

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Pediatría



Estudio de quemoquinas en la Leucemia Linfoblástica Aguda infantil. Papel del eje CXCR3/CXCL10 en la recaída del Sistema Nervioso Central.



TESIS DOCTORAL

Ana María Gómez García

Madrid, 2012

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría



**Hospital Infantil Universitario
Niño Jesús**

Comunidad de Madrid

Estudio de quemoquinas en la Leucemia Linfoblástica Aguda infantil. Papel del eje CXCR3/CXCL10 en la recaída del Sistema Nervioso Central.

Memoria presentada por ANA MARIA GOMEZ GARCIA para optar al grado de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de la Tesis:

Manuel Ramírez Orellana

TESIS DOCTORAL

Ana María Gómez García

Madrid, 2012

A mis padres y hermanos.
A Javier.

Ahora llega la hora de los agradecimientos...

En primer lugar quiero agradecer a mi director de Tesis, Manuel, no solo el haber hecho posible este trabajo, sino la forma, ya que desde el principio sin conocerme confió en mí, y día a día fue capaz de transmitirme su entusiasmo, sus conocimientos y su dedicación por la investigación. Gracias por tu paciencia y apoyo en la escritura de esta tesis, sin su ayuda, no habría sido posible.

A Luis Madero, por ser la primera persona en darme la oportunidad de realizar una tesis doctoral y pensar en mí para seguir trabajando en la Oncología Pediátrica.

A Carolina, compañera de la residencia y co-doctoranda, por las horas que hemos pasamos juntas dentro y fuera del Laboratorio, cuando comenzamos este proyecto por el 2006. Sin ella, parte de estos resultados no existirían.

Al Servicio de Análisis Clínicos del HNJS, en especial, a todas las personas que forman parte de la sección de Hematología, a Luz, Pilar, Mercedes y Ana, por iniciarme en el mundo de la Hematología y transmitirme sus conocimientos.

A todas las personas que han formado o forman parte hoy del Laboratorio de Oncología, que me han ayudado, aconsejado, animado, han compartido sus conocimientos conmigo y me han ofrecido su amistad.

Quería agradecer a Lorea, con la que trabajo hoy en el laboratorio, y que ha vivido de cerca una parte importante de esta tesis. Por escucharme y darme ánimos en la recta final, por ser una compañera de trabajo y una amiga estupenda.

A los pediatras-oncólogos del Hospital Niño Jesús, especialmente a Álvaro Lassaletta, por su papel en este proyecto, enviando las muestras al Laboratorio.

A todos los pacientes y tutores que han cedido sus muestras, y han permitido que estos resultados sean posibles.

A todas las unidades de Onco-Hematología pediátrica que han colaborado en el envío de las muestras: Hospital Marqués de Valdecilla, Hospital Virgen del Camino, Hospital Valle de Hebrón, Hospital Miguel Servet, Hospital Clínico de Valencia, Hospital Son Dureta, Hospital General de Alicante, Hospital Virgen de la Arrixaca, Hospital Carlos Haya, Hospital Reina Sofía, Hospital San Rafael, Hospital de Santiago de Compostela, Hospital de Cruces, Hospital Doce de Octubre, Hospital Gregorio Marañón y Hospital Del Niño Jesús.

A Mundipharma por encargarse de la logística de las muestras.

A la Fundación Willis y Caico por financiar parte de este proyecto y dar su apoyo a la investigación en oncología infantil.

A la Fundación Inocente, y a la fundación de Onco-hematología del HNJS.

Y quería dejar para el final a las personas que, fuera del mundo de la ciencia, son importantes en mi vida.

A mis amigos, que están deseando celebrar el final de esta etapa, y verme más de ahora en adelante.

A Regina, por transmitirme siempre su energía positiva, y su cariño.

A mis hermanos del alma, María y Vicente, por apoyarme, escucharme y ayudarme cada día.

A Javier, por su cariño, por su apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado.

A mis padres, por apoyarme siempre, por ser los mejores padres del mundo, y por quererme tanto.

Gracias a todos!!!!

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	3
1 Aspectos generales y estado actual del tema	3
2 Fisiopatología	4
3 Presentación clínica	4
4 Diagnóstico y clasificación de la LLA	5
5 Factores pronósticos y grupos de riesgo	6
6 Tratamiento de las LLA	8
7 Recaída de la LLA	9
8 Perspectivas futuras	10
INFILTRACIÓN Y RECAÍDA LEUCÉMICA EN SNC	10
1 Aspectos generales y estado actual del tema	10
2 Factores relacionados con el pronóstico y tratamiento de la LLA en el SNC	11
3 Bases moleculares de la infiltración y recaída leucémica del SNC	12
QUEMOQUINAS	12
1 Definición, estructura y nomenclatura	12
2 Quemoquinas y receptores estudiados, expresión celular	14
3 Quemoquinas y SNC	17
4 Quemoquinas y cáncer	21
5 Quemoquinas y metástasis	24
6 Perspectivas futuras	26

II. OBJETIVOS	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. CONDICIONES DEL ESTUDIO	33
2. PACIENTES	33
3. MUESTRAS	33
4. ESTUDIO DE LA MO PARA LA DETECCIÓN DEL PERFIL DE QUEMOQUINAS	33
4.1 Preparación de la muestra	
4.2 Cuantificación de receptores de quemoquinas en MO	
4.3 Análisis de la MO por CMF	
5. ESTUDIO DEL LCR PARA LA CUANTIFICACION DE LOS NIVELES DE QUEMOQUINAS	36
5.1 Procesamiento de los LCRs para su estudio	
5.2 Cuantificación de quemoquinas en el LCR: Bioplex y ELISA.	
6. ENSAYOS IN VITRO DE QUEMOTAXIS Y VIABILIDAD	39
6.1 Muestras humanas y líneas celulares	
6.2 Ensayos de quemotaxis	
6.3 Ensayos de viabilidad con fármacos antileucémicos	
7. ESTUDIO DEL GEN CXCL10 EN MO POR Q-PCR	42
7.1 Selección de pacientes y líneas	
7.2 Selección del gen problema	
7.3 Cuantificación de la expresión de CXCL10 mediante Q-PCR	
8. ANALISIS ESTADÍSTICO	44

IV. RESULTADOS	45
ESTUDIO DEL PERFIL DE RECEPTORES Y QUEMOQUINAS EN MO Y LCR	47
1 Características de los pacientes del estudio	47
2 Estudio del perfil de receptores de quemoquinas en muestras de MO al diagnóstico	48
2.1 Cuantificación de receptores de quemoquinas en LLA según linaje	
2.2 Cuantificación de receptores de quemoquinas en LLA-T según riesgo	
2.3 Cuantificación de receptores de quemoquinas en LLA-T según estadio madurativo	
2.4 Cuantificación de receptores de quemoquinas en LLA-B según riesgo	
2.5 Cuantificación de receptores de quemoquinas en LLA-B según estadio madurativo	
3 Estudio del perfil de quemoquinas en muestras de LCR al diagnóstico	54
3.1 Cuantificación de quemoquinas en LLA según linaje	
3.2 Cuantificación de receptores de quemoquinas en LLA-T según riesgo	
3.3 Cuantificación de receptores de quemoquinas en LLA-T según estadio madurativo	
3.4 Cuantificación de receptores de quemoquinas en LLA-B según riesgo	
3.5 Cuantificación de receptores de quemoquinas en LLA-B según estadio madurativo	
4 Perfil de expresión de receptores en infiltración	58
5 Perfil de expresión de receptores y recaídas	58
5.1 Perfil de expresión de receptores y recaídas medulares y extramedulares	
5.2 Perfil de expresión de receptores y recaídas medulares	
5.3 Perfil de expresión de receptores y recaídas en SNC	
5.4 Perfil de expresión de receptores de quemoquinas al diagnóstico y recaída	
PAPEL DEL EJE CXCR3/CXCL10 EN LA RECAIDA EN LA LLA	70
1 El eje CXCR3/CXCL10 en la recaída	70
1.1 Papel del eje CXCR3/CXCL10 en la quemotaxis	
1.2 Papel del eje CXCR3/CXCL10 en la resistencia a fármacos antileucémicos	
2 Estudio de expresión de CXCL10 en muestras de LLA.	80

V. DISCUSIÓN	83
1 Quemoquinas y SNC	85
2 Receptores de quemoquinas y ligandos en LLA al diagnóstico	88
3 Receptores de quemoquinas y ligandos en LLA en la recaída en MO y en el SNC	93
4 Papel del eje CXCR3/CXCL10 en recaída de LLA en SNC	96
5 Implicaciones traslacionales	98
VI. CONCLUSIÓN	99
VII. BIBLIOGRAFIA	103

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
APC	Aloficocianina
ARA-C	Árabinósido de citosina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BFM	Berlín-Frankfurt-Munich
BHE	Barrera hemato encefálica
CC	Citología convencional
CMF	Citometría de flujo
CNS	Central nervous system
DAG	Diacilglicerol
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EGIL	Grupo europeo de clasificación leucémica por inmunofenotipo
EM	Esclerosis múltiple
EMR	Enfermedad mínima residual
ENA 78	Epithelial cell-derived neutrophil-activating factor 78
FAB	Franco-Americano-Británica
FBS	Suero bovino fetal
FITC	Isocianato de fluoresceína
FSC	Linear forward scatter
GCP-2	Granulocyte chemoattractant protein 2
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HNJS	Hospital Niño Jesús
IL	Interleuquina
IFN	Interferon

I-TAC	Interferon inducible T-cell chemoattractant
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LPS	Lipopolisacárido
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MIP	Proteína inflamatoria de los macrófagos
MNC	Células mononucleadas
MO	Médula ósea
MTX	Metotrexato
μ M	microMolar
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PECY5	Ficoeritrina cianina 5
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PerCP	Proteína Clorofila Peridina
PE	Ficoeritrina
PETHEMA	Programa para el estudio de la Terapéutica en Hemopatía.
Pg	Picogramo
PKC	Proteína kinasa C
PLD	Fosfolipasa D
QPCR	PCR cuantitativa
RC	Remisión completa
RA	Riesgo alto
RANTES	Regulation on activation of normal T cells expressed and secreted
RB	Riesgo bajo
RI	Riesgo intermedio
RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR retrotranscriptasa
SDF	Stromal cell-derived factor

SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sangre periférica
SSC	log side angle scatter
TECK	Thymus expressed chemokine
TNF	Factor de necrosis tumoral
TTI	Triple terapia intratecal
U.A.	Unidades arbitrarias

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

1. Aspectos generales y estado actual del tema

Las leucemias constituyen el 40% del total de tumores infantiles (Figura 1), siendo el subtipo más común la Leucemia Linfoblástica aguda (LLA), que ocurre en el 75-80% de los niños. El otro 20% de las leucemias infantiles son Leucemias Mieloides Agudas (LMA), alrededor de un 2 % son Leucemia Mieloide Crónica (LMC), mientras las Leucemias Linfáticas Crónicas son muy poco frecuentes en la infancia. El pico de incidencia máximo se establece entre los 2-5 años de edad.

La supervivencia de los pacientes afectados de LLA se ha incrementado notablemente en los últimos años, presentando, con los tratamientos actuales una tasa de curación global que se aproxima al 80% en los países desarrollados. A pesar de estos excelentes resultados el 20% de los pacientes fracasan en el tratamiento. El gran reto actual en la terapia de la LLA infantil es saber seleccionar a los pacientes que se pueden curar con tratamientos menos tóxicos y a los pacientes que se beneficiarían de terapias más agresivas.

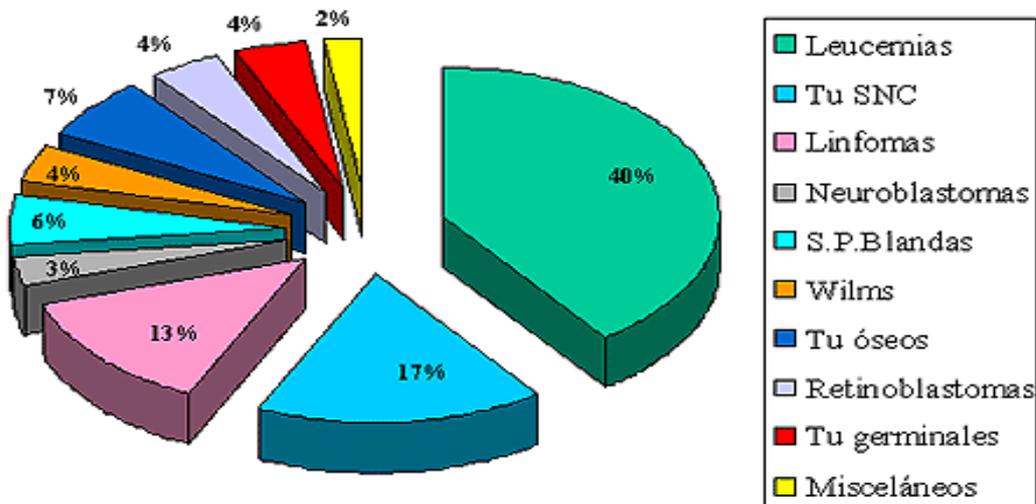


Figura 1. Frecuencia relativa de los tumores infantiles.

