis del porcentaje de B-CLL vivas en co-cultivo. (A): se reporta un ejemplo representativo de los resultados obtenidos de un ensayo de evaluación de la viabilidad por citometría de flujo a un paciente con CLL. Se muestra el gráfico de tamaño vs. granularidad, el control de autofluorescencia (control de autofluorescencia el cual sirve para fijar el valor de corte), los porcentaje de células vivas para las B-CLL cultivada solo con medio, las B-CLL en co-cultivo con MSC y las B-CLL co-cultivadas con las MSC pero separadas por un inserto de 1 μm (*ThinCerts*TM). (B) se reporta una gráfica con los promedios de los resultados obtenidos de los pacientes analizados del porcentaje de células vivas con sus respectiva barra de error estándar para las B-CLL en los diferentes tipos de cultivos establecidos, a la primera y segunda semana de establecidos los cultivos con las B-CLL. Se realizó un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples (*Tukey*) el cual arroja diferencias significativas ($p=0,001$) para las condiciones de CLL + MSC ($n=8$), fracción sin contacto ($n=8$) y fracción en contacto ($n=8$) en el inserto de 3 μm , y CLL + MSC separadas por el inserto de 1 μm ($n=5$) comparadas con B-CLL cultivadas solo con medio ($n=8$). De igual forma para la semana dos, el ANOVA arrojo diferencias significativas (para un $p=0,0001$), la prueba de comparaciones múltiples (*Tukey*) solo mostro diferencias significativas entre las condiciones de co-cultivo, CLL + MSC ($n=5$), fracción sin contacto ($n=5$) y fracción en contacto ($n=5$) en el inserto de 3 μm , y CLL + MSC separadas por el inserto de 1 μm ($n=4$), comparadas con las B-CLL cultivadas solo con medio ($n=5$).

También se evaluaron los porcentajes de apoptosis de los mismos pacientes a la primera semana de establecer los co-cultivos. En la Figura 17 se muestra los porcentajes de apoptosis con sus respectivas barras de error estándar. Podemos observar que en las condiciones de co-cultivo el porcentaje de apoptosis (obtenido de la suma de los porcentajes de células apoptóticas con las apoptóticas-necróticas en los gráficos de puntos en las citometría de flujo) fue relativamente bajo con respecto al porcentaje de apoptosis de las B-CLL cultivadas solo con medio (n=8) el cual fue variable con un valor promedio superior a las otras condiciones. Se realizó la prueba de ANOVA, la cual fue estadísticamente significativa ($p=0,01$) y la prueba de comparaciones múltiples (*Tukey*) reveló diferencias significativas entre B-CLL cultivadas solo con medio (n=8) con respecto a las B-CLL + MSC (n=8), fracción sin contacto (n=8) y fracción en contacto (n=8) en el inserto de 3 μm , y B-CLL + MSC separadas por el inserto de 1 μm (n=5). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon cada una de estas condiciones entre sí: B-CLL + MSC (n=8), fracción sin contacto (n=8) y fracción en contacto (n=8) en el inserto de 3 μm , y B-CLL + MSC separadas por el inserto de 1 μm (n=5).

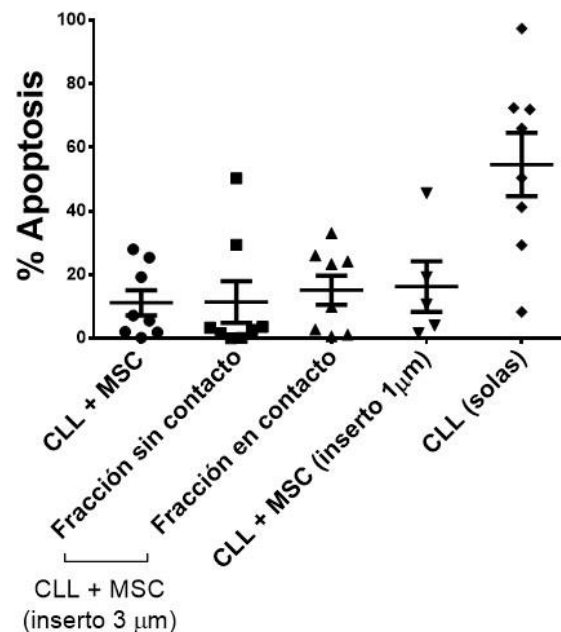


Figura 17. Análisis del porcentaje de apoptosis de B-CLL vivas en co-cultivo. Muestra una gráfica del porcentaje de apoptosis en las diferentes condiciones de cultivo con sus respectivas barras de error estándar a la primera semana. Se realizó una prueba de ANOVA la cual fue estadísticamente significativa ($p=0,01$), la prueba de comparaciones múltiples (*Tukey*) reveló diferencias significativas entre las CLL + MSC (n=8), fracción sin contacto (n=8) y fracción en contacto (n=8) en el inserto de 3 μm , y CLL + MSC separadas por el inserto de 1 μm (n=5), con respecto a las CLL solo con medio (n=8).

También se realizó el análisis del porcentaje de células B-CLL vivas luego del cultivo en medio condicionado (MC) de MSC o medio condicionado obtenido del co-cultivo MSC y B-CLL (MC de la interacción). La Figura 18 muestra el porcentaje de células B-CLL vivas con su respectiva barrar de error estándar luego el cultivo en MC (n=7) o en MC de la interacción (MCi) (n=4), comparado con el porcentaje de células B-CLL vivas en co-cultivo con MSC (n=7) y B-CLL cultivadas solo con medio de cultivo (n=7), luego de la primera semana. Se realizó un análisis de ANOVA que mostró que las diferencias entre las diferentes condiciones son estadísticamente significativas ($p=0,002$). La prueba de comparaciones múltiples (*Tukey*) realizada reveló que el porcentaje de células vivas es significativamente mayor en la condición donde las B-CLL fueron cultivadas en MCi con respecto al cultivo en MC y al co-cultivo B-CLL + MSC. Sin embargo el MCi mostro un gran porcentaje de variabilidad (con un error estándar de 15,91). Por otro lado, el medio condicionado (MC) resultó no ser significativo con respecto a las B-CLL solo con medio.

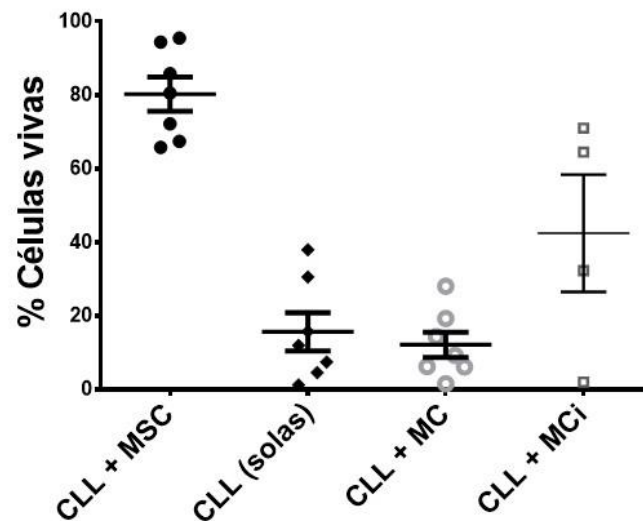


Figura 18. Análisis del porcentaje de B-CLL vivas en cultivo con medio condicionado. Gráfica en la que se muestra el porcentaje de células vivas con su respectiva barrar de error estándar del medio condicionado (MC) (n=7) y medio condicionado de la interacción (MCi) (n=4) comparado con el porcentaje de células vivas en co-cultivo (n=7) y B-CLL solo con medio de cultivo (n=7) a una semana de establecer el cultivo con las B-CLL. El ANOVA fue estadísticamente significativo ($p=0,002$), la prueba de comparaciones múltiples (*Tukey*) reveló que existen diferencias entre el MCi con respecto al MC y las CLL + MSC. Por otro lado las CLL + MC se comportan igual que las CLL solo con medio.