2. Fisiopatología

La LLA es una proliferación neoplásica a partir de una célula hematopoyética inmadura, la mayoría de las veces comprometida con un linaje linfoide T o B, que ha perdido la capacidad de diferenciación. Para que las células hematopoyéticas se transformen en leucémicas se requiere una alteración en el control normal de la proliferación o un bloqueo de la diferenciación o una resistencia a la apoptosis (Pui y col., 2004).

La caracterización molecular de las células blásticas ha ayudado a entender la patogénesis de esta enfermedad (Gilliland y col., 2002). Los mecanismos oncogénicos principales incluyen la expresión aberrante de proteínas oncogénicas (MYC, TAL1, LYL1, LMO2 y HOX11) y las translocaciones cromosómicas que dan lugar a genes fusión que codifican quinasas (BCR-ABL) o factores de transcripción (TEL-AML1, E2A-PBX, y MLL) expresados de forma desregulada.

Muchos estudios predicen que el primer evento oncogénico que se produce no es suficiente para el desarrollo de la leucemia, se necesita una segunda alteración genética que altere la diferenciación y proliferación normal de progenitores hematopoyéticos (Ernst y col., 2002; Speck y col., 2002). Esto ha sido demostrado en los estudios sobre las translocaciones cromosómicas TEL-AML1 que suceden intraútero (Greaves M., 2005).

3. Presentación clínica

La clínica de la LLA refleja infiltración de la medula ósea (MO) por parte de los blastos y la extensión extramedular de la enfermedad. Los síntomas más frecuentes al diagnóstico son aquellos relacionados con la insuficiencia medular: anemia, trombopenia y neutropenia. Algunos pacientes presentan hepatoesplenomegalia y dolores en huesos largos. La presentación clínica de la LLA de estirpe T (15% del total de las LLA) posee algunos rasgos característicos. Los pacientes suelen ser de mayor edad, y se presentan con recuentos leucocitarios más altos al diagnóstico. No es raro que debuten con masa mediastínica y tienen una incidencia mayor de afectación del Sistema Nervioso Central (SNC) al diagnóstico.

4. Diagnóstico y clasificación de la LLA.

El diagnóstico definitivo de la LLA se realiza mediante el estudio de MO (Figura 2). La fibrosis o el empaquetamiento pueden dificultar el aspirado de la MO, haciendo necesaria la biopsia.

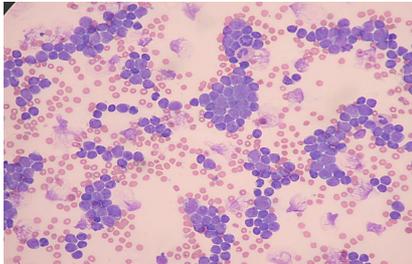


Figura 2. MO infiltrada por blastos de Leucemia Linfocítica Aguda

Actualmente el diagnóstico de la LLA requiere la integración del análisis morfológico, del inmunofenotipo, así como del diagnóstico citogénético y molecular.

- **Clasificación morfológica:**

La clasificación morfológica FAB (Franco-Americano-Británica) define tres subtipos de LLA (L1, L2 o L3) (Bennet y col., 1976). Sin embargo debido a la alta homogeneidad de los linfoblastos al microscopio y a la poca correlación entre la morfología con las otras determinaciones (inmunofenotipo y alteraciones genéticas), la clasificación morfológica no es útil en el manejo clínico de la LLA.

- **Clasificación por inmunofenotipo:**

El inmunofenotipo es esencial para realizar un diagnóstico correcto de la LLA (Pui y col., 1993). Según el *European Group for immunological classification of leucemia* (EGIL) las LLA se clasifican en los siguientes subtipos (Bene y col., 1995). Inmunofenotipo de las células B (tabla 1) y de las células T (tabla 2).

	CD19	CD22	CD10	IgC	IgM	Tdt
Pro-B	+	+	-	-	-	+
B común	+	+	+	-	-	+
Pre-B	+	+	+	+	-	+
Madura	+	+	+/-	-	+	+/-

Tabla 1. Clasificación EGIL de las LLA-B en función del inmunofenotipo.

	CD3c	CD3s	CD7	CD1a	TdT	CD2	CD5	CD4/CD8
Pro-T	+	-	+	-	+/-	-	-	-/-
Pre-T	+	+/-	+	-	+/-	+	+	-/+
Intermedia	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-
Madura	+	+	+	-	+/-	+	+	+/-

Tabla 2. . Clasificación EGIL de las LLA-T en función del inmunofenotipo.

- **Clasificación genética:**

Los avances en las técnicas de citogenética y biología molecular de los últimos años, han permitido identificar un gran número de anomalías genéticas en las células leucémicas (Pui y col., 2001; Ferrando y col., 2000). Estas alteraciones genéticas pueden afectar al número total de cromosomas o a su estructura. Las translocaciones son las anomalías cromosómicas más frecuentes. Las alteraciones genéticas tienen importancia tanto en el pronóstico como en el tratamiento de la enfermedad (Pui y col., 2011; Mullighan y col., 2007). La hiperploidía en los blastos es un factor de buen pronóstico (Pui y col., 2008) y alteraciones genéticas como la translocación BCR-ABL o translocaciones de MLL implican peor pronóstico.

5. Factores pronóstico y grupos de riesgo.

La tasa de curación global de los niños y adolescentes con LLA ha alcanzado el 80%. La clasificación de los pacientes al diagnóstico según el riesgo que presentan de recaída es fundamental en la elección del tratamiento que van a recibir. La finalidad de esta selección es evitar, tanto un exceso de tratamiento (con la toxicidad que conlleva), como un tratamiento insuficiente.

Existen más de 60 factores pronósticos que han mostrado diferencias significativas en los distintos ensayos clínicos que se han realizado en los últimos años. A medida que los tratamientos se han intensificado y los resultados han ido mejorando, muchos parámetros clínicos y de laboratorio que hace unos años eran de importancia pronóstica, han perdido su significación estadística al ser estudiados en análisis multivariantes apropiados.

En la actualidad, la edad, el número de leucocitos al diagnóstico, el genotipo de las células leucémicas y la respuesta inicial al tratamiento son los parámetros

principalmente aceptados y utilizados para configurar los grupos de riesgo (Madero L, y col., 2006).

5.1 Factores clínicos

El impacto pronóstico de los factores clínicos difiere si la LLA es de estirpe B o T. Los pacientes con LLA B precursora, que tienen entre 1 y 9 años de edad y con un recuento leucocitario bajo al diagnóstico ($<50 \times 10^9/L$) poseen un buen pronóstico y se clasifican en el grupo de riesgo estándar o riesgo bajo. Con las mejoras en los tratamientos, el impacto en la supervivencia de estos dos factores (edad y leucocitos al diagnóstico) va perdiendo relevancia. La LLA de estirpe T se considera de alto riesgo desde el diagnóstico.

Dentro del grupo de los menores de 2 años, los lactantes (< 1 año) presentan un pronóstico más desfavorable. Este grupo asocia otros factores considerados de mal pronóstico como un recuento leucocitario elevado, enfermedad extramedular y afectación del SNC. Hasta un 80% de los lactantes presentan translocaciones del gen MLL, en la banda 11q23 del cromosoma 11, que se asocian a un peor pronóstico. Las alternativas de tratamiento en este subgrupo de edad con mejores resultados son la quimioterapia intensiva y el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

5.2 Factores citogenéticos

Los linfoblastos hiperdiploides (más de 50 cromosomas en las células) presentan mejor respuesta al tratamiento que los eudiploides o hipodiploides. Esto es debido a que las células leucémicas hiperdiploides tienen una mayor predisposición a la apoptosis porque son capaces de acumular mayor concentración de metabolitos activos del metotrexato (poliglutamatos) y por ello son más sensibles a este fármaco (Pui y col., 2008).

Otras anomalías genéticas que presentan muy mal pronóstico son el cromosoma Philadelphia $t(9;22)$ y la translocación $t(4;11)$. Entre las que otorgan a priori un buen pronóstico son la $t(12;21)$ con la fusión TEL-AML1, y las trisomías 4, 10 y 17. Las células que expresan TEL-AML1 son muy sensibles a la asparraginasa *in vitro*. Recientemente, las trisomías 4 y 18 también se han asociado a un buen pronóstico. Aunque la $t(1;19)$ fusión E2A/PBX1 se había asociado a un peor pronóstico hace 20

años, actualmente se ha observado que con los nuevos tratamientos más intensivos es una de las anomalías cromosómicas de mejor pronóstico en la LLA.

En los últimos años la detección de enfermedad mínima residual (EMR) se está estableciendo como un pilar básico para el seguimiento de la enfermedad y para el diagnóstico de recaídas precoces. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en la técnica más sensible para detectar EMR. La citometría de flujo también presenta buena sensibilidad y es capaz de detectar los inmunofenotipos específicos de las células leucémicas, lo que permite distinguirlas de las células normales.

5.3 Respuesta al tratamiento

Es el factor pronóstico más importante en los pacientes con LLA. La respuesta temprana al tratamiento está considerada como el factor pronóstico más determinante. Los pacientes que tras las 4-6 semanas (según protocolos) que dura la inducción no presentan remisión completa, tienen una alta tasa de recaídas y una supervivencia libre de enfermedad (SLE) reducida.

Desde el punto de vista farmacodinámico y farmacogenómico, las recaídas de los pacientes pueden ser atribuidas a la exposición inadecuada a ciertas drogas, y no sólo a la resistencia a la quimioterapia por parte de las células malignas.

Se han detectado algunos polimorfismos en genes que codifican ciertas proteínas que desarrollan funciones de transporte, receptores y metabolizadores de ciertas drogas.

El gran aumento en la tasa de curación de los pacientes con LLA se debe principalmente al uso de tratamientos dirigidos a los distintos grupos de riesgo. Por lo tanto aquellos clasificados en riesgo alto (RA) son tratados de forma más agresiva, reservando protocolos menos agresivos en pacientes con menor riesgo de recaída.

6. Tratamiento de la LLA

El tratamiento está dirigido a los distintos grupos de riesgo, en todos ellos comprende las fases de inducción, intensificación (consolidación) y mantenimiento. El objetivo principal de todo tratamiento de una LLA es inducir una remisión completa con una recuperación de la hematopoyesis normal para obtener una

supervivencia prolongada. Remisión completa es la no existencia de enfermedad ni en la exploración física ni en el examen de sangre periférica ni de MO. La MO debe tener una celularidad normal, con menos del 5% de blastos. La remisión completa incluye también la ausencia de afectación del SNC o de afectación extramedular (Pui CH. y col., 2000).

Con las nuevas y sofisticadas técnicas de laboratorio, los investigadores han comprobado que, en pacientes que están en aparente remisión completa, puede existir enfermedad oculta. Los mecanismos que han intentado explicar la persistencia de células leucémicas durante la remisión son el desarrollo de la resistencia a la quimioterapia, la localización de célula leucémicas en zonas llamadas santuarios, como el testículo y el SNC, y la persistencia de una subpoblación de células leucémicas en un estado quiescente del ciclo celular (G_0) en el cual son menos vulnerables a la quimioterapia (Rubnitz JE. Y col., 2003).

7. Recaídas de las LLA

La recaída continúa siendo el reto más importante para conseguir la curación total y es la principal forma de fracaso de tratamiento en los pacientes con LLA. La recaída de la LLA supone la cuarta neoplasia más frecuente en la edad pediátrica. Uno de los factores que se ha asociado a las recaídas leucémica, es la localización anatómica de dichas recaídas, de manera predominante en testículo y en el SNC, lo que justificó la consideración de dichos órganos como santuarios. Los sitios más frecuentes de recaída extramedular son el SNC y los testículos. Las recaídas extramedulares pueden ser aisladas (<5% blastos en MO) o combinadas con la recaída medular (>5% blastos). Los niños con recaídas extramedulares tienen mejor pronóstico que las recaídas aisladas en MO. Este hecho es, en parte, debido a que los blastos de las recaídas extramedulares han sobrevivido al tratamiento ocultándose en santuarios y por tanto probablemente no han sido expuestos suficientemente a la quimioterapia. El microambiente del SNC y testicular soportan un lento crecimiento de las células leucémicas y las protege de influencias externas (Kuo y col., 1975). Por lo tanto la presencia de leucemia en los santuarios requiere tratamiento local específico. Aquellos pacientes con recaídas combinadas, presentan mejor pronóstico que aquellos pacientes con recaídas aisladas en MO (Büher y col., 1993). La

explicación más lógica sería que en las recaídas combinadas, los blastos de la MO provienen de los compartimentos extramedulares, lo que sugiere, un trasiego de los blastos leucémicos desde sus santuarios a otras localizaciones.

8. Perspectivas futuras

El tratamiento de la LLA, quimioterapia sistémica y terapia dirigida al SNC, ha mejorado el pronóstico de estos pacientes de manera muy importante en los últimos años. A pesar de que la tasa de curación total para la LLA se ha incrementado en los últimos años, existe en la actualidad un 20-25% de pacientes que fallecen por esta enfermedad, y existen también pacientes que sobreviven con complicaciones secundarias al tratamiento que limitan su calidad de vida. En los últimos años las investigaciones se dirigen al estudio de polimorfismos genéticos de las enzimas que metabolizan los fármacos, las proteínas transportadoras de fármacos y sus lugares de acción (Biondi y col., 2000). La identificación de oncoproteínas específicas y la comprensión de las bases moleculares que regulan la supervivencia y la apoptosis de las células leucémicas, han permitido desarrollar nuevos agentes antileucémicos que van dirigidos a dianas moleculares específicas.

INFILTRACION Y RECAIDA LEUCEMICA EN EL SNC

1. Aspectos generales y estado actual del tema

La importancia de realizar una terapia dirigida al SNC fue demostrada por investigadores del Hospital de St Jude (Memphis) en los años 70 (Aur y col., 1971). Este hecho cambió el pronóstico de la LLA: antes de este momento, más del 50% de los pacientes que alcanzaban remisión completa con la quimioterapia, terminaban recayendo en el SNC. El uso de quimioterapia estratificada por riesgos y el tratamiento dirigido al SNC, Terapia Triple Intratecal (TTI) han hecho que se alcance una supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 5 años del 80%. Aún así, las recaídas en el SNC son una importante causa de morbilidad y mortalidad, y ocurren entre un 3-8% de los pacientes (Pui y col., 2008).

2. Factores relacionados con el pronóstico y tratamiento de la LLA en el SNC

La mayor parte de los niños con LLA tienen enfermedad subclínica en el SNC al diagnóstico. La importancia de esta afectación se basa en que el SNC puede comportarse como un santuario para las células leucémicas que residieran en él, no permitiendo que los agentes quimioterápicos alcancen las concentraciones adecuadas y puedan estar mejor capacitados para recaer. En este sentido, es muy importante caracterizar qué moléculas están implicadas en la colonización leucémica de estos santuarios, puesto que estas moléculas pueden convertirse en dianas terapéuticas específicas de leucemias con alta capacidad de recaer. Aunque se ha descrito que los pacientes con hiperleucocitosis ($>50 \times 10^9/L$), el inmunofenotipo T, el fenotipo B con leucocitos $>100 \times 10^9/L$, alteraciones genéticas de alto riesgo como t(4;11) y t(9;22) o la hipodiploidia, así como la presencia de células blásticas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (>5 leucocitos) mediante citología convencional (CC) tienen un mayor riesgo de presentar una recaída del SNC (Pui y col., 2006), el valor predictivo de alguno de estos parámetros es todavía limitado (Rubnitz y col., 2003). Por ejemplo, en un trabajo reciente de nuestro laboratorio hemos comprobado que la detección de blastos en líquido cefalorraquídeo (LCR) en el momento del diagnóstico no es un factor predictivo de recaída posterior (Martínez y col., 2011). La mayoría de recaídas en SNC ocurren de forma temprana tras el diagnóstico de la enfermedad, pudiéndose beneficiar los pacientes de una terapia más específica de la enfermedad meníngea. Sería pues del máximo interés individualizar a los niños con LLA con riesgo de recaer en el SNC.

Respecto al tratamiento intratecal, hoy en día, las combinaciones de tres drogas, metotrexato (MTX), ARA-C (arabinósido de citosina) e hidrocortisona, administradas mediante punción lumbar, se utilizan de forma rutinaria para prevenir recaídas en el SNC. Aunque es necesaria una quimioterapia sistémica que también ayuda a controlar las recaídas extramedulares.

3. Bases moleculares de la infiltración y recaída leucémica del SNC.

La LLA es una enfermedad que no se origina en el SNC, por lo que su presencia en el líquido cefalorraquídeo (LCR) indica un trasiego de las células blásticas desde la MO o el timo al espacio subaracnoideo. La migración y el anidamiento de los leucocitos y de otras células en los diferentes órganos del organismo es un proceso complejo en el que están implicadas diversas moléculas, teniendo un papel principal las quemoquinas. Los blastos leucémicos de LLA-B (médula ósea) y LLA-T (timo) que circulan a través de la sangre pueden usar moléculas de adhesión para llegar al SNC, cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y progresar dentro del parénquima. El estudio de las moléculas de adhesión que expresan las células leucémicas puede ayudar a conocer el proceso de infiltración y de recaída en el SNC. Además, la identificación de estas moléculas podría ayudar a descubrir dianas terapéuticas específicas.

QUEMOQUINAS

1. Definición, estructura y nomenclatura:

Las quemoquinas dirigen la migración leucocitaria e intervienen en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos, fundamentalmente en procesos inmunitarios e inflamatorios (Mantovani A., 1999; Zlotnik A, Yoshie O., 2000). Las quemoquinas constituyen un grupo numeroso de citoquinas proinflamatorias con capacidad quimioatrayente que participan en la modulación del tráfico leucocitario regulando el trasvase de leucocitos hacia órganos y tejidos. En este proceso también participan otras muchas proteínas como selectinas, integrinas, moléculas de adhesión, citoquinas, y metaloproteasas. Las quemoquinas provienen de varias fuentes celulares, y más allá de su papel en el reclutamiento y activación de los leucocitos, su estudio ha despertado gran interés, debido a la selectividad que tienen para activar y dirigir el tráfico de distintas subpoblaciones de leucocitos.

Las quemoquinas son una familia de aproximadamente 50 proteínas diferentes de pequeño tamaño, de bajo peso molecular (8-14 KDa) que se unen a 19 diferentes receptores (DeVries M.E. Y col.,2006; Zlotnik A. y col., 2006) que señalizan vía

proteína G. Los receptores para las quemoquinas pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana tipo serpina o rodopsina, la mayoría de ellos acoplados a proteína G, con tres asas intracelulares y tres extracelulares. Todos presentan un extremo N-terminal extracelular y un C-terminal intracelular. La porción intracelular carboxiterminal contiene residuos serina y treonina, los cuales son fosforilados y participan en la transducción de señales.

Las señales dependientes de la proteína G conducen a la polimerización de actina, la reconfiguración de moléculas de adhesión y otras respuestas celulares

que contribuyen a la migración celular (Nickel R. y col., 1999). Estas respuestas son dependientes de PKC y del flujo de Ca^{2+} , mientras la fosforilación de tirosinas y la interacción DAG/PLD promueve la activación del sistema NADPH-oxidasa.

Todas las quemoquinas son estructuralmente similares; tridimensionalmente presentan tres láminas plegadas beta conectadas por asas, un asa en la región NH₂ terminal y una hélice beta en el dominio C-terminal. Tienen una característica bioquímica común que es la conservación de cuatro residuos de cisteína que se unen formando dos puentes disulfuro esenciales para la activación de la molécula. Dependiendo del número y la secuencia de estas cisteínas en el dominio amino terminal, las quemoquinas se dividen en cuatro grandes subfamilias (Zlotnik, Yoshie, 2000). Los receptores de quemoquinas son agrupados en cuatro familias, CR, CCR, CXCR y CX₃CR, los cuales interaccionan con las diferentes quemoquinas C, CC, CXC y CX₃C respectivamente. En la actualidad existe una nueva nomenclatura que sirve tanto para ligandos como para sus receptores. Se escribe CC o CXC seguido por una L (de ligando) y un número que corresponde a la posición que ocupe el gen que codifica a cada proteína dentro del cromosoma y por una R (de receptor) seguido de un número.

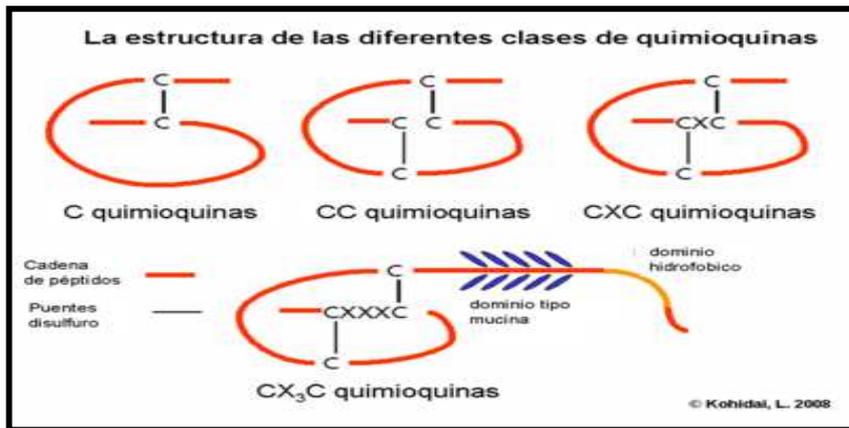


Figura 3. Estructura de las quemoquinas, obtenida de Kohidai L. 2008.

2. Quemoquinas y receptores estudiados, expresión celular:

Quemoquina/ Receptores CXC

Nombre sistemático	Ligando humano	Ligando murino	Receptor de quemoquina
CXCL1	GRO α /MGSA- α	GRO/KC	CXCR2, CXCR1
CXCL2	GRO β /MGSA- β	GRO/KC	CXCR2
CXCL3	GRO γ /MGSA- γ	GRO/KC	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4	Desconocido
CXCL5	ENA - 78	LIX	CXCR2
CXCL6	GCP-2	Ck α -3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	Desconocido	CXCR2
CXCL8	IL-8	Desconocido	CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG	MIG	CXCR3
CXCL10	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	Desconocido	CXCR3
CXCL12	SDF-1 α / β	SDF-1	CXCR4
CXCL13	BLC/BCA-1	BLC/BCA-1	CXCR5
CXCL14	BRAK/ bolequina	BRAK	Desconocido
CXCL15	Desconocido	Lungquina	Desconocido

Expresión celular:

En el neutrófilo: CXCR1, CXCR2; en el monocito: CXCR4; en el linfocito T en reposo: CXCR4; en el linfocito T activado: CXCR3; en el linfocito B: CXCR3, CXCR4; en la célula dendrítica: CXCR4; y en la célula NK: CXCR3.

Quemoquina/ Receptores CC

Nombre sistemático	Ligando humano	Ligando murino	Receptor de quemoquina
CCL1	I-309	TCA-3, P500	CCR8
CCL2	MCP-1/ MCAF	JE	CCR2
CCL3	MIP-1 α	MIP-1 α	CCR1,CCR5
CCL4	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1,CCR3,CCR5
CCL6	Desconocido	C10, MRP-1	Desconocido
CCL7	MCP-3	MARC	CCR1,CCR2,CCR3
CCL8	MCP-2	MCP-2	CCR3
CCL9/10	Desconocido	MRP-2, CCF18	Desconocido
CCL11	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
CCL12	Desconocido	MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4	Desconocido	CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1	Desconocido	CCR1
CCL15	HCC-2 /Lkn-1/MIP-1 δ	Desconocido	CCR1,CCR3
CCL16	HCC-4/ LEC	LCC-1	CCR1
CCL17	TARC	TARC	CCR4
CCL18	DC-CK1/PARC	Desconocido	Desconocido
CCL19	MIP-3 β	MIP-3 β	CCR7
CCL20	MIP-3 α	MIP-3 α	CCR6
CCL21	6Ckine/SLC	6Ckine/SLC	CCR7
CCL22	MDC	ABCD-1	CCR4
CCL23	MPIF-1	Desconocido	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxina-2	Desconocido	CCR3
CCL25	TECK	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	Desconocido	CCR3
CCL27	CTACK	CTACK	CCR10

Expresión celular: en el linfocito T activado: CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR7; en el Linfocito B: CCR4, CCR5, CCR6, CCR7; en el Monocito: CCR1, CCR2, CCR5, CCR8; en la célula dendrítica: CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6; en la célula NK: CCR2, CCR5; en el eosinófilo: CCR1, CCR3; en el basófilo: CCR2, CCR3.

Quemoquina/ Receptores C

Nombre sistemático	Ligando humano	Ligando murino	Receptor de quemoquina
XCL1	Linfotactina	Linfotactina	XCR1
XCL2	Desconocido	Desconocido	XCR1

Quemoquina/ Receptores CX3C

Nombre sistemático	Ligando humano	Ligando murino	Receptor de quemoquina
CX3CL1	Fractalquina	Neurotactina	CX3CR1

Expresión celular: en linfocito T activado, linfocitos B, monocitos y células NK.

Las quemoquinas son redundantes en su acción sobre las células, no son activas sobre una única población de leucocitos, y usualmente, una población de leucocitos posee receptores y responde a más de una quemoquina. La interacción de las quemoquinas con sus receptores se caracteriza porque la mayor parte de los receptores interactúan con múltiples ligandos y la mayor parte de los ligandos interactúan con más de un receptor. Estas interacciones se producen en todos los procesos biológicos donde interviene estas proteínas y es lo que hace tan dificultoso su estudio *in vivo*.