6- Discusión

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la interacción de las B-CLL con las MSC. Estas células estromales, eran provenientes de muestras de médula ósea de donantes sanos desde el punto de vista hematológico, que fueron previamente aisladas y cultivadas en la Unidad de Terapia Celular donde (UTC) donde fueron confirmadas como MSC debido a que presentaron características distintivas de este tipo celular. Sin embargo, se realizó nuevamente su caracterización fenotípica luego de ser descongeladas éstas células MSC criopreservadas en la UTC. En la Figura 9 se evidencia que el fenotipo de las MSC coincide con el fenotipo reportado por la ISCT (*The Mesenchymal and Tissue Stem Cells Committe of the International Society for Cellular Therapy*) y Dominici y colaboradores (2006), donde se observa una alta expresión de las moléculas CD90, CD49b, CD116, CD29, CD105, CD73 y ausencia o baja expresión de las moléculas CD34, CD14, CD45, y CD31.

Adicional, a la expresión de CD90, CD73 y CD105 que se pueden considerar como los marcadores de MSC más importantes según el ISCT, también se observa la expresión de CD49b y CD29 dos integrinas involucradas en la adhesión celular. Se evidencia también la ausencia o baja expresión de CD34, CD45 y CD31 presentes en células progenitoras hematopoyéticas, leucocitos y células endoteliales. Por otra parte, en el cultivo se evidenció la morfología típica fibroblastoide y su capacidad para adherirse al plástico como se muestra en la Figura 10. Las evidencias mostradas anteriormente nos permitieron reconfirmar la presencia de MSC provenientes de los dos pacientes usados de la UTC para su utilización en los co-cultivos con las células B provenientes de pacientes con leucemia linfocítica crónica.

La leucemia linfocítica crónica ha sido reconocida como el resultado de la acumulación en sangre periférica y órganos de linfocitos B que son deficientes en el proceso de apoptosis. Sin embargo, estas células cuando son aisladas sufren rápidamente de apoptosis *in vitro*. Estos hallazgos han llevado a sugerir que el microambiente es necesario para el mantenimiento de la supervivencia de las B-

CLL *in vivo*. Sin embargo, pocos trabajos han evaluado el efecto de la interacción de las B-CLL con células de su microambiente, tales como las células estromales de médula ósea (BMSC). Las BMSC, específicamente las MSC, han demostrado mantener vivas las B-CLL cuando se cultivan ambos tipos celulares *in vitro*. (Lagneaux y col., 1998; Kay y col., 2007; Ding y col., 2009).

Los pacientes leucémicos utilizados en este estudio son previamente diagnosticados en el Banco de Sangre del DC, en el laboratorio se realizó el aislamiento de los linfocitos B de la sangre de los pacientes. Luego del aislamiento se procedió a evaluar la pureza del aislado enriquecido en B-CLL mediante la evaluación de la co-expresión de CD5/CD19. Se ha demostrado que las células B-CLL co-expresan antígenos de células T como CD5 con antígenos de células B como CD19 (Moreau y col., 1997; Ginaldi y col., 1998; Campo y col., 2008). Para evaluar la co-expresión se realizó un marcaje doble con un anticuerpo anti-CD5 y uno anti-CD19 con diferentes fluorocromos, el diagrama de puntos de la Figura 11 evidencia que más del 90% de las células aisladas son células tipo B-CLL ya que co-expresan CD5/CD19 en su superficie, resultados similares se obtuvieron en el resto de los pacientes.

La interacción entre las B-CLL y las MSC parece no solo reducirse a efectos sobre la viabilidad de las B-CLL, sino que además las MSC parecen estimular cambios en la expresión de diversas moléculas de superficie en las B-CLL, por esta razón antes de establecer los co-cultivos con las MSC se evaluó la expresión inicial de algunas moléculas de superficie como CD20, CXCR4, CD25, CD55 y CD59 (Figura 12). La expresión inicial de estas moléculas fue muy variable, en términos de porcentaje de células positivas e intensidad media de fluorescencia (IMF) entre cada paciente analizado, lo que podría estar o no relacionado con el pronóstico de la enfermedad o bien con el proceso de evolución de la enfermedad.

Luego de establecidos los co-cultivos con MSC, la interacción con las células estromales ocasionó cambios significativos en la expresión de moléculas como CD20, en el cual se observó una disminución significativa en la IMF para esta molécula luego de dos semanas de co-cultivo (Figura 14), por otro lado no se

observó diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para este marcador (Figura 13). La expresión de CD20 está restringida al linaje de células B, incluyendo la mayoría de las neoplasias de linfocitos B. Este resultado que sugiere que el microambiente modula la expresión de CD20 en la superficie de las B-CLL, resulta de mucha importancia ya que podría explicar por qué se reporta una baja eficacia de tratamientos dirigidos hacia dicha molécula en pacientes con CLL (como es el uso clínico de Rituximab), donde su uso como único agente para el tratamiento de CLL es raro debido a que se ha reportado que la mayoría de los pacientes son refractarios al agente terapéutico además de mostrar una actividad limitada (Huang y col., 2008; Gentile y col., 2010).

Rituximab (comercializado como *Rituxan*®) es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano, obtenido por ingeniería genética que representa una inmunoglobulina glucosilada con las regiones constantes de la IgG1 humana y las secuencias de las regiones variables de las cadenas ligeras y cadenas pesadas murinas; como ya se mencionó Rituximab está dirigido contra el antígeno CD20, una fosfoproteína no-glucosilada (Gentile y col., 2010). El dominio F_{ab} de Rituximab se une al antígeno CD20 de los linfocitos B para activar funciones efectoras que median la lisis de células B vía dominio Fc. Los mecanismos posibles de la lisis celular incluyen citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) como resultado de la unión de C1q, y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por uno o más receptores Fc γ de la superficie de los granulocitos, macrófagos y células NK (Wood, 2001).

Takei y colaboradores demostraron en el 2006 que la modificación en la expresión de CD20, CD55 y CD59 en líneas celulares leucémicas modificaba la actividad efectora de Rituximab *in vitro* (Takei y col., 2006). La molécula CD55 no mostro variaciones en la expresión luego del co-cultivo, cabe destacar que el antígeno se expresó en casi el 100% de las células (Figura 13) pero con una IMF relativamente baja (Figura 14) lo que significaría que se expresan pocas copias de la proteína en la superficie celular, sin embargo, en condiciones de co-cultivo dicha expresión se mantiene constante. CD55 es también conocida como factor

acelerador de la degradación (DAF, por sus siglas en inglés) es una proteína fijada covalentemente en la membrana plasmática y se encarga de disociar la convertasa C3 por lo que actúa regulando la vía clásica y alterna del sistema de complemento (Kindt y col., 2007), por esta razón evaluamos la molécula CD55 sobre el linfocito B-CLL ya que podría actuar limitando la acción de Rituximab a nivel de su actividad efectora, sin embargo, ésta se mantuvo constante durante el co-cultivo.

En contraste, la molécula CD59 aumentó su expresión luego de dos semanas de co-cultivo evidenciado por un aumento en la intensidad media de fluorescencia (IMF) (Figura 14), pero no en el porcentaje de células positivas. Es la primera vez que se reporta el aumento de este receptor en las B-CLL luego del co-cultivo con las MSC. CD59 también conocido como factor de restricción homólogo (HRF, por sus siglas en inglés), o también llamado inhibidor de lisis reactiva (MIRL) evita el ensamblaje de poli-C9 y bloquean la formación del complejo de ataque a membrana (MAC, por sus siglas en inglés) (Kindt y col., 2007), por lo que el aumento de la expresión de dicho factor en condiciones de co-cultivo en la membrana celular de los B-CLL podría estar relacionada con la resistencia a Rituximab ya que podría estar frenando la actividad efectora del agente terapéutico sobre las B-CLL. Si bien Takei y colaboradores demuestran que diferentes niveles de expresión de CD20, CD59 y CD55 afectan la actividad de Rituximab en diferentes líneas celulares, no podemos asegurar que lo mismo ocurre en las B-CLL en presencia de las MSC, se deberían de realizar ensayos en presencia de Rituximab y en co-cultivo con células efectoras, tampoco se conoce de qué manera las MSC modulan la expresión de estos antígenos en las B-CLL. Se podría sugerir un modelo de dicha interacción en las B-CLL como el que se presenta en la Figura 19.

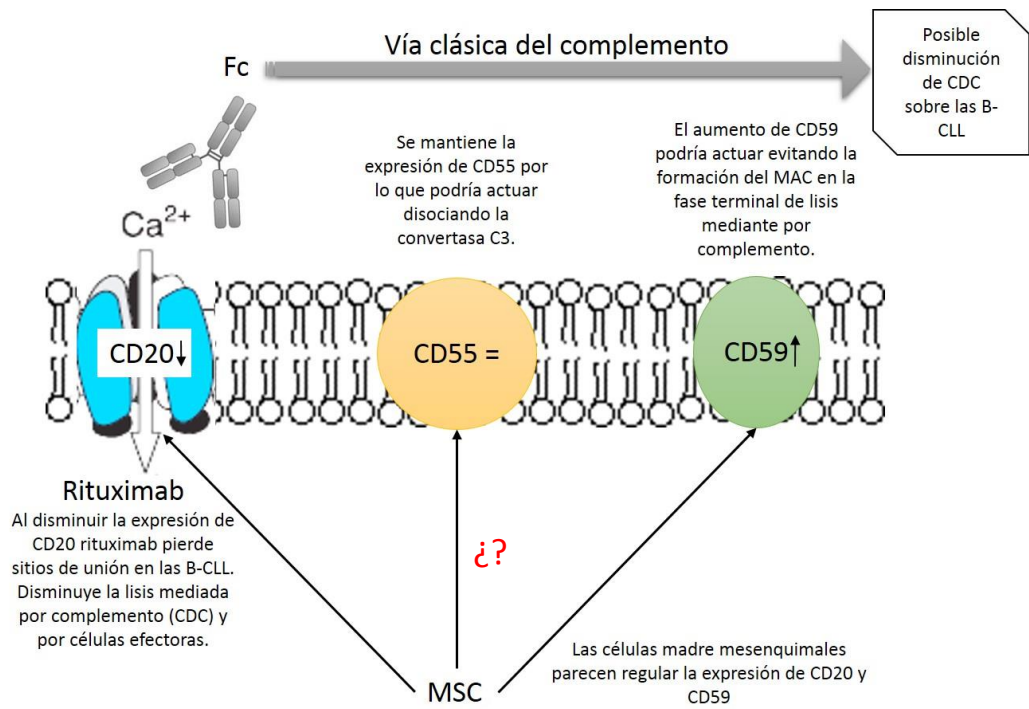


Figura 19. Posible mecanismo sugerido mediante el cual las MSC podrían afectar indirectamente la efectividad de Rituximab. La disminución de CD20 y el aumento en la expresión de CD59 podrían afectar la vía clásica de complemento mediante la cual actúan los mecanismos de Rituximab. (¿?: No hay evidencias de si las MSC modulan la expresión de CD55).

Por otro lado CXCR4 el receptor para la quimiocina CXCL12 también mostró una disminución significativa en el porcentaje de células positivas para dicho antígeno (Figura 13), pero no para la IMF (Figura 14). Se ha demostrado que CXCR4 es funcionalmente activo y participa activamente en la migración de las B-CLL hacia el microambiente en la médula ósea (Burger y col., 1999; Burger y Kipps, 2006), por lo tanto la asociación entre la expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 y la supervivencia es consistente, y la regulación negativa de CXCR4 observada en las células B-CLL (Figura 14) co-cultivadas con MSC igualmente es consistente con los datos ya reportados por Burger y colaboradores en 1999. Sin embargo, Burger reporta que solo la fracción de B-CLL adheridas a las MSC presenta un cambio en la expresión de CXCR4 a través de una RT-PCR (Burger y col., 1999), a diferencia de nosotros que observamos dicho cambio en las B-CLL que se encuentran no adherentes sobre las MSC. Surge entonces la interrogante de cómo se está regulando la expresión de CXCR4 si no es solo por el contacto directo célula-célula. Se tendría entonces que evaluar la expresión de CXCR4 en experimentos de co-cultivo indirecto usando insertos, para averiguar si la regulación

negativa del receptor ocurre también en ese caso. Este receptor resulta un importante blanco terapéutico ya que se sabe que el fenómeno de recirculación (*Homing*) en la médula ósea ocurre por el gradiente de CXCL12 en el microambiente tumoral.

Además de evaluar antígenos posiblemente relacionados con los mecanismos de resistencia a anticuerpos terapéuticos comerciales, y el receptor CXCR4 relacionado con la quimiotaxis, se evaluó también un antígeno relacionado con la activación de los linfocitos B como lo es la molécula CD25; la cual es una proteína transmembrana presente en varios tipos de células inmunológicas activadas y que forma parte del receptor de IL-2. Los resultados observados en las Figuras 13 y 14 evidencian un aumento significativo en el porcentaje de células positivas para CD25 en las CLL (no aumenta la IMF), esto parece indicar que las B-CLL se activan luego del co-cultivo con las MSC. CD25 parece estar relacionado con un mal pronóstico en CLL, expresado en muchos pacientes refractarios para agentes quimioterapéuticos como fludarabina (Frankel y col., 2003; Morgan y col., 2004), por esta razón desde el 2003 se está estudiando la posibilidad de usar un agente terapéutico en pacientes de CLL dirigido al receptor de IL-2 (*Ontak* de *Seragen*, Inc., Hopkinton, MA, USA); *Ontak* es una proteína de fusión que consiste en IL-2 y toxina diftérica, este agente es actualmente usado solo en linfoma cutáneo de células; T. Frankel y colaboradores demuestran su efectividad en fase dos de un estudio clínico de fase dos en CLL, demostrando disminución de la linfocitosis en sangre periférica y médula ósea, por su parte, Morgan y colaboradores lo confirman en un estudio independiente. El incremento de CD25 en condiciones de co-cultivo con MSC humanas ya había sido reportado por Ding y colaboradores, pero solo a las 48 horas de co-cultivo, a diferencia de nuestro estudio que evaluamos su expresión luego de dos semanas (Ding y col., 2009). Resultaría interesante evaluar la efectividad de *Ontak* sobre los linfocitos B-CLL luego de su co-cultivo con las MSC donde la expresión de esta molécula ha sido incrementada en comparación a B-CLL frescas.

Otro de los antígenos evaluados fue IgM, que forma parte del receptor de linfocitos B (BCR, por su siglas en inglés), existe evidencia que demuestra que la estimulación por esta vía induce señales de proliferación y supervivencia. En experimentos de co-cultivo entre B-CLL y células estromales de médula ósea humana se ha demostrado también la activación de Syk y Akt, los bloqueos de estas señales inducen una disminución de proteínas anti-apoptóticas como Mcl-1 de modo que se antagoniza el efecto de protección del microambiente (Woyach y col., 2012). En nuestro trabajo nosotros reportamos una disminución en la expresión de IgM evidenciada por la disminución significativa en la IMF luego de dos semanas de co-cultivo con las MSC (Figura 14). Este resultado podría sugerir que el receptor está siendo regulado negativamente e indirectamente por las señales del microambiente luego de la activación por la vía del BCR, no tenemos evidencia suficiente para asegurarlo pues tendríamos que estudiar el efecto de activación de las B-CLL y utilizar inhibidores o estimuladores de las señales del receptor, sin embargo podemos decir que aparentemente la disminución del receptor parece estar relacionada con las señales que reciben las B-CLL por parte de las MSC. Por otra parte, aún se desconoce cómo es el proceso de presentación antigénica de las B-CLL (Deglesne y col., 2006), además todo parece apuntar a un incremento en el metabolismo celular posterior a la estimulación del BCR en las B-CLL que está altamente relacionada con las señales de supervivencia y proliferación (Deglesne y col., 2006), de ahí la importancia que reside el estudio de la modulación de la expresión de BCR. Actualmente se encuentran en fase clínica anticuerpos terapéuticos dirigidos a bloquear la activación del BCR a través de inhibidores de quinasas en la vía de activación de BCR (Woyach y col., 2012).

Todas estas evidencias junto con las ya reportadas nos permiten sugerir que el microambiente tumoral en este trabajo representado por las MSC aparentemente induce cambios en la expresión de ciertas moléculas de superficie en las B-CLL que podrían participar en el mantenimiento de la supervivencia de dichas células y en la posible resistencia a diferentes agentes terapéuticos.