Funcionalmente, la mayoría de las quemoquinas comparten su participación en la respuesta inmune innata y adaptativa, no sólo controlando el tráfico de leucocitos, sino también regulando supervivencia, proliferación y activación celular (Foster R. y col., 2008; Yoshie O. y col., 2001). Además, la señalización a través de receptores de quemoquinas ha sido implicada en procesos tales como angiogénesis, desarrollo del

sistema nervioso o en hematopoyesis donde se ha descrito su importancia en diferenciación de linfocitos B, linfocitos T y células mieloides (Zou Y. y col., 1998; Forster, 1994)

Sin embargo, cada quemoquina parece tener un papel específico, determinado por el tipo celular sobre el que actúa y por el patrón de expresión de su receptor, así como por la coordinación espacio-temporal entre ligando-receptor, entre quemoquinas diferentes y entre quemoquinas y otras moléculas (Luster, 1998). No sólo en situaciones fisiológicas sino también en patológicas, las quemoquinas parecen jugar un papel fundamental, habiéndose descrito su importancia en crecimiento tumoral y metástasis (Murphy PM.y col., 2001).

También, algunos receptores de quemoquinas son utilizados como portales de entrada y factores de transmisión de patógenos intracelulares. Así, CCR5 y CXCR4, los receptores para MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES y MCP-2 y para SDF-1 respectivamente, son utilizados por el HIV como correceptores para infectar células que coexpresan CD4, y DARC y Eotaxina, son utilizados por el protozoo que produce la malaria, Plasmodium vivax para infectar eritrocitos (Alkhatib, 1996).

Las quemoquinas también han sido clasificadas en base a su función y patrón de expresión como inflamatorias o inducidas y homeostáticas o constitutivas. Las primeras son reguladas por estímulos proinflamatorios tales como LPS o citoquinas inflamatorias como IL-1, TNF- α o IFN- γ , y su función es el reclutamiento y activación de diferentes poblaciones leucocitarias para llevar a cabo la respuesta inmune. Las segundas son expresadas en ciertos órganos y tejidos de forma constitutiva y en ausencia de estímulo inflamatorio, participando en diferenciación celular y en el mantenimiento de la homeostasis de los órganos donde se expresan.

3. Quemoquinas y SNC.

El SNC cuenta con una barrera, la BHE, estructura histológica y funcional que protege y limita la entrada de células y patógenos al cerebro. Durante procesos infecciosos e inflamatorios los linfocitos acceden y se acumulan en el SNC (Asensio VC. y col., 1999; Bajetto A. y col., 2002). Una de las vías de entrada de los leucocitos al SNC es a través de los plexos coroideos, por los que entran en el líquido

cefalorraquídeo (LCR) y circulan por el espacio subaracnoideo. También pueden invadir el parénquima cerebral vía capilares cerebrales o directamente infiltrar las meninges por lesiones cerebrales. A continuación se muestra la estructura del cerebro y rutas de entrada de los leucocitos al SNC.

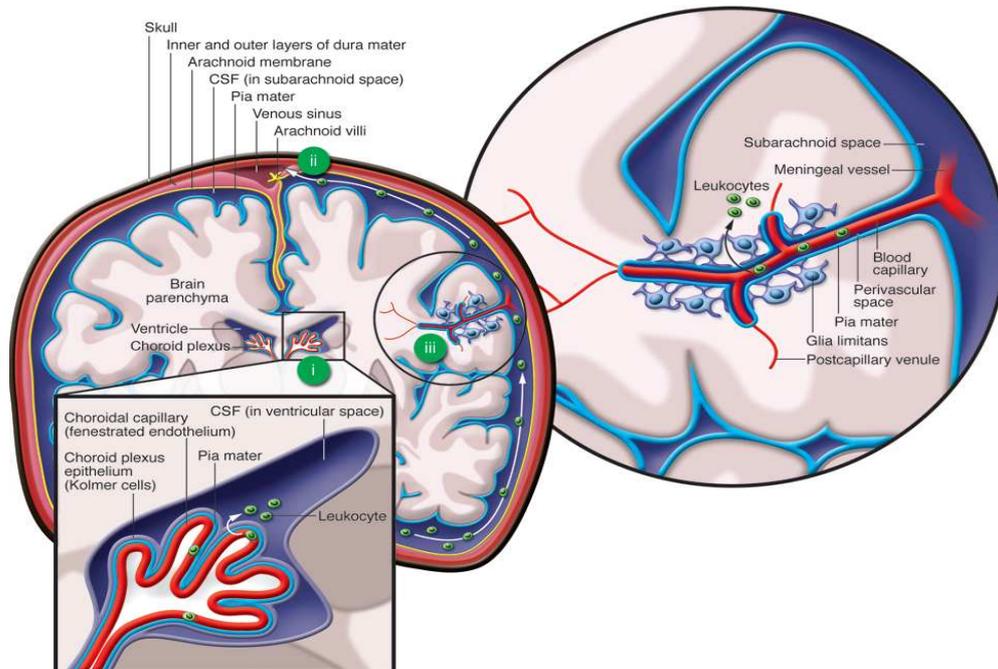


Figura 4. Estructura del cerebro y rutas de entrada de los leucocitos (Figura obtenida de Wilson y col., 2010).

La habilidad de los linfocitos para acceder a las meninges ha sido estudiada principalmente en los contextos de inflamación e infección (Cartier L. y col., 2004; Charo IF. Y col., 2006; Kivisakk P. y col., 2004). La inflamación de las meninges está asociada con virus (virus herpes simple, el virus de la varicela zoster y el HIV) bacterias (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., y *Mycobacterium tuberculosis*), hongos (*Cryptococcus* spp.) parásitos (*apicomplexa*, *trypanosomes* y *amoebae*) y con causas no infecciosas como cáncer o toxicidad por fármacos (Giunti D. y col., 2003; Glass WG. Y col., 2005).

El paso a través de la barrera hematoencefálica exige a las células que lo hacen, la presencia en su membrana de una serie de moléculas de adhesión específicas,

capaces de responder a sus respectivos ligandos presentes en las áreas de entrada (Bacon KB. Y col., 2000; Christenen JE. Y col., 2004; Hesselgesser J. y col., 1999; Ragozzino D. y col., 2002). Para alcanzar y seguidamente circular por el espacio subaracnoideo necesitan diferentes moléculas de adhesión, selectinas, integrinas, quemoquinas y sus receptores, CCR6/CCL20 y CCR7/CCL19 (Kisiskk P. y col., 2003). También pueden invadir el parénquima cerebral vía capilares con la ayuda de otras quemoquinas como CXCR3/CXCL10 y CXCR4/CXCL12 (Zhang B. y col., 2008).

Las quemoquinas CXCL9, CXCL10, CXCL11 y su receptor CXCR3, están asociadas con el reclutamiento de linfocitos T reguladores en el espacio perivascular del cerebro en casos de esclerosis múltiple (Kivisakk P. y col., 2002; Balashov KE. Y col., 1999; Sorensen TL. Y col., 1999) y CXCL12, ligando de CXCR4, está expresado en las células endoteliales en el SNC (McCandless EE. y col., 2006). Estos estudios sugieren que múltiples quemoquinas regulan el acceso del espacio perivascular al parénquima cerebral (Biber K. y col., 2000).

En la siguiente figura se observa cómo en el tráfico de las células inmunes al SNC están implicadas diferentes quemoquinas y sus receptores.

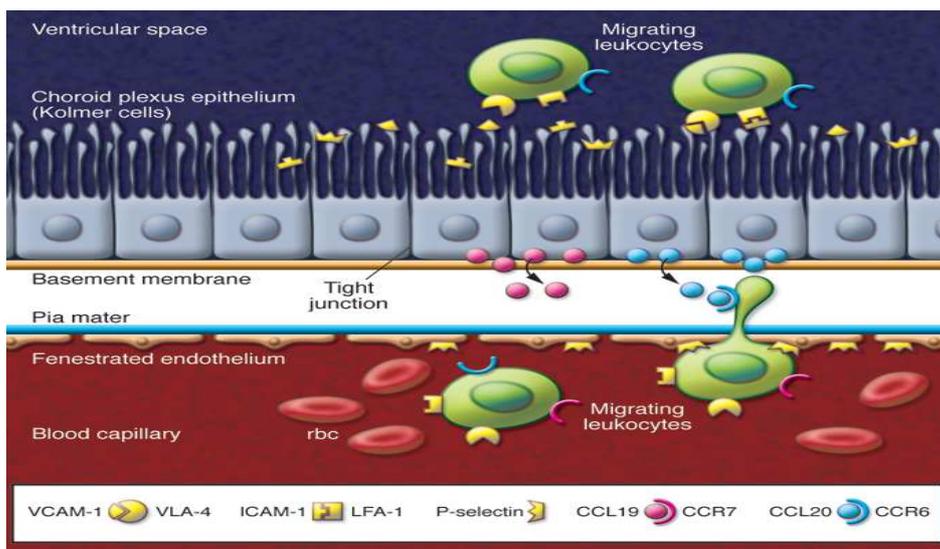


Figura 5 Acceso a las meninges. Figura obtenida de Wilson y col., 2010.

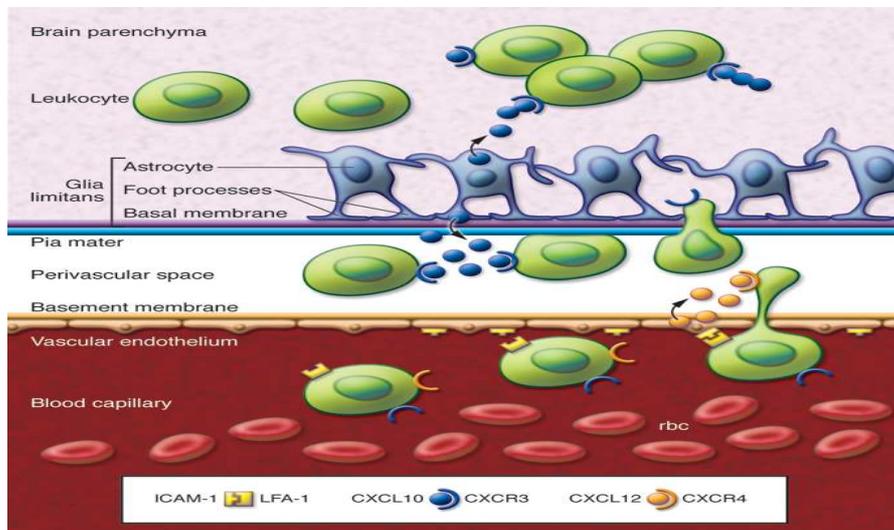


Figura 6. Acceso al parénquima cerebral. Figura obtenida de Wilson y col., 2010.

Recientemente, se ha descrito la producción de quemoquinas linfoides, CCL19, CCL21 y CXCL13 en el SNC, en casos de homeostasis y en patologías que afecten al SNC (Lalor SJ. y col., 2010; Cardona M. y col., 2008; Le Y. y col., 2004). CCL19 y CCL20 son producidos por células del estroma en las zonas de células T de los nódulos linfáticos (Cyster, 1999) y ambas quemoquinas se unen a CCR7, expresado en la superficie de linfocitos T naive y células dendríticas maduras. CXCL13 es producido por las células dendríticas foliculares de los folículos de células B (Müller y Lipp, 2003) y se une al receptor CXCR5. Estas quemoquinas actúan manteniendo la homeostasis del SNC. Por ejemplo, hay una expresión homeostática de CCL19 y CCL21 en el endotelio cerebrovascular y en los plexos coroideos, que tiene un importante papel en la inmunovigilancia del espacio subaracnoideo y perivascular en individuos sanos. La mayoría de las células del LCR son linfocitos T que expresan CCR7 y participan en la eliminación de infecciones locales como neuroborreliosis o infecciones por *Toxoplasma gondii*. Por el contrario, la producción aberrante de CCL19, CCL21 y CXCL13 se ha asociado a inflamación autoinmune crónica (Bagaeva y col., 2006). Además la producción aberrante de CCL19, CCL21 y CXCL13, permite que células leucémicas B y T infiltren el SNC, relacionando la producción local de estas quemoquinas con la localización de los tumores hematopoyéticos en el SNC.

La quemoquina involucrada depende del origen celular de la neoplasia. En este sentido, CCL19 fue recientemente implicado en infiltración del SNC por células de LLA-T (Buonamici y col., 2009), mientras CXCL13 ha sido asociado con el desarrollo de linfoma de células B difuso en el SNC (Smith y col., 2003; Tun y col., 2008).

CXCR3-CXCL10 es un eje ya vinculado a otra patología del SNC: encefalitis (Muller y col., 2007). El eje CXCR3/CXCL10 ha sido ya implicado en el reclutamiento de los linfocitos T en encefalitis y la producción de CXCL10 en esta patología, se adjudica a los astrocitos de la glía y a las neuronas (Vinet J. y col., 2010; Haas y col., 2007; Ambrosini y col., 2004; Rappert y col., 2004; Klein y col., 2005).

4. Quemoquinas y cáncer

La interacción de las quemoquinas con sus receptores participa también en procesos como desarrollo de órganos, angiogénesis, ubicación celular en diferentes localizaciones anatómicas (Cyster JG., 1999), anidamiento leucocitarios, tumorigénesis y metástasis de tumores (Homey B. y col., 2002).