En un intento por evaluar de qué manera las células estromales afectan la viabilidad de las B-CLL se realizaron ensayos de co-cultivo directo, indirecto y con medio condicionado. En un ensayo de co-cultivo normalmente se compara la viabilidad de las células en presencia de las células soporte (en este caso las MSC) y en ausencia de las mismas (creciendo solo con medio); en la Figura 15 se muestra una fotografía de las B-CLL cultivadas junto con las MSC y las B-CLL cultivadas solo con medio durante la primera semana. Se evidenciaron diferencias en la morfología de las células en ambas condiciones de cultivo, en el co-cultivo B + MSC, las B-CLL muestran una morfología esférica típica de linfocitos B, sin signos aparentes de apoptosis; a diferencia de las células B-CLL cultivadas solas donde se evidencian las células B con una morfología aparentemente apoptótica y/o necrótica. La evidencia fotográfica no es suficiente para determinar en qué fase de muerte celular se encuentran las mismas, de manera que se utilizó el ensayo de Anexina-V/ Ioduro de propídio el cual permite, mediante citometría de flujo, discriminar las células vivas o viables de las células muertas o no viables apoptóticas y/o necróticas. Estos ensayos se realizaron en las diferentes condiciones de co-cultivo en todos los pacientes procesados.

Los ensayos de co-cultivo indirecto consistieron en un dispositivo especial conocido como inserto, que separa las B-CLL de las MSC adheridas al fondo del pozo de cultivo como se indica en la Figura 7, pero mantiene a las células conectadas a través del medio de cultivo. Cuando se planificó dicho experimento se utilizó un inserto de tamaño de poro 3 μm basados en que el diámetro celular promedio de estas células es igual al diámetro promedio de un linfocito B normal (entre 10 a 15 μm) (Fayad y O'brien, 2005). Sin embargo, transcurrida una semana de establecido el ensayo de co-cultivo indirecto nos dimos cuenta que algunas células atravesaron el inserto, hacia la parte inferior del pozo donde se encontraban las MSC y otras permanecieron en la parte superior del inserto incluso luego de las dos semanas de co-cultivo, esta particularidad nos permitió evaluar la fracción en contacto directo con las MSC y la fracción que permaneció en el inserto. Durante la segunda semana de co-cultivo, las células aun permanecieron separadas en dos

fracciones, una fracción celular en la parte superior del inserto y otra en la parte inferior.

Este fenómeno se observó en todos los pacientes en el estudio, lo que podría significar que las células atraviesan la membrana siguiendo un gradiente de concentración de quimiocinas (CXCL12) tal y como lo reportan Burger y colaboradores en su trabajo al demostrar la funcionalidad del receptor CXCR4 en las CLL, sin embargo ellos usaron un inserto de 5 μm en sus experimentos de migración. Hasta ahora no está reportado que las B-CLL atraviesen un tamaño de poro de 3 μm , y que una fracción de estas células permanezca en la parte superior sin atravesar el inserto; esto último podría significar que existe una fracción de la población celular de mayor tamaño incapaz de atravesar el inserto; o que una población de células tengan una mayor expresión de CXCR4. La manera en la que una célula de 10 μm de diámetro puede atravesar un espacio de 3 μm podría explicarse por el fenómeno de diapédesis que ocurre durante el rodamiento de leucocitos sobre el endotelio vascular, en este fenómeno ocurre una reorganización del citoesqueleto en las células (Ransohoff y col., 2003).

Como el objetivo de este ensayo era que las células no atravesaran el inserto para poder estudiar el co-cultivo indirecto entre las B-CLL y las MSC, se decidió evaluar la viabilidad de las células de la fracción que permaneció en la parte superior y la parte inferior del inserto de 3 μm , además de evaluar las células colocadas en un inserto de tamaño de poro menor (1 μm), en el cual probamos que las células no atravesaban la membrana ni durante la primera ni la segunda semana de co-cultivo. Nuestros resultados muestran que el porcentaje de células vivas obtenido en el co-cultivo, el co-cultivo indirecto con inserto de 3 μm (arriba y abajo) y de 1 μm es significativamente mayor al obtenido con las B-CLL cultivadas solo con medio (Figura 16). Los porcentajes de células vivas entre las condiciones de co-cultivo directo e indirecto son muy similares. De igual forma durante la semana 2 las diferentes formas de co-cultivo mostraron un porcentaje de viabilidad superior al obtenido con las B-CLL solo con medio. El porcentaje de células vivas se mantiene,

para los co-cultivos, desde la semana uno a la semana dos, sin mostrar diferencias significativas (Figura 16).

Estos resultados sugieren que el contacto directo célula-célula no es necesario para mantener la alta viabilidad de las B-CLL *in vitro*, lo que significaría que gran parte de las interacciones que mantienen vivas a las B-CLL en el co-cultivo con las MSC están mediadas por factores solubles. La elevada viabilidad de las B-CLL se observó luego de la primera y segunda semana de co-cultivo, lo que sugiere que los factores solubles son capaces de mantener los cultivos durante un tiempo prolongado. Estos resultados generan aún más interrogantes sobre cómo son las interacciones entre el microambiente y las B-CLL.

Una alta viabilidad de las B-CLL en co-cultivos en contacto directo con MSC ya había sido reportada en los trabajos de Ding y colaboradores y Kurtova y colaboradores en el 2009, pero solo fue evaluada luego de 72 horas de co-cultivo (Ding y col., 2009; Kurtova y col., 2009), nuestros ensayos lograron mantener un porcentaje de células vivas entre un 60 y 90% (dependiendo del paciente), hasta dos semanas de co-cultivo directo (Figura 16), así como en co-cultivos indirectos, algo que hasta la fecha no había sido reportado. También evaluamos el porcentaje de células apoptóticas en los mismos pacientes y observamos que el porcentaje de apoptosis en los co-cultivos (directos e indirectos) fue significativamente inferior al observado en el cultivo de B-CLL solo con medio (Figura 17), lo cual es consistente por el efecto anti-apoptótico de las MSC. El porcentaje de apoptosis de las B-CLL solo con medio es algo variable debido a que en ocasiones para la primera semana muchas de las B-CLL ya se encuentran en fase de necrosis celular, lo cual no se ve reflejado en el porcentaje de apoptosis.

Para probar el posible efecto de los factores solubles sobre las B-CLL se realizaron experimentos utilizando medio condicionado obtenido de las MSC y medio condicionado obtenido luego una semana del co-cultivo de MSC y B-CLL, los resultados obtenidos (Figura 18) evidencian que el medio condicionado (MC) produjo un porcentaje de células vivas muy bajo en comparación al co-cultivo además de ser muy similar al de las B-CLL cultivadas solo con medio, por otro lado

el medio condicionado mostró un efecto intermedio, y logró mantener el porcentaje de células vivas sin llegar a ser igual que en el co-cultivo, parece que hacen falta más casos para aclarar el efecto del medio condicionado de la interacción.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de co-cultivo nos permiten establecer varias hipótesis sobre lo que podría estar ocurriendo entre las B-CLL y las MSC en el co-cultivo indirecto. La Figura 20 muestra alguno de los modelos de las posibles interacciones en el sistema *in vitro* propuestos en este trabajo.

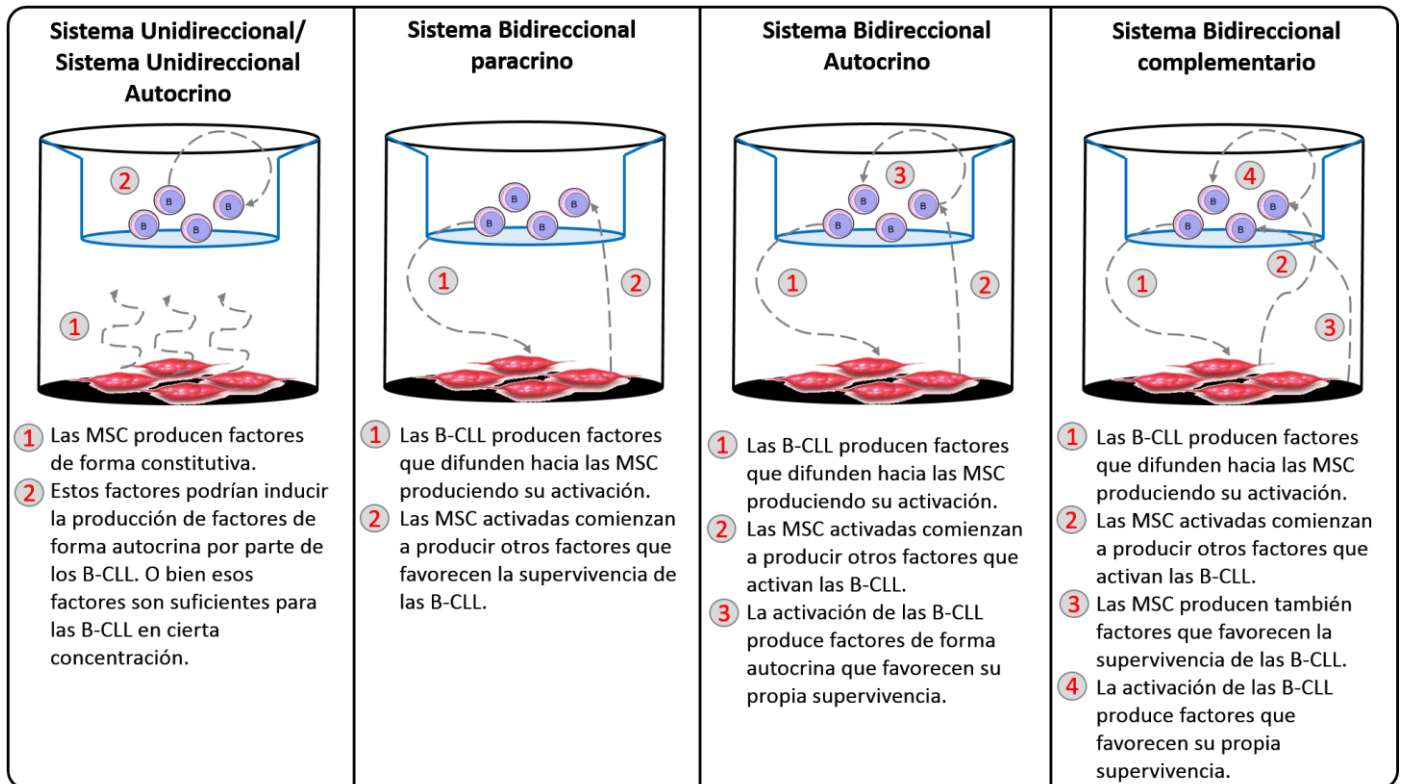


Figura 20. Hipótesis de algunas de las posibles formas de interacción entre las B-CLL y las MSC en el sistema de co-cultivo indirecto.

La hipótesis del sistema Unidireccional, y Unidireccional Autocrino es la menos probable de todos, en primer lugar porque el Medio Condicionado no mostro tener un efecto significativo sobre la viabilidad de las B-CLL y en segundo lugar porque ha sido reportado la activación de las MSC durante los ensayos de co-cultivo (Deglesne y col., 2006; Ding y col., 2009; Woyach y col., 2012). Sin embargo, no se puede descartar que los factores que producen las MSC de forma constitutiva sean los responsables de la supervivencia de las B-CLL ya que el medio condicionado

obtenido por nosotros podría no tener una concentración adecuada de dichos factores.

El resto de las hipótesis establecen que el sistema es bidireccional, esto supone mayor complejidad a la hora de buscar las posibles moléculas implicadas en la interacción. En el sistema bidireccional, las B-CLL siempre producen factores que activan a la monocapa de MSC y estas producen otros factores que de manera directa o indirecta afectan la supervivencia de las B-CLL, por lo que se establece un complejo sistema cruzado de interacción cuya complejidad podría ser analizada usando un sistema de microarreglos de ARN para las MSC y las B-CLL comparando la expresión de ciertos genes en condiciones de co-cultivo indirecto con respecto a un cultivo simple, también se podría usar microarreglos proteicos para determinar la presencia de factores solubles en el medio condicionado de los diferentes tipos de cultivo. Sin embargo, una forma más simple de comenzar dicha búsqueda es analizando los factores solubles en los sobrenadantes de los cultivos mediante ELISA, con esta metodología solo podríamos conocer que factores están implicados en el proceso, pero sería muy difícil establecer cuales factores están siendo producidos por un tipo celular u otro. Entre los factores que podrían ser producidos por la MSC encontramos citoquinas y quimiocinas que forman parte del perfil de moléculas secretadas por las MSC, como IL-6 que es una citoquina pro-inflamatoria con efectos en la hematopoyesis y regulación de linfocitos B y T; IL-1, citoquina pro inflamatoria que actúa sobre linfocitos B, T y monocitos; IL-10 que es una citoquina que estimula la proliferación en linfocitos B (Fainboim y Geffner, 2005). Otros factores que también podrían intervenir son VEGF o factor de crecimiento endotelial vascular, BAFF o factor de activación de células B, APRIL que estimula la diferenciación de linfocitos B primarios, además de quimiocinas como CXCL12 y CXCL13 y otras como CCL19 y CCL21.

Los resultados de este trabajo confirman que las interacciones implicadas en el microambiente tumoral de las B-CLL son muy complejas. Confirman además la importancia de las MSC como “células soporte” de las B-CLL pudiendo mantener la viabilidad hasta dos semanas en condiciones de cultivo directo e indirecto, que

nunca había sido reportada y sugieren que los factores solubles producidos en el co-cultivo son los responsables de mantener viables las células B leucémicas. Adicionalmente, esta interacción no solo afecta la supervivencia de las B-CLL, sino que además parecen modificar la expresión de moléculas presentes en la B-CLL que podrían estar implicadas en la resistencia observada a los tratamientos actuales. En la actualidad se ha enfocado la investigación en el desarrollo de tratamientos dirigidos a impedir la interacción de las B-CLL con las células que conforman su microambiente; de manera que un mayor conocimiento de esta interacción permitirá el desarrollo de tratamientos de mayor efectividad para pacientes que padecen de esta enfermedad.

7- Conclusiones

- El co-cultivo directo con MSC humanas permitió mantener la supervivencia de las B-CLL hasta dos semanas.
- Las células madre mesenquimales regulan la expresión de algunas moléculas sobre células B de pacientes con CLL luego de dos semanas en co-cultivo.
- El co-cultivo de B-CLL con MSC humanas disminuyó la expresión de la molécula IgM lo que sugiere que el receptor se está regulando negativamente en la superficie de los linfocitos B, además se observó una disminución de CD20 lo que trae como consecuencia una disminución en el ligando de Rituximab, conjuntamente se observó un aumento en la expresión de CD59 sobre la superficie de las B-CLL lo que sugiere que la vía de complemento.
- La disminución en la expresión de CD20 y el aumento en la expresión de CD59 podría explicar la baja respuesta a Rituximab en los pacientes cuando es utilizado como monoterapia en clínica.
- El co-cultivo de B-CLL con MSC humanas aumentó el porcentaje de células que expresan la molécula CD25, lo que sugiere que las células están activadas, y disminuyó el porcentaje de B-CLL que expresan el receptor CXCR4 lo que sugiere una regulación negativa del receptor y del fenómeno de migración.
- El co-cultivo indirecto de B-CLL y MSC mantuvo la supervivencia de las B-CLL hasta dos semanas lo que podría significar que la supervivencia depende de factores solubles.
- El medio condicionado de las células madre mesenquimales no tiene ningún efecto sobre la supervivencia de las B-CLL.
- El co-cultivo con medio condicionado de células madre mesenquimales parece sugerir que el mecanismo de interacción entre las B-CLL y las MSC es bidireccional e inducido por los linfocitos B leucémicos.

8- Recomendaciones

- Estudiar los factores solubles presentes en el medio condicionado del co-cultivo para determinar cuáles participan en la supervivencia de las B-CLL.
- Estudiar la regulación sobre la expresión de otras moléculas de superficie en linfocitos B de pacientes con CLL luego de su co-cultivo con MSC humanas.
- Estudiar el efecto de drogas como *rituximab* sobre las B-CLL cuando son cultivadas con MSC humanas a fin de profundizar los resultados obtenidos con CD20 y CD59.
- Estudiar las consecuencias de la disminución de CXCR4, en los linfocitos B luego del co-cultivo con las MSC, sobre su capacidad de migración.
- Incrementar el número de pacientes a analizar en los diferentes ensayos para disminuir el error asociado.

9- Bibliografía

Ades, E., Zwerner, R., Acton, R., Balch, C. 1980. Isolation and partial characterization of the human homologue of Thy-1. *The Journal of Experimental Medicine*. **151**: 400-406.

Asou, H., Takechi, M., Tanaka, K., Tashiro, S., Dohy, H., Ohno, R., Kamada, N. 1993. Japanese B cell chronic lymphocytic leukaemia: a cytogenetic and molecular biological study. *Br J Haematol*. **85**: 492-7.