Las células tumorales expresan receptores de quemoquinas que pueden utilizar para facilitar la supervivencia, crecimiento y movimiento de estas células tumorales. Pueden expresar patrones específicos de receptores de quemoquinas que responden a gradientes quemoquímicos y contribuyan a la proliferación de la metástasis (Kulbe H. y col., 2004).

4.1 Perfiles de quemoquinas en tumores:

CXCR4 aparece expresado en numerosos tipos de cáncer como mama, próstata, páncreas, ovario, neuroblastoma y glioblastoma (Koshiba y col., 2000; Rempel y col., 2000; Geminder y col., 2001; Muller y col., 2001; Scotton y col., 2001, Schrader y col., 2002; Taichman y col., 2002; Burger y col., 2003; Hwang y col., 2003; Zeelenberg y col., 2003). En otras células cancerosas estudiadas, CXCR4 puede estar coexpresado con otros receptores de quemoquinas CC o CXC, o menos frecuente es la expresión de otros receptores sin la expresión de CXCR4.

Células cancerosas humanas de mama expresan CXCR4 y CCR7 (Muller y col., 2001). CCR7 es encontrado también en células cancerosas gástricas y esofágicas

(Mashino y col., 2002). Células de melanoma expresan CCR7 y CCR10, aunque otros autores han encontrado que coexpresan CXCR4 y CXCR3 (Robledo y col., 2001). Células de leucemia y linfoma expresan un amplio repertorio de receptores de quemoquinas, probablemente reflejando su origen hematopoyético. Así, por ejemplo, células de leucemia T/ linfoma en adultos expresan CCR4 (Ishida y col., 2003), linfoma cutáneo de células T expresa CCR3 (Kleinhans y col., 2003) y linfomas de células B expresan CXCR3 y CXCR5 (Jones y col., 2000, Burger JA. Y col., 1999; Trentin L. y col., 1999).

CXCR4 no es un marcador específico de tumor y no todos los cánceres expresan este receptor. Además este receptor y su ligando, CXCL12, son ampliamente expresados en tejido normal y juegan un importante papel en el desarrollo fetal, movilización de las células madre hematopoyéticas y en el movimiento de linfocitos naive (Rossi y Zlotnik, 2000). CXCR4 es el único receptor de CXCL12 y no puede unirse a otro ligando.

4.2 Expresión de quemoquinas en el microambiente del tumor y gradiente quemotáctico para la proliferación del tumor

Los tumores sólidos contienen, además de células tumorales, células del estroma como fibroblastos y células endoteliales. Se encuentran infiltrados por células inflamatorias como neutrófilos, macrófagos y linfocitos, que contribuyen a la producción local de quemoquinas dentro del tumor y a su proliferación (Kellerman SA. y col., 1999; Zlotnik A. 2004).

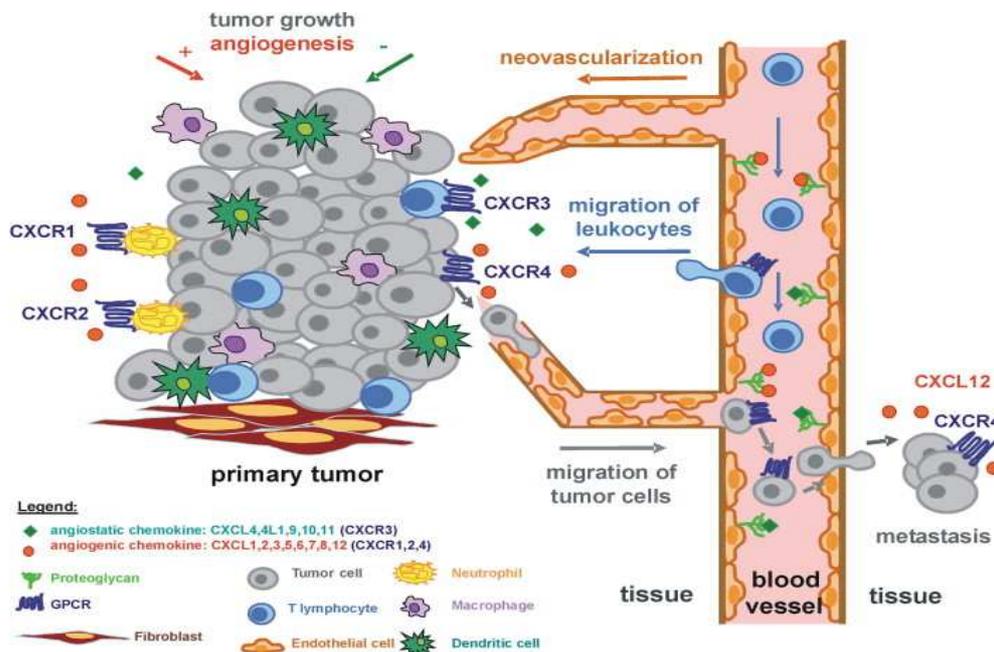


Figura 7 Expresión de quemoquinas en el microambiente del tumor y gradiente quemotáctico para la proliferación del tumor. Figura obtenida de Vandercappellen J. y col., 2008

Hay casos de tumores en los que la expresión de receptores de quemoquinas se ha relacionado con infiltrados de leucocitos, como por ejemplo, infiltrados de macrófagos que producen factores de crecimiento, factores angiogénicos, y diferentes quemoquinas inflamatorias. Existen casos de enfermedad de Hodgkin que expresan CCL17, CCL11, CCL22 y atraen linfocitos Th1 y Th2 (Skinider y Mk, 2002). En el cáncer de ovario son característicos los infiltrados de macrófagos y linfocitos T CD8+. El entorno del tumor contiene una extensa y variada mezcla de quemoquinas, tanto CC como CXC que controlan la infiltración de los leucocitos al tumor. Estos leucocitos migran por gradientes quemotácticos que también pueden usar las células del tumor para proliferar.

Para que el gradiente quemotáctico afecte en las células cancerosas que expresan receptores de quemoquinas, es necesario que los respectivos ligandos sean fuertemente expresados en los sitios de proliferación del tumor o metástasis. Células de melanoma expresan CCR7 y CCR10 y sus ligandos están altamente expresados en

piel y nódulos linfáticos, lugares de metástasis de este tumor (Muller y col., 2001). CCR7 y CXCR4 se encuentran en células de cáncer de mama y sus ligandos CCL21 y CXCL12 se han detectado expresados en grandes cantidades en los órganos de las metástasis. Además la migración de estas células hacia los órganos diana de las metástasis puede ser neutralizada por anticuerpos anti-CXCR4 (Muller y col., 2001). Las quemoquinas, en particular CXCR4/CXCL12, juegan un papel en la adhesión, invasión, supervivencia, proliferación y angiogénesis de las células tumorales.

5. Quemoquinas y metástasis

La metástasis es el factor que más limita la supervivencia en la mayoría de los pacientes con cáncer. El proceso de la metástasis es complejo y tiene múltiples pasos o estadios, en los cuales la interacción entre receptores de quemoquinas expresados por las células tumorales y sus respectivos ligandos, puede ser importante (Entschladen F. y col., 2005; Murphy PM. Y col., 2001). Por ejemplo, antagonistas del receptor CXCR4 han sido identificados como agentes antimetástasicos en el cáncer de mama (Tamamura H. y col., 2003).

Las células tumorales expresan receptores de quemoquinas (CCR y CXCR), mientras sus ligandos se producen en los órganos diana de las metástasis. La interacción de receptores y ligandos representa una de las bases moleculares que explica la localización anatómica preferente de las metástasis tumorales. Las quemoquinas se han implicado en las metástasis de tumores en órganos específicos. Las células tumorales que expresan dichos receptores se pueden aprovechar de la función natural de los ejes receptores de quemoquinas-ligandos (concepto descrito por Zlotnik y col., 2011). Según Zlotnik, aquellas células tumorales que expresen naturalmente estos receptores, tendrán preferencia por asentarse en los órganos apuntados. En condiciones normales, algunas quemoquinas dirigen las células a localizaciones específicas donde sus ligandos son expresados, como es el caso de CCR10/CCL27 en la piel, CCR9/CCL25 en el intestino delgado, CCR7/CCL19, CCL21 y CXCR5/CXCL13 en tejido linfoide secundario, y CXCR4/CXCL12 en la médula ósea.

A continuación se comentan estudios experimentales que indican que la expresión de un receptor de quemoquina puede definir la localización específica de la metástasis:

- Por ejemplo, la expresión de CCR9 está asociada con metástasis de melanoma intestinal (Letsch A. y col., 2004). Estas células respondieron al ligando de CCR9 (CCL25) que estaba selectivamente expresado en intestino delgado y en el timo, sugiriendo una asociación entre la expresión de CCR9 y la metástasis en el órgano donde se expresa su ligando.
- La expresión de CCR7 está asociada con metástasis en nódulos linfáticos en carcinoma gástrico (Mashino K. y col., 2002). Un estudio reciente demostró que CCR7 estaba implicado en la infiltración del SNC en LLA-T, y al silenciar este receptor o su ligando CCL19 en un modelo animal de LLA-T, se conseguía inhibir específicamente la infiltración del SNC.
- Otro ejemplo es la quemoquina CCR6, cuya expresión se ha asociado a la metástasis en hígado en el cáncer colorrectal. El ligando de CCR6, CCL20, se ha encontrado muy expresado en el órgano donde tiene lugar la metástasis (Rubie C. y col., 2010).
- La expresión de CXCR3 ha sido detectada en epitelio canceroso de pacientes en estadios tempranos de cáncer de mama, y se asoció este receptor de quemoquina con la metástasis en pulmón en un modelo murino de cáncer de mama. El silenciamiento de CXCR3 en líneas celulares de cáncer de mama inhibía específicamente la metástasis en pulmón en un modelo animal (Ma X. y col., 2009).
- En general, los ejes CXCL12/CXCR4 y CCL21/CCR7 han sido relacionados con la invasión y la metástasis en varios tipos de cáncer (Hasegawa H. y col., 2000), siendo CXCR4 el receptor más frecuentemente sobreexpresado en células tumorales.

6. Perspectivas futuras

Las recaídas en la LLA continúan siendo el reto más importante para conseguir la curación total. Los motivos por los cuales se localiza la enfermedad en el SNC no están del todo claros. La LLA es una enfermedad que no se origina en el SNC, la presencia de estos blastos leucémicos en el LCR puede entenderse como un proceso metastático, debido a la migración de estas células blásticas, desde la MO o el timo (donde se originan), al espacio subaracnoideo y posteriormente al parénquima cerebral. Estas células leucémicas pueden utilizar la maquinaria molecular (diferentes quemoquinas/receptores) empleada por los leucocitos para asentarse en este órgano (SNC) considerado santuario. Estos blastos capaces de recluirse en este santuario, se encuentran expuestos a un ambiente que les protege frente al tratamiento antileucémico. Es muy importante, identificar qué moléculas están implicadas en esta protección, y poder convertir a estas moléculas en dianas terapéuticas específicas para el tratamiento de leucemias con alta capacidad de recaer. Descubrir los factores celulares y moleculares que confieran resistencia al tratamiento, permitirá administrar nuevas terapias a este grupo de pacientes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Caracterizar el perfil de expresión de receptores de quemoquinas en los blastos de la médula ósea de LLA infantil y estudiar si se asocia a alguna característica clínica o biológica.
2. Caracterizar el perfil de expresión de quemoquinas en LCR y estudiar si se asocia a alguna característica clínica o biológica.
3. Analizar si existe un papel de receptores o de quemoquinas en la infiltración del sistema nervioso central, o en la recaída leucémica.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Condiciones del estudio

Se ha desarrollado un estudio prospectivo y multicéntrico aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica. En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado de padres y tutores.

2. Pacientes

Durante el periodo de tres años desde Enero del 2007 hasta Diciembre del 2009, se recibieron muestras de 122 pacientes diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda en 18 hospitales españoles. Muestras correspondientes a 28 pacientes no fueron incluidas en el estudio final por las siguientes razones: por falta de datos clínicos del paciente, por falta de muestra de MO, o por escasa muestra de MO para el estudio de receptores de quemoquinas por CMF. Cada centro fue responsable de recabar la información clínica de cada paciente.

3. Muestras

Las muestras se reclutaron en cada hospital y se enviaron al Laboratorio de Onco-Hematología del Hospital Universitario Niño Jesús de Madrid, España. Se estudiaron 94 muestras de medula ósea en el momento del diagnóstico y/o recaída y 91 muestras de LCR al diagnóstico y/o recaída. El inmunofenotipo del diagnóstico se realizó en cada centro, mientras que el estudio de la muestra de MO y de LCR se realizó en nuestro hospital.

4. Estudio de la MO para la detección del perfil de quemoquinas

4.1 Preparación de la muestra:

En todos los pacientes se realizó al diagnóstico, un aspirado de médula ósea, que fue enviado al Laboratorio de Oncología del Hospital del Niño Jesús. El aspirado medular se recogió en un tubo con EDTA, y se utilizó para estudiar el perfil de

receptores de quemoquinas. De la médula ósea se obtuvieron las células mononucleares mediante la centrifugación sobre gradiente de Ficoll (Ficoll-Plaque PLUS GE Healthcare Bioscience AB Uppsala, Suecia).