Audrito, V., Vaisitti, T., Serra, S., Bologna, C., Brusa, D., Malavasi, F., Deaglio, S. 2013. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia offers novel therapeutic options. *Cancer Lett*. **328**: 27-35.

Beyer, N., Da Silva, L. 2006. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 249-82.

Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Pigué, H., Goasguen, J., Vaugier, G. y colaboradores. 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. **48**: 198-206.

Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., Mackay, C. R. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**: 1925-30.

Burger, J., Burger, M., Kipps, T. 1999. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. **94**: 3658-3667.

Burger, J. A., Kipps, T. J. 2006. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. **107**: 1761-7.

Burger, J. A., Montserrat, E. 2013. Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood*. **121**: 1501-9.

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**: 2655-2663.

Caligaris-Cappio, F. 2003. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. **123**: 380-8.

Campo, E., Catovsky, D., Montserrat, E., Muller-Hermelink, H., Harris, N., Stein, H. 2008. B-cell prolymphocytic leukemia. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC. 183-184.

Carlos, T. M., Harlan, J. M. 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. **84**: 2068-101.

Castrillo, J. M. A., Álvarez, E. V. 2005. Hematología Clínica. Temas de Patología Médica.

Collins, R. J., Verschuer, L. A., Harmon, B. V., Prentice, R. L., Pope, J. H., Kerr, J. F. R. 1989. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol*. **71**: 343-350.

Cragg, M., Walshe, C., Ivanov, A., Glennie, M. 2005. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Current Directions in Autoimmunity*. **8**: 140–174.

Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S. y colaboradores. 2003. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. **348**: 1764-75.

Chiorazzi, N., Rai, K. R., Ferrarini, M. 2005. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. **352**: 804-15.

Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A. y colaboradores. 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **94**: 1840-1847.

Davids, M. S., Burger, J. A. 2012. Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open J Hematol*. **3**:

Deans, R. J., Moseley, A. B. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. **28**: 875-84.

Deglesne, P. A., Chevallier, N., Letestu, R., Baran-Marszak, F., Beitar, T., Salanoubat, C., Sanhes, L. y colaboradores. 2006. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res*. **66**: 7158-66.

Dighiero, G., Hamblin, T. J. 2008. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. **371**: 1017-29.

Ding, W., Nowakowski, G. S., Knox, T. R., Boysen, J. C., Maas, M. L., Schwager, S. M., Wu, W. y colaboradores. 2009. Bi-directional activation between mesenchymal stem cells and CLL B-cells: implication for CLL disease progression. *Br J Haematol*. **147**: 471-83.

Dohner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Dohner, K. y colaboradores. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. **343**: 1910-6.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R. y colaboradores. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8**: 315-7.

Eder, M., Ernst, T. J., Ganser, A., Jubinsky, P. T., Inhorn, R., Hoelzer, D., Griffin, J. D. 1994. A low affinity chimeric human alpha/beta-granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor receptor induces ligand-dependent proliferation in a murine cell line. *J Biol Chem.* **269**: 30173-80.

Fainboim, L., Geffner, J. 2005. Introducción a la Inmunología Humana. Edición. Editorial Médica Panamericana, Quinta edición, Buenos Aires, Argentina.

Fayad, L., O'brien, S. 2005. Chronic Lymphocytic Leukemia and Associated Disorders Chronic Lymphocytic Leukemia and Associated Disorders.

Foon, K. A. 1995. Chronic lymphoid leukemias: recent advances in biology and therapy. *Stem Cells.* **13**: 1-21.

Foon, K. A., Rai, K. R., Gale, R. P. 1990. Chronic Lymphocytic-Leukemia - New Insights into Biology and Therapy. *Annals of Internal Medicine.* **113**: 525-539.

Frankel, A., Fleming, D., Hall, P., Powell, B., Black, J., Leftwich, C., Gartenhaus, R. 2003. A phase II study of DT fusion protein denileukin diftitox in patients with fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* **9**: 3555-3561.

Gandini, D., Lanza, F., Latorraca, A., Levato, F., Del Senno, L., Castoldi, G. 1993. Immunophenotypic and genotypic characterization of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients from northern Italy. *Haematologica.* **78**: 18-24.

Gentile, M., Vigna, E., Mazzone, C., Lucia, E., Recchia, A., Morabito, L., Bisconte, M. y colaboradores. 2010. Rituximab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Manag Res.* **2**: 71-81.

Ghia, P., Guida, G., Stella, S., Gottardi, D., Geuna, M., Strola, G., Scielzo, C. y colaboradores. 2003. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood.* **101**: 1262-9.

Ginaldi, L., De Martinis, M., Matutes, E., Farahat, N., Morilla, R., Catovsky, D. 1998. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol.* **51**: 364-9.

Granziero, L., Ghia, P., Circosta, P., Gottardi, D., Strola, G., Geuna, M., Montagna, L. y colaboradores. 2001. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **97**: 2777-2783.

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**: 1848-54.

Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., Reed, J. C. 1993. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **82**: 1820-8.

Huang, X., Moore, D. J., Mohiuddin, M., Lian, M. M., Kim, J. I., Sonawane, S., Wang, J. y colaboradores. 2008. Inhibition of ICAM-1/LFA-1 interactions prevents B-cell-dependent anti-CD45RB-induced transplantation tolerance. *Transplantation.* **85**: 675-80.

Ingle, G. S., Chan, P., Elliott, J. M., Chang, W. S., Koeppen, H., Stephan, J. P., Scales, S. J. 2008. High CD21 expression inhibits internalization of anti-CD19 antibodies and cytotoxicity of an anti-CD19-drug conjugate. *Br J Haematol.* **140**: 46-58.

Jelinek, D. F., Tschumper, R. C., Geyer, S. M., Bone, N. D., Dewald, G. W., Hanson, C. A., Stenson, M. J. y colaboradores. 2001. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* **115**: 854-61.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M. J. 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* **58**: 71-96.

Kay, N. E., Shanafelt, T. D., Strege, A. K., Lee, Y. K., Bone, N. D., Raza, A. 2007. Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch". *Leuk Res.* **31**: 899-906.

Kharfan-Dabaja, M. A., Chavez, J. C., Khorfan, K. A., Pinilla-Ibarz, J. 2008. Clinical and therapeutic implications of the mutational status of IgVH in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* **113**: 897-906.

Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. 2007. Inmunología de Kuby. McGraw-Hill, Sexta edición, México, D.F.

Krober, A., Bloehdorn, J., Hafner, S., Buhler, A., Seiler, T., Kienle, D., Winkler, D. y colaboradores. 2006. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* **24**: 969-75.

Kurtova, A. V., Balakrishnan, K., Chen, R., Ding, W., Schnabl, S., Quiroga, M. P., Sivina, M. y colaboradores. 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**: 4441-50.

Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C., Stryckmans, P. 1998. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood.* **91**: 2387-2396.

Marquez, M. E., Deglesne, P. A., Lopez, J. L., Da Costa, O., Borrego, M., Hernandez, M., Muller, A. y colaboradores. 2012. Unexpectedly high frequency of European parentage in Venezuelan patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* **53**: 235-41.

Mcintyre, B., Bednarczyk, J., Passini, C., Szabo, M., Udagawa, T., Wygant, J. 1991. Integrins: Cell adhesion receptors in health and disease. *The Cancer Bulletin*. **4**: 6-11.

Mcknight, A., Wilkinson, D., Simmons, G., Talbot, S., Picard, L., Ahuja, M., Marsh, M. y colaboradores. 1997. Inhibition of human immunodeficiency virus fusion by a monoclonal antibody to a coreceptor (CXCR4) is both cell type and virus strain dependent. *Journal of Virology*. **71**: 1692-1696.

Messmer, B. T., Messmer, D., Allen, S. L., Koltitz, J. E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E. J. y colaboradores. 2005. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*. **115**: 755-64.

Miyamoto, C., Neto, R. B. M., Di Cesare, S., Belfort, R., Burnier, M. N. 2010. Use of CD25 as an immunohistochemical marker for acquired ocular toxoplasmosis. *Arquivos Brasileiros De Oftalmologia*. **73**: 443-446.

Molica, S., Vacca, A., Ribatti, D., Cuneo, A., Cavazzini, F., Levato, D., Vitelli, G. y colaboradores. 2002. Prognostic value of enhanced bone marrow angiogenesis in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **100**: 3344-3351.

Moreau, E. J., Matutes, E., A'hern, R. P., Morilla, A. M., Morilla, R. M., Owusu-Ankomah, K. A., Seon, B. K. y colaboradores. 1997. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. **108**: 378-82.

Morgan, S., Seymour, J., Prince, H., Westerman, D., Wolf, M. 2004. Confirmation of the activity of the interleukin-2 fusion toxin denileukin diftitox against chemorefractory chronic lymphocytic leukemia, including cases with chromosome 17p deletions and without detectable CD25 expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. **10**: 3572-3575.

Moroi, M., Jung, S. M. 1997. Platelet receptors for collagen. *Thromb Haemost*. **78**: 439-44.

Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., Foroni, L., Hoffbrand, A. V. 1996. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol.* **92**: 97-103.

Pileri, S., Ascani, S., Sabattini, E., Fraternali-Orcioni, G., Poggi, S., Piccioli, M., Piccaluga, P. y colaboradores. 2000. The pathologist's view point. Part I--indolent lymphomas. *Haematologica.* **85**: 1291-1307.

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**: 219-34.

Ransohoff, R. M., Kivisakk, P., Kidd, G. 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* **3**: 569-581.

Resta, R., Thompson, L. 1997. T cell signalling through CD73. *Cellular Signalling.* **9**: 131-139.

Rozman, C., Montserrat, E. 1995. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* **333**: 1052-7.

Ruiz-Argüelles, G., Velázquez, B., Apreza-Molina, M., Pérez-Romano, B., Ruiz-Reyes, G., Ruiz-Argüelles, A. 1999. Chronic lymphocytic leukemia is infrequent in Mexican mestizos. *Int J Haematol.* **69**: 253-255.

Salem, H. K., Thiemermann, C. 2010. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells.* **28**: 585-96.

Schlossman, S., Bloumsell, L. 1995. Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. *Oxford University Press.*

Shanafelt, T. D., Witzig, T. E., Fink, S. R., Jenkins, R. B., Paternoster, S. F., Smoley, S. A., Stockero, K. J. y colaboradores. 2006. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* **24**: 4634-41.

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. 2012. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* **62**: 10-29.

Takei, K., Yamazaki, T., Sawada, U., Ishizuka, H., Aizawa, S. 2006. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leuk Res.* **30**: 625-31.

Trapido, E., Chen, F., Davis, K., Lewis, N., Mackinnon, J. 1994. Cancer among Hispanic males in south Florida. Nine years of incidence data. *Archives of internal medicine.* **154**: 177-185.

Triana, S., Villa, M. 2009. Optimización De Una Técnica Para El Aislamiento Cultivo Y Diferenciación De Células Madre Mesenquimales Proveniente De Medula Ósea De Ratón. Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias para la Salud. Escuela de Bioanálisis, Venezuela.

Vincent, A. M., Cawley, J. C., Burthem, J. 1996. Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **87**: 4780-8.

Wang, J. M., Kumar, S., Pye, D., Van Agthoven, A. J., Krupinski, J., Hunter, R. D. 1993. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int J Cancer.* **54**: 363-70.

Wood, A. 2001. Rituximab: an innovative therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Health Syst Pharm.*

Woyach, J. A., Johnson, A. J., Byrd, J. C. 2012. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood.* **120**: 1175-84.

Yamaguchi, M., Seto, M., Okamoto, M., Ichinohasama, R., Nakamura, N., Yoshino, T., Suzumiya, J. y colaboradores. 2002. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood.* **99**: 815-21.

Yamanaka, S., Li, J., Kania, G., Elliott, S., Wersto, R. P., Van Eyk, J., Wobus, A. M. y colaboradores. 2008. Pluripotency of embryonic stem cells. *Cell Tissue Res.* **331**: 5-22.

Consultas en línea

BD® US [En Línea]. 2013. <https://www.bd.com/> [Consulta: 14 de Diciembre del 2013].

National Cancer Institute, Bethesda, MD. [En Línea] 2008. Disponible en: www.seer.cancer.gov/csr/1975_2008. [Consulta: 07 de Febrero del 2013].

Science Photo Library. [En Línea] 2013. Disponible en: www.sciencephoto.com. [Consulta: 15 de Febrero del 2013].

Stemcell Technologies Inc. 570 West Seventh Avenue, Suite 400, Vancouver, Bc, V5z 1b3, Canada Tel: +1.604.877.0713. Fax: +1.604.877.0704. [En Línea] 2012. Disponible en: www.stemcell.com. [Consulta: 22 de Noviembre del 2012].

Winslow, T. U.S Govt ©. [En Línea]. 2007. Instituto Nacional del Cáncer disponible en: www.cancer.gov. [Consulta: 07 de Febrero del 2013].

10- Anexos

- Protocolo y consentimiento informado para la toma de la muestra de sangre del paciente con CLL en el Banco de Sangre del D.C.

PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA

Invitación a participar en un proyecto de investigación clínico denominado "LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA: DETERMINACIÓN DE ZAP- 70, CD 38 Y MUTACIONES SOMÁTICAS DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA CADENA PESADA DE INMUNOGLOBULINAS COMO MARCADORES PRONÓSTICOS" y "EXPRESIÓN DE MARCADORES EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC): ESTUDIO CLÍNICO EXPERIMENTAL EN VENEZUELA"

Usted tiene el diagnóstico de Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), una enfermedad que se caracteriza por la acumulación de un tipo de glóbulo blanco anormal llamado linfocito, de apariencia madura, con un curso variable, en la cual algunos pacientes pueden estar estables por años, mientras que otros pacientes pueden progresar rápidamente, requiriendo tratamiento. Esta enfermedad afecta mas frecuentemente a adultos en Europa y Estados Unidos; los médicos e investigadores de Venezuela están conscientes de las principales características y evolución de la enfermedad por los reportes que surgen principalmente de las publicaciones realizadas en esos países, sin embargo existe insuficiente conocimiento científico acerca de las características de la patología en nuestro país.

Su médico hematólogo esta participando como investigador en un estudio multicéntrico entre: Banco Municipal de Sangre (BMS), Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (IBE-UCV), Unidad de Investigaciones en Inmunología de la Universidad de Carabobo (UNIVENIN-UC), CHU Hospital de Avicenne en Francia, Universidad de Paris XIII e Instituto de Investigaciones Científicas de Venezuela (IVIC) el cual tiene como objetivos

1-La realización de pruebas de laboratorio que tienen utilidad pronóstica: marcadores celulares, plasmáticos (biomarcadores), genéticos y moleculares de los genes de Inmunoglobulinas, usando ADN extraído a partir de muestras de sangre.

2- La evaluación de las características epidemiológicas de los pacientes, como sexo, edad, origen de los ancestros, tiempo desde el diagnóstico hasta el primer tratamiento, evolución de la enfermedad, etc., los cuales se tabularan en una base de datos denominada PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA

Los pacientes en el futuro puedan beneficiarse del conocimiento obtenido de los resultados de éste estudio, el cual dará información en relación al pronóstico de la enfermedad y esto ayudará a su médico al momento de decidir el tratamiento.

A usted se le tomará una muestra de sangre de aproximadamente 20 ml (equivalente a 5 tubos de hematología), por punción de la vena del pliegue del codo. Cuando se realiza la obtención de dichas muestras puede presentarse dolor en el sitio de la extracción ó la aparición de hematomas, puede requerirse la toma de una segunda muestra para confirmar algunos resultados

Consentimiento Informado Versión LLC 1.0. Venezuela
15 noviembre 2007. CONFIDENCIAL

COMITÉ DE ÉTICA Y BIOPROTECCIÓN



PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA

Usted conocerá los resultados de los estudios de éstas pruebas. Estas pruebas se realizarán sin costo alguno y los participantes no recibirán retribución alguna por éste estudio

Su decisión para formar parte de éste estudio es voluntaria, usted puede no aceptar participar si no lo desea, sin dar explicaciones, esto no afectara la calidad de la atención que recibe ni modifica el tratamiento que recibe. Si no acepta, no habrá cambios de ningún tipo en su tratamiento o en la relación con su médico.