4.2 Cuantificación de receptores de quemoquinas en MO

Se determinaron los niveles de expresión de 10 CCR y 6 CXCR al diagnóstico en MO mediante citometría de flujo multiparamétrica. Alícuotas de dicha muestra se incubaron con combinaciones de 6 anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes receptores de quemoquinas.

Uno de estos 6 anticuerpos fue siempre anti-CD45, para poder estudiar la expresión de las demás moléculas sobre la población blástica. Un tubo se marcó con los isotipos adecuados, para fijar el umbral basal de expresión de los diferentes anticuerpos. Tras una incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad, se añadió a cada muestra una solución de lisis de eritrocitos (Quicklisis, Cytognos, Salamanca, España). La adquisición y el análisis de los eventos de las muestras se realizaron con un citómetro de flujo BD FACS Canto II (Becton Dickinson), y los datos se analizaron con el software BD FACSDiva.

A continuación se expone una tabla con los 6 fluorocromos utilizados en el marcaje de las muestras con el panel de los 5 tubos utilizados para el análisis de cada muestra de MO.

FLUOROCROMOS	FITC	PE	PerCPCy5	PECy7	APC	APCCy7
Tubo 1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	CD 45
Tubo 2	CCR8	CCR3		CCR4	CCR1	CD 45
Tubo 3	CXCR3	CCR6	CXCR2	CCR5	CCR2	CD 45
Tubo 4		CXCR6	CXCR4	CCR7	CCR9	CD 45
Tubo 5	CXCR1	CXCR5				CD 45

Tabla 3. Panel de anticuerpos utilizados para el estudio de las muestras de MO

Los fluorocromos utilizados fueron los siguientes: FITC, PE, APC, PERCP-CY5.5, PECy7, APC-Cy7. Todos los anticuerpos se adquirieron de BD Biosciences (Becton Dickinson, Madrid, España).

4.3 Análisis de la MO por Citometría de flujo

Los criterios de análisis mediante CMF de las MO fueron los siguientes:

Se realizaron diferentes clusters según el receptor CCR o CXCR utilizado.

El número de células leucémicas con expresión de receptor de quemoquina se expresó en términos relativos, intensidad de fluorescencia media de cada receptor (ratio con respecto a su isotipo). La intensidad de fluorescencia media (MFI), se utilizó como estimación relativa de la cantidad de moléculas del receptor por células.

En la figura siguiente se muestra la estrategia para cuantificar los niveles de expresión de los receptores (en este caso, CCR6). La población leucémica se identificó en un gráfico CD45 versus complejidad celular y posteriormente se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada isotipo y para cada receptor.

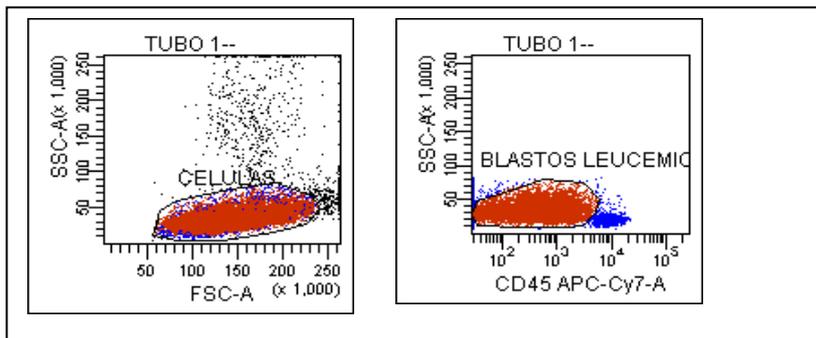


Figura 8. Mediante el histograma SSC/FSC seleccionamos la zona donde se distribuyen las células leucémicas y posteriormente se identificó en un gráfico CD45 versus complejidad celular la población blástica para poder estudiar sobre ella, la expresión de los receptores de quemoquinas.

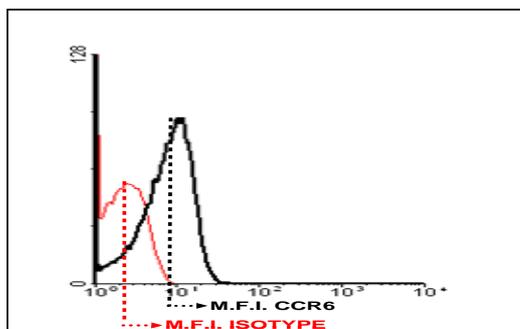


Figura 9. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó como el ratio entre el valor de MFI de cada receptor y el valor de MFI del isotipo.

5. Estudio del LCR para la cuantificación de los niveles de quemoquinas

5.1 Procesamiento de los LCRs para su estudio

La punción lumbar se realizó en cada centro y las muestras de LCR (2-3 ml) se enviaron al Laboratorio de Oncología del HNJS para el estudio de ligandos de quemoquinas. Las muestras de LCR se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 min. Se separó el sobrenadante y se congeló en arcón a -80°C hasta su uso. La cuantificación de las quemoquinas (ligandos) en los sobrenadantes de las 91 muestras de LCR se realizó mediante las técnicas de Bioplex o Elisas convencionales, en función de la accesibilidad a los reactivos comerciales.

En la siguiente tabla se recogen las quemoquinas detectadas en este estudio:

Receptor	Ligando	Receptor	Ligando
CXCR1	CXCL8	CCR1	CCL5
CXCR2	CXCL1	CCR2	CCL7
CXCR3	CXCL9, CXCL10	CCR3	CCL24
CXCR4	SDF-1 α	CCR4	CCL17, CCL22
CXCR5	CXCL13	CCR5	CCL3, CCL4
CXCR6	CXCL16	CCR6	CCL20
		CCR7	MIP-3 β
		CCR8	CCL1
		CCR9	CCL25
		CCR10	CCL27

Tabla 4. Quemoquinas y receptores estudiados.

5.2 Cuantificación de quemoquinas en el LCR: Bioplex y ELISA

Cuantificación de quemoquinas en LCR por la técnica BIOPLEX:

Se realizó sobre las muestras de LCR, bien correspondiente a muestras de diagnóstico o de recaída. La técnica utilizada fue el sistema Bio-Plex de arrays en suspensión xMAP (Luminex) que permitió la detección y cuantificación simultánea de numerosas proteínas diferentes dentro de una misma muestra de LCR. El sistema,

basado en tecnología de microesferas, posee una sensibilidad mayor que las técnicas convencionales de ELISA. Esta tecnología se basa en una familia de microesferas fluorescentes estudiada a través de un analizador específico asociado a un procesador de alta velocidad de la señal numérica para manejar eficientemente la fluorescencia emitida en cada caso.

Los Kits utilizados, Bio-Plex Cytokine Assay System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) fueron:

- Bio-Plex Human Cytokine Grp I X-Plex Assay (CXCL8, CCL24, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10).
- Bio-Plex Human Cytokine Grp II X-Plex Assay (SDF-1 α , CCL7, CCL27, CXCL1, CXCL9)

Realizamos el experimento según indicaciones del fabricante y de forma similar en todas las cuantificaciones de citoquinas. Se prepararon todos los reactivos, muestras y estándares, según indicaciones del protocolo. Se adicionaron 50 μ l de estándar de concentración conocida de cada quemoquina o de sobrenadante de las muestras de LCR, en placas de 96 pocillos, con 50ul de anticuerpos conjugados con múltiples microesferas fluorescentes de captura específicos para cada quemoquina. Se incubó 30 minutos a 37°C, y se lavó 3 veces para retirar las moléculas de quemoquinas no capturadas. Luego se añadieron 25ul de anticuerpos anti-quemoquina conjugados a biotina. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente con una previa agitación de la placa durante 30 segundos, se hicieron 3 lavados consecutivos, y se incubaron con 50 μ l de estreptavidina-PE durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez retirado el exceso de enzima, el contenido de cada pocillo fue resuspendido en 125 μ l de "assay Buffer" (Bio Rad) y se procedió inmediatamente a la lectura en el equipo Luminex200. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado para asegurar el coeficiente de variación entre las muestras. Las concentraciones de las quemoquinas fueron calculadas en referencia a la curva estándar de cada quemoquina, usando las concentraciones conocidas de los estándares (0.2, 0.78, 3.13, 12.5, 50, 200, 800 y 3200 pg/ml).

El software de operación y análisis fue BioPlex Manager5, para el cálculo de la concentración, desviaciones estándar, coeficientes de variación mediante el uso de curvas estándar.

Cuantificación de quemoquinas en el LCR por la técnica de ELISA:

La cuantificación de algunas citoquinas se realizó mediante un kit específico de inmuno-ensayo enzimático. Para determinar CCL17, CCL25, CCL1, CCL22, CCL20 se han utilizado los siguientes Kits de Elisa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) RayBio® Human MDC ELISA Kit (para CCL22); RayBio® Human I-309 ELISA Kit (para CCL1); RayBio® Human TECK ELISA Kit (para CCL25); RayBio® Human TARC ELISA Kit (para CCL17); RayBio® Human MIP-3 alpha ELISA Kit (para CCL20); RayBio® Human MIP-3 beta ELISA Kit (para CCL19).

Realizamos el experimento según indicaciones del fabricante y de forma similar en todas las cuantificaciones de citoquinas. Se prepararon todos los reactivos, muestras y estándares según indicaciones del protocolo. Se adicionaron 100 µl de estándar de concentración conocida de cada quemoquina (0pg/ml- 1000pg/ml) o de sobrenadante de las muestras de LCR en pocillos con anticuerpos de captura específicos frente a cada ligando. Se incubó 2.5 horas a 37° C y se lavó 4 veces para retirar las moléculas de quemoquinas no capturadas. Luego se añadieron 100ul de anticuerpos anti-quemoquina conjugados a biotina y tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente y de 4 lavados consecutivos, se incubaron con 100ul de la enzima peroxidada conjugada a estreptavidina durante 45 minutos a temperatura ambiente. Una vez retirado el exceso de enzima se incubó con 100ul del sustrato con el cromógeno durante 30 minutos, momento en el que se añadieron 50µl de la solución de parada (ácido sulfúrico 2M), y se procedió inmediatamente a la lectura de su absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA (Personal LA, Biochem Immunosystems, BO, Italy).

Para cada ensayo de ELISA se realizó una curva patrón haciendo diluciones seriadas a partir de la solución stock del estándar de concentración conocida de cada quemoquina (0pg/ml- 1000pg/ml).

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, el valor final fue la media de los dos valores que se detectaron. Se utilizó la curva patrón obtenida con los estándares suministrados por el fabricante. Con la recta de regresión obtenida, según la media de absorbancia de cada una de las muestras se calculó el valor de cada ligando en pg/ml.

6. Ensayos in Vitro de quimotaxis y viabilidad

6.1 Muestras humanas y líneas celulares

Para los ensayos in Vitro se han utilizado muestras humanas y líneas celulares.

Muestras humanas:

Se utilizaron muestras primarias de LLA infantil, congeladas en viabilidad y caracterizadas por CMF en cuanto al perfil de expresión de receptores de quemoquinas.

En el momento del diagnóstico y de la recaída, en la muestra de MO, se procedió a la separación de las células mononucleadas (Ficoll-Paque Plus GE Healthcare Bioscience AB Uppsala Suecia). Una vez separadas, las células mononucleadas se resuspendieron en 1 ml de PBS (phosphate-buffered saline) (Lonza B-4800 Verniers, Belgium) y se cuantificó su número. Por cada 10 millones de células, se preparó una mezcla de FBS (suero bovino fetal) y DMSO (dimetilsulfóxido) 9:1 (900 μ l FBS + 100 μ l DMSO), se resuspendieron las alícuotas de las células, se guardaron en un arcón a -80°C con metanol durante 48 horas y finalmente se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Líneas celulares:

Se utilizaron las líneas celulares NALM-6 (ACC 128) correspondiente a una Leucemia B precursora humana, y KASUMI-1 (ACC 220) correspondiente a una Leucemia Mieloide aguda humana. Ambas líneas, fueron obtenidas de DSMZ (Braunschweig - Alemania). Las células leucémicas NALM-6 fueron mantenidas a una densidad de $1.0\text{-}2.0 \times 10^6$ cel/ml en 90% RPMI 1640 (Lonza B-4800 Verniers, Bélgica) suplementado con antibiótico, Pen Strep (GIBCO 1514, CA, USA) L-

glutamina (2 mM, GIBCO, USA) y FBS (Lonza) al 10% a 37 °C y al 5 % de CO₂. Las células leucémicas KASUMI-1 fueron mantenidas a una densidad de 0.5 x10⁶ cel/ml en 80%RPMI 1640 más 20% FBS. Mediante CMF se determinó la MFI de CXCR3 en estas dos líneas celulares, y arrojaron el siguiente resultado:

NALM-6 ratio de 5, KASUMI-1 ratio de 1.9.

6.2 Ensayos de quimotaxis:

Los experimentos que se describen a continuación se realizarán primero con las líneas celulares, y posteriormente se confirmaron con las muestras primarias de pacientes. Las células humanas (líneas celulares, y muestras primarias) se suspendieron en medio RPMI con 10% de suero fetal (FBS), L-glutamina y antibióticos, y se depositaron en el compartimento superior de placas de 6.5-mm de diámetro con "transwells" de un poro de 5 µm (HTS Transwell®- 24 Well Plate, Corning, MA). El volumen fue de 100 µl, con 5 x 10⁵ células totales. Estos filtros se transfirieron a pocillos que en el compartimento inferior contenían RPMI con 10% de FBS, y se añadió recombinante humano CXCL10/IP-10 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a dos concentraciones, 100ng/ml y 10ng/ml. La dosis de trabajo elegida para los siguientes ensayos fue de CXCL10 a 100ng/ml. En el compartimento inferior se trabajó con cinco condiciones en todos los ensayos. En la primera condición se añadió únicamente 600 µl de RPMI 1640 con 10% de suero fetal (FBS), en la segunda condición recombinante humano CXCL10/IP-10 (R&D Systems) a 100ng/ml, en la tercera condición anticuerpo anti-CXCL10 a 200ng/ml (R&D Systems), en la cuarta, recombinante humano CXCL10 + anti-CXCL10, y una quinta condición con un anticuerpo monoclonal CXCR3 anti-humano a 5 µg/ml (R&D Systems).

Cada condición se realizó por triplicado. Se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C en 5% de CO₂. Al final del periodo de incubación se procedió al conteo por CMF, de las células leucémicas que habían atravesado la membrana y habían pasado al compartimento inferior.

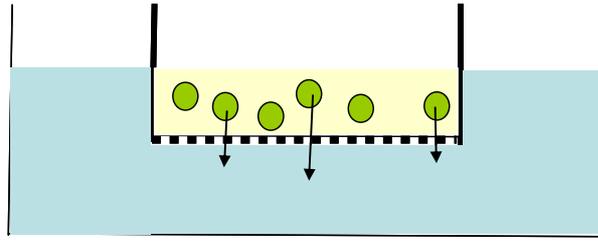


Figura 10. Células leucémicas de líneas tumorales y muestras primarias con expresión en superficie de un receptor de quemoquina. Estas células colocadas en el compartimento superior pueden migrar con un gradiente quemotáctico hacia el compartimento inferior, donde se encuentra su quemoquina correspondiente.

6.3 Ensayos de viabilidad con fármacos antileucémicos

Fueron realizados con fármacos antileucémicos utilizados en la TTI, METOTREXATO (50mg/2ml, Mylan Pharmaceuticals, Barcelona, España), CITARABINA (100mg/5ml, Pfizer, Madrid) HIDROCORTISONA (100mg/1 ml, Actocortina, Nycomed Pharma, Madrid, España). De cada uno de los tres fármacos, se utilizó una solución de stock a 10 mM.

Las células leucémicas humanas (línea celular NALM-6 y KASUMI-1) se resuspendieron en medio RPMI sin suero fetal (FBS) y se depositaron en placas de 24 pocillos (24 Well Plate, BD). El volumen fue de 500µl, con 5×10^6 células totales. Células NALM-6 y KASUMI-1 fueron tratadas con MTX, ARA-C e HIDROCORTISONA en rangos de dosis desde 1µM hasta 1mM (0µM, 1µM, 10µM, 100 µM, 1mM).

La viabilidad fue determinada a las 24 h y 48 horas de tratamiento. Los datos fueron expresados en porcentaje de células viables (7-AAD) analizados por CMF.

La dosis de tratamiento elegida para los siguientes ensayos de viabilidad fue de 1 µM a las 48 horas y se trabajó con cinco condiciones en todos los ensayos. En la primera condición se añadió únicamente células tratadas a 1µM y en las demás condiciones, se añadió, además de las células tratadas, recombinante humano CXCL10/IP-10 en la segunda condición, en la tercera condición anti-CXCL10, en la cuarta, recombinante humano CXCL10 + anti-CXCL10, y una quinta condición con un anticuerpo anti-CXCR3. Cada condición se realizó por triplicado. Se incubaron

las placas durante 48 horas a 37°C en 5% de CO₂. Al final del periodo de incubación se procedió al análisis de la viabilidad de las células por citometría de flujo.

Análisis de la viabilidad de la muestra por CMF:

Los criterios de análisis mediante CMF de las células fueron los siguientes:

Se analizó la viabilidad de las células, para lo que se utilizó marcaje con 7-AAD (7-amino actinomicina D, BD). Se trata de un agente intercalante que penetra en la membrana de las células dañadas, por lo que su positividad implica que las células no son viables.

7. Estudio del gen CXCL10 en MO por Q-PCR

Para el estudio del gen CXCL10 se seleccionaron muestras de MO en el momento del diagnóstico y de la recaída, y muestras de líneas celulares (NALM-6 y KASUMI-1) guardadas en Trizol® (Invitrogen, NY, USA). Se eligieron 21 muestras de MO criopreservadas.

7.1 Selección de pacientes y líneas:

Se eligieron 21 pacientes de los que se contaba con MO criopreservada al diagnóstico o en el momento de la recaída. De los 21 pacientes, 17 corresponden al momento del diagnóstico y 4 pacientes, al momento de la recaída. En 5 pacientes, la amplificación del gen control se produjo en un ciclo superior al 25, siendo la calidad del RNA inadecuada para la cuantificación del gen problema. Se seleccionaron pacientes cuyos blastos expresaban CXCR3 a diferentes niveles.

7.2 Selección de gen problema:

Se cuantificó la expresión de CXCL10, con número de referencia de TaqMan® Gene Expression Assays Hs 00171042_m1 (Applied Biosystems, CA, USA)) en los blastos de la MO y en líneas celulares (NALM-6 y KASUMI-1).

7.3 Cuantificación de la expresión de CXCL10 mediante QPCR

Ya seleccionadas las muestras de MO, se procedió a la descongelación, mezclando las células con RPMI 1640 (Lonza) y FBS 1:1, se centrifugó 10 minutos a 16000 rpm, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 ml de Trizol.

Extracción de ARN

Se procedió a la extracción de ARN mediante el método de TRIZOL (fenol e isotiocianato de guanidina) y se procedió a la extracción según las instrucciones del fabricante. La concentración y ratio de ARN se determinó mediante un espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, DE, USA). Las concentraciones variaron entre 3-20 ng/ μ l y el ratio obtenido A260/280 osciló entre 1.5-2.

RT-PCR y Q-PCR

Posteriormente se procedió a la RT-PCR para la obtención de ADNc según instrucciones del fabricante. Obtenido el ADNc se realizó la QPCR. Se seleccionó tecnología Taqman. El análisis de datos se realizó mediante cuantificación relativa, comparando el gen problema con respecto a un gen control. La Q-PCR se realizó utilizando cebadores ("primers") y sonda descritas en TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) con número de referencia correspondiente al gen estudiado. Todas las reacciones de PCR se realizaron por duplicado utilizando Taqman Gene Expresión Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación, detección y análisis se realizó en un aparato 7500 Real Time PCR System utilizando el software v.2.0.3.

La expresión del gen se normalizó utilizando genes control, en este caso el gen de β_2 microglobulina. El cálculo se basó en el valor de los Ct y se utilizó como método el incremento de Ct (Δ Ct), así se determinó la expresión relativa en una muestra del gen problema respecto a un gen control.

Una vez obtenido el valor del Δ Ct del gen de cada paciente se multiplicó por 10000 para la representación de los datos, denominado a este valor, unidades arbitrarias (U.A.)

8. Análisis estadístico

Una vez finalizada la entrada de muestras al estudio y recibida de cada centro la información asociada a la misma, se procedió el análisis de los resultados globales del estudio. Los resultados se muestran como la media aritmética +/- el error estándar o la desviación estándar.

La comparación de variables cuantitativas entre grupos se realizó con el test no paramétrico de Wilcoxon (Wilcoxon rank-sum test, también conocido como el test no paramétrico de Mann-Whitney). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como evidencia de diferencias significativas.

Utilizamos el programa informático STATA, versión 11.0 (StataCorp, 4905 Lakeway Drive, College Station, Texas, EEUU).

RESULTADOS

RESULTADOS

ESTUDIO DEL PERFIL DE RECEPTORES Y QUEMOQUINAS EN MO Y LCR

1 Características de los pacientes del estudio:

Durante el periodo de 3 años se recibieron muestras de 122 pacientes diagnosticados de LLA infantil en 18 hospitales españoles. En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado.

Se recibieron muestras de MO de 122 pacientes en el momento del diagnóstico. También se recogieron sus correspondientes LCR al diagnóstico. Veintinueve pacientes se excluyeron del estudio por mala calidad en la muestra de MO o LCR, falta de muestra y/o falta de datos clínicos. Por lo tanto, finalmente se seleccionaron 94 pacientes de los que se obtuvo muestra de MO al diagnóstico y/o recaída y los respectivos LCR. De ellos, 84 pacientes corresponden al momento del diagnóstico y 10 pacientes al momento de la recaída.

Las características de los 94 pacientes se representan en la tabla 5, donde aparece una distribución por fenotipo de leucemia y por grupo de riesgo de todos los niños del estudio. El inmunofenotipo del diagnóstico se realizó en cada centro y se envió al hospital de referencia (HNJS).

		N (%)	RA(%)	RI(%)	RB(%)
LLA-B	Pro-B	8(9,5)	3(3,5)	5(5,9)	
	B común	49(58,3)	6(7,1)	10(11,9)	33(39,2)
	Pre-B	15(17,8)	7(8,3)	2(2,3)	6(7,1)
LLA-T	Pro-T	2(2,3)	1(1,1)	1(1,1)	
	Pre-T	7(8,3)	6(7,1)	1(1,1)	
	Intermedia	3(3,5)		3(3,5)	

Tabla 5. Inmunofenotipo y grupo de riesgo de los 84 pacientes diagnosticados en el estudio.

La localización de la recaída de la muestra de 94 pacientes se representa en la tabla 2 donde aparece una distribución por número y porcentaje.

RECAIDAS	N	%
Aislada medular	6	6,3
Aislada extramedular	3	3,1
Mixta	6	6,3

Tabla 6. Número y porcentaje de la localización de las recaídas de los 94 pacientes del estudio.

2 Estudio del perfil de expresión de quemoquinas en muestras de MO al diagnóstico:

En la MO al diagnóstico se estudiaron los receptores de quemoquinas expresados por los blastos de la leucemia mediante citometría de flujo multiparamétrica. Para ello se cuantificaron los niveles de expresión de 10 receptores CCR y 6 receptores CXCR en los blastos leucémicos. La población leucémica se identificó con marcaje específico anti-CD 45 versus complejidad y posteriormente se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) como el ratio entre el valor de MFI de cada receptor y el valor de MFI del isotipo, como se muestra en la siguiente figura.

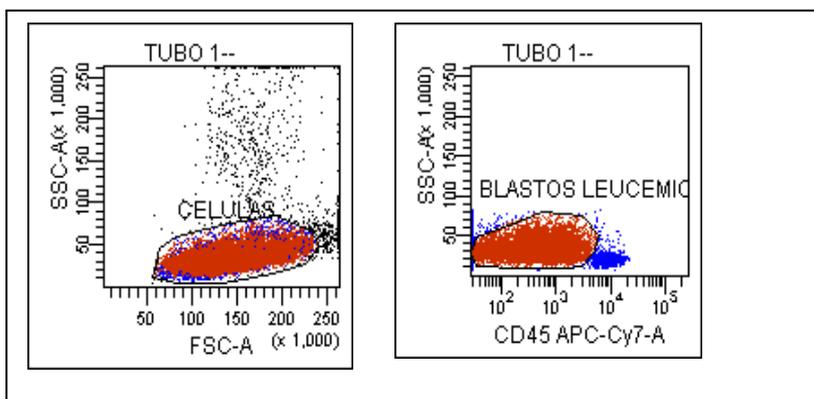


Figura 11. Se identificó en un gráfico CD45 versus complejidad celular la población blástica y estudiar sobre ella la expresión de los receptores de quemoquinas.

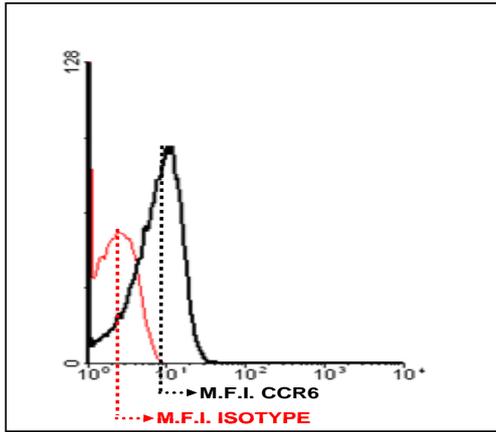


Figura 12. Estrategia de cálculo de la intensidad de fluorescencia media (MFI), ratio de cada receptor respecto al valor de MFI del isotipo.