Ud. Puede llevarse éste consentimiento a su casa para que sea leído con detenimiento y discutido con familiares y amigos, pudiendo tomarse el tiempo necesario para que manifieste su decisión de participar en el estudio. Se le pide que otorgue su autorización, y si usted esta de acuerdo, su doctor recolectara los datos para incluirlos en la base de datos y se le tomarán las muestras de sangre.

Una vez que la información haya sido registrada, será analizada únicamente con el propósito de este protocolo junto con los datos de otros pacientes como usted. La base de datos contendrá información médica, datos del diagnóstico, los resultados principales de las pruebas realizadas y el tratamiento recibido. No incluye datos personales, su identidad será confidencial y éste consentimiento se archivará en las Historias Médicas

Este proyecto de investigación fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética de la Institución (Coordinadora Dra. María Teresa Franco) Tf: 0212-5629072

Si decide aceptar que su información médica y epidemiológica sea incluida en este protocolo, por favor firme esta forma como señal de aceptación.

Certifico que he leído este documento de CONSENTIMIENTO INFORMADO y me han explicado su contenido. Declaro que entiendo su contenido. Permito a mi médico recolectar la información médica relevante de la historia clínica e ingresarla en una base de datos llamada "PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA", así como la toma de una muestra de sangre venosa.

Estoy de acuerdo en que mi información médica sea registrada, que mi identidad sea guardada en estricta confidencialidad y que nadie, excepto mi médico tratante y el coordinador del estudio en el Banco Municipal de Sangre Dr. José Luis López y su equipo ingrese y analice información específica acerca de mi.

Nombre del Paciente: _____ (letra de molde)

Teléfono de contacto: _____

Firma : _____ Fecha: _____



Consentimiento Informado Versión LLC 1.0. Venezuela
15 noviembre 2007. CONFIDENCIAL

COMITÉ DE ÉTICA INDEPENDIENTE
COMITÉ BIOÉTICO

PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA

Invitación a participar en un proyecto de investigación clínico denominado "LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA: DETERMINACIÓN DE ZAP- 70, CD 38 Y MUTACIONES SOMÁTICAS DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA CADENA PESADA DE INMUNOGLOBULINAS COMO MARCADORES PRONÓSTICOS" y "EXPRESIÓN DE MARCADORES EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC): ESTUDIO CLÍNICO EXPERIMENTAL EN VENEZUELA"

Usted tiene el diagnóstico de Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), una enfermedad que se caracteriza por la acumulación de un tipo de glóbulo blanco anormal llamado linfocito, de apariencia madura, con un curso variable, en la cual algunos pacientes pueden estar estables por años, mientras que otros pacientes pueden progresar rápidamente, requiriendo tratamiento. Esta enfermedad afecta mas frecuentemente a adultos en Europa y Estados Unidos; los médicos e investigadores de Venezuela están conscientes de las principales características y evolución de la enfermedad por los reportes que surgen principalmente de las publicaciones realizadas en esos países, sin embargo existe insuficiente conocimiento científico acerca de las características de la patología en nuestro país.

Su médico hematólogo esta participando como investigador en un estudio multicéntrico entre: Banco Municipal de Sangre (BMS), Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (IBE-UCV), Unidad de Investigaciones en Inmunología de la Universidad de Carabobo (UNIVENIN-UC), CHU Hospital de Avicenne en Francia, Universidad de Paris XIII e Instituto de Investigaciones Científicas de Venezuela (IVIC) el cual tiene como objetivos

1-La realización de pruebas de laboratorio que tienen utilidad pronóstica: marcadores celulares, plasmáticos (biomarcadores), genéticos y moleculares de los genes de Inmunoglobulinas, usando ADN extraído a partir de muestras de sangre.

2- La evaluación de las características epidemiológicas de los pacientes, como sexo, edad, origen de los ancestros, tiempo desde el diagnóstico hasta el primer tratamiento, evolución de la enfermedad, etc., los cuales se tabularan en una base de datos denominada PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA

Los pacientes en el futuro puedan beneficiarse del conocimiento obtenido de los resultados de éste estudio, el cual dará información en relación al pronóstico de la enfermedad y esto ayudará a su médico al momento de decidir el tratamiento.

A usted se le tomará una muestra de sangre de aproximadamente 20 ml (equivalente a 5 tubos de hematología), por punción de la vena del pliegue del codo. Cuando se realiza la obtención de dichas muestras puede presentarse dolor en el sitio de la extracción ó la aparición de hematomas, puede requerirse la toma de una segunda muestra para confirmar algunos resultados

Consentimiento Informado Versión LLC 1.0. Venezuela
15 noviembre 2007. CONFIDENCIAL

COMITÉ DE ÉTICA Y BIOPROTECCIÓN



PROCOLO DE ESTUDIO DE LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA

Nombre del Testigo: _____ (letra de molde)
Teléfono de contacto: _____

Firma : _____ Fecha: _____

Nombre del Investigador : _____ (letra de molde)
Teléfono de contacto: _____

Firma : _____ Fecha: _____

Consentimiento Informado Versión LLC 1.0. Venezuela
15 noviembre 2007. CONFIDENCIAL

COMITÉ DE ÉTICA INDEPENDIENTE



- Consentimiento informado para el aspirado de médula ósea para protocolos de regeneración ósea en fase experimental realizado en el hospital universitario de Caracas con la Unidad de Terapia Celular del IVIC.

CONSENTIMIENTO VALIDO

Yo, _____ C.I.: _____

Nacionalidad _____ Estado _____ Civil _____ Domiciliado (a) en: _____ siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio que mas abajo índico, y sin que medie coacción ni violencia alguna, declaro mediante la presente:

1.- Haber sido informado (a) de manera objetiva, clara y sencilla, por parte de los Dres. José Cardier y Egidio Romano de todos los aspectos relacionados al tratamiento de trasplante de células madre mesenquimales y las células progenitoras derivadas de ellas, cuya finalidad es la regeneración de hueso para curar el defecto óseo que padezco, según diagnóstico (_____) realizado por mi médico tratante Dr. César González

2.- Tener conocimiento de que el implante de células madre mesenquimales y sus progenitoras derivadas de ellas, constituye un tratamiento posible innovador, de carácter experimental, para la enfermedad que padezco.

3.-Haber sido informado (a) de que este tipo de tratamiento amerita la toma de una muestra de aspirado de medula ósea, bajo condiciones de esterilidad. Dicha toma la realizará Dr. _____, en el Hospital (Clínica) _____, bajo anestesia.

4. El aspirado de médula ósea será enviada a la Unidad de Terapia Celular del IVIC, bajo la responsabilidad de los Dres. Egidio Romano y José Cardier en donde se obtendrán células madre mesenquimales, las cuales se cultivaran hasta obtener el número de células necesario y posteriormente se procederá a su diferenciación en células formadoras de hueso y de vasos sanguíneos (células osteoblásticas y endoteliales) para que sean implantadas en el sitio de lesión de mi hueso

5. El remanente de células madre obtenidas en la Unidad de de Terapia Celular serán congeladas y almacenadas por los Doctores Romano y Cardier para ser utilizadas en caso de ser necesario en posteriores implantes.

6. Haber sido informado (a), que un día antes del procedimiento de aspirado de médula ósea, se me extraerá entre 400 a 500 mililitros de sangre para obtener el suero correspondiente. Este suero será usado como componente del medio de cultivo para cultivar las células obtenidas del aspirado de medula ósea. El procedimiento de toma de sangre será realizado en el banco de sangre de la institución hospitalaria.

7. Haber sido informado (a) que el día anterior al procedimiento quirúrgico de trasplante de células madre, se me extraerá entre 10 a 15 mililitros de sangre para obtener plasma que será usado para el trasplante de células madre. El procedimiento de toma de sangre será realizado en el banco de sangre de la institución hospitalaria.

8. La Unidad de Terapia Celular, en nombre de los Doctores Cardier y Romano no garantiza que se obtenga del aspirado de médula ósea, la cantidad de células necesarias para el trasplante. Tampoco se hacen responsables de que se obtenga una regeneración ósea que cure en forma definitiva la lesión.

9.- Que cualquier pregunta que tenga en relación con este tratamiento, me será respondida oportunamente por parte de los Dres. González 0414-8214563, Dr. Egidio Romano y Dr. Jose Cardier, Unidad de Terapia Celular del IVIC, telf. 5041158 / 1792 / 1263).