2.1 Cuantificación de receptores de quemoquinas en los blastos de muestras de MO de LLA según linaje:

A continuación en la figura 13 se muestra el patrón de expresión de quemoquinas según el linaje de la leucemia estudiado por citometría de flujo.

La MFI representa una cuantificación relativa de la expresión de cada receptor en los blastos leucémicos

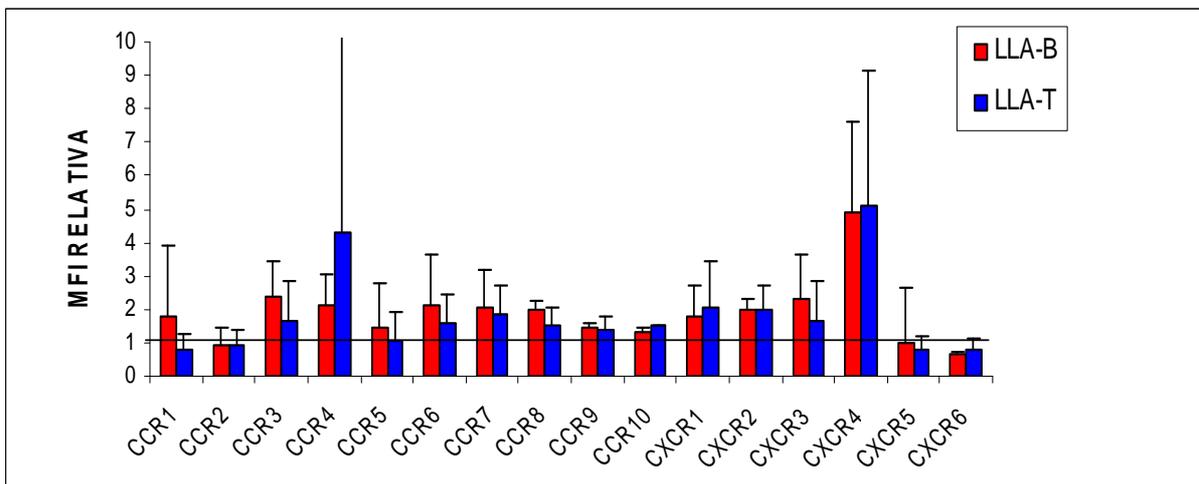


Figura 13. MFI relativa de receptores CCR y CXCR en LLA según linaje. La MFI se calculó como el ratio entre el valor de MFI de cada receptor y el valor de MFI del isotipo. Se representó el promedio y la desviación estándar de las MFI cuantificadas en cada uno de los receptores. Ratio de MFI de 1 significa un nivel de expresión igual que el control isotípico.

Se vio una gran variabilidad en la expresión de receptores de quemoquinas sin diferencias significativas según se analizasen pacientes con LLA de estirpe B o T. En los pacientes con LLA-T, el receptor que se expresó con mayor intensidad fue CCR4, con una MFI relativa de 4.29, seguido de CXCR4 con MFI de 5.10, mientras que en los pacientes analizados con LLA-B, el receptor que se expresó con mayor intensidad fue CXCR4 con MFI relativa de 4.92 seguido de CCR3 con MFI de 2.40, y CXCR3 con MFI de 2.3. También presentaron unos valores de MFI relativa similares, los receptores CCR4, CCR6, CCR7 y CCR8.

2.2 Cuantificación de receptores de quemoquinas en los blastos de muestras de MO de LLA-T según riesgo:

La clasificación de los pacientes al diagnóstico según el riesgo que presentan de recaída, es fundamental en la elección del tratamiento que van a recibir.

A continuación en la figura 14 se muestra el patrón de expresión de quemoquinas según grupo de riesgo asignado a cada paciente en el momento del diagnóstico.

Dentro de las LLA de linaje T hemos comparado la expresión de los niveles de CCRs y CXCRs entre leucemias de alto riesgo, y las leucemias de riesgo intermedio.

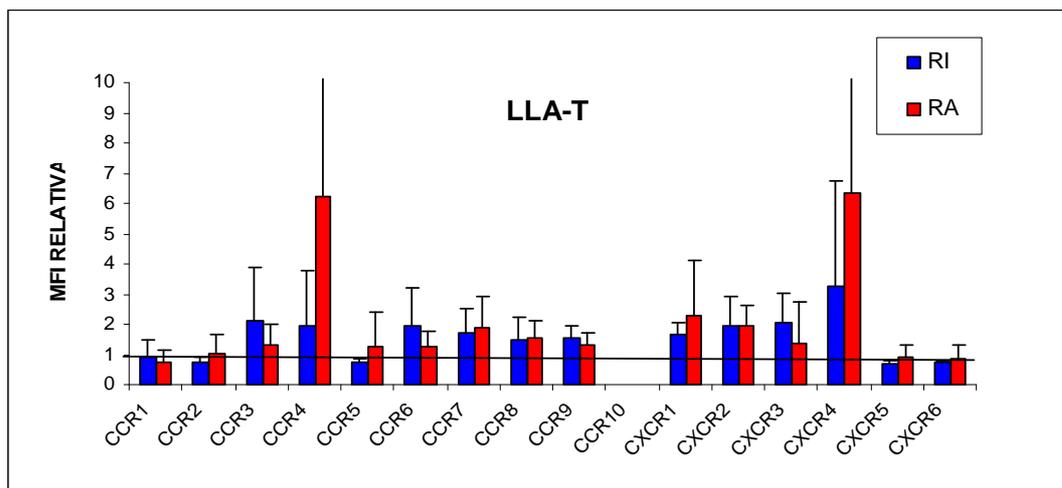


Figura 14. MFI relativa de receptores CCR y CXCR en LLA-T según grupo de riesgo. La MFI se calculó como el ratio entre el valor de MFI de cada receptor y el valor de MFI del isotipo. Se representó el promedio y la desviación estándar de las MFI cuantificadas en cada uno de los receptores.

Dentro de las LLA-T de RA los receptores que se expresaron con mayor intensidad fueron CCR4 y CXCR4, no viéndose expresión alta del resto de receptores analizados.

Dentro de las LLA-T de RI se vio un patrón muy variado de expresión de receptores sin que destacase significativamente la de alguno en particular.

2.3 Cuantificación de receptores de quemoquinas en muestras de MO de LLA-T según estadio madurativo de los blastos:

A continuación en la figura 15, se muestra el patrón de expresión de receptores de quemoquinas según estadio madurativo de los blastos en las LLA-T.

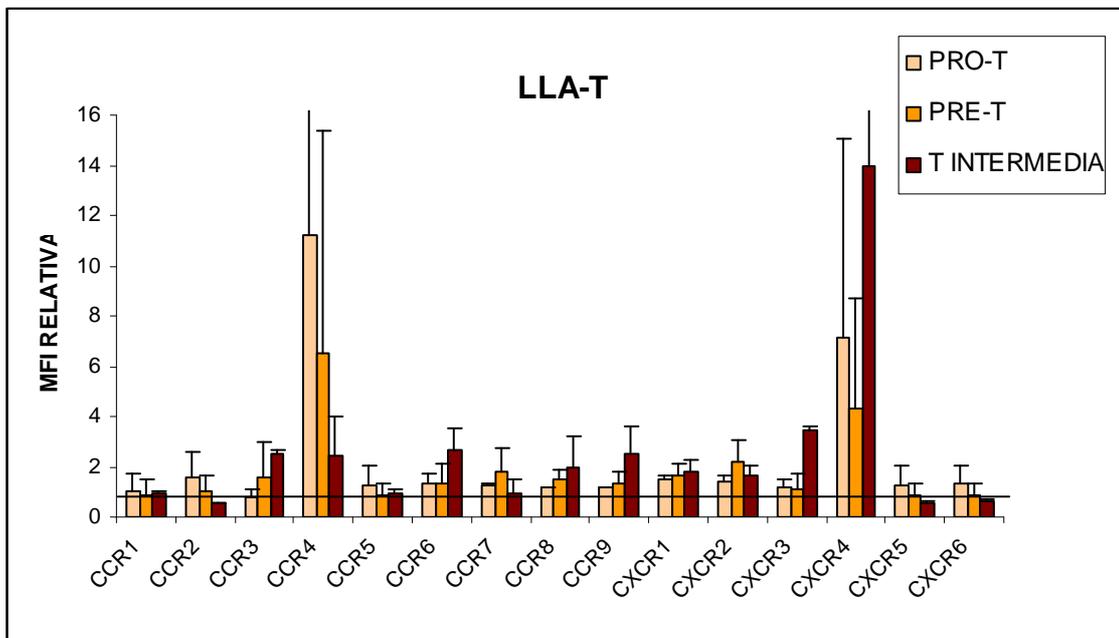


Figura 15 .MFI relativa de receptores CCR y CXCR en LLA-T según subtipo. La MFI se calculó como el ratio entre el valor de MFI de cada receptor y el valor de MFI del isotipo. Se representó el promedio y la desviación estándar de las MFI cuantificadas en cada uno de los receptores.

El receptor CCR4 se expresó con mayor intensidad en las LLA-Pro-T y en las LLA-Pre-T, mientras el receptor CXCR4 se encontró más elevado en las LLA T Intermedia. La expresión de CXCR4 y CCR4 fue alta en todos los subtipos de LLA-T. La variabilidad en la expresión de quemoquinas fue tan elevada que las diferencias apuntadas nunca fueron estadísticamente significativas. En resumen, la expresión fue variada sin ningún patrón asociado a riesgo, linaje o estadio madurativo.

2.4 Cuantificación de receptores de quemoquinas en muestras de MO de LLA-B según riesgo:

Dentro de las LLA de linaje B se comparó la expresión de los niveles de CCRs y CXCRs entre leucemias de alto riesgo, de riesgo intermedio y de riesgo bajo. A continuación en la figura 16 se muestra el patrón de expresión de receptores en las LLA-B según grupos de riesgo.

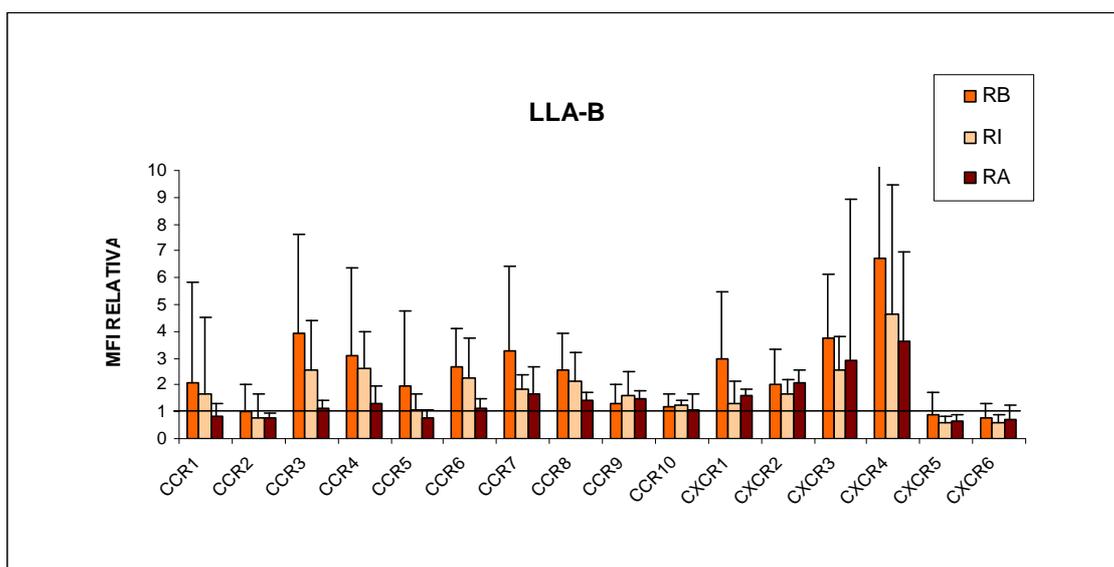


Figura 16. MFI relativa de receptores CCR y CXCR en LLA-B según grupo de riesgo. La MFI se calculó como el ratio entre el valor de MFI de cada receptor y el valor de MFI del isotipo. Se representó el promedio y la desviación estándar de las MFI cuantificadas en cada uno de los receptores.

Cuando se analizaron solamente los pacientes con LLA-B, se encontró una diferente expresión de receptores de quemoquinas por los linfoblastos, según fuera el grupo de riesgo del paciente sin diferencias significativas. En general se observó que la expresión de receptores fue menor en las LLA-B de RA.

Dentro de las LLA-B de RA se expresaban con una mayor MFI relativa los receptores CXCR3 y CXCR4. En las LLA-B de RI los receptores con expresión más alta fueron CCR3, CCR4 y CXCR4. En las LLA-B de RB se expresaron numerosos receptores con intensidades de fluorescencia elevadas, es el caso de CCR3, CCR7, CXCR3 y CXCR4.

2.5 Cuantificación de receptores de quemoquinas en muestras de MO de LLA-B según estadio madurativo de los blastos

A continuación en la figura 17 se muestra el patrón de expresión de receptores de quemoquinas según estadio madurativo de los blastos en las LLA-B. El nivel de expresión se calculó como MFI relativa.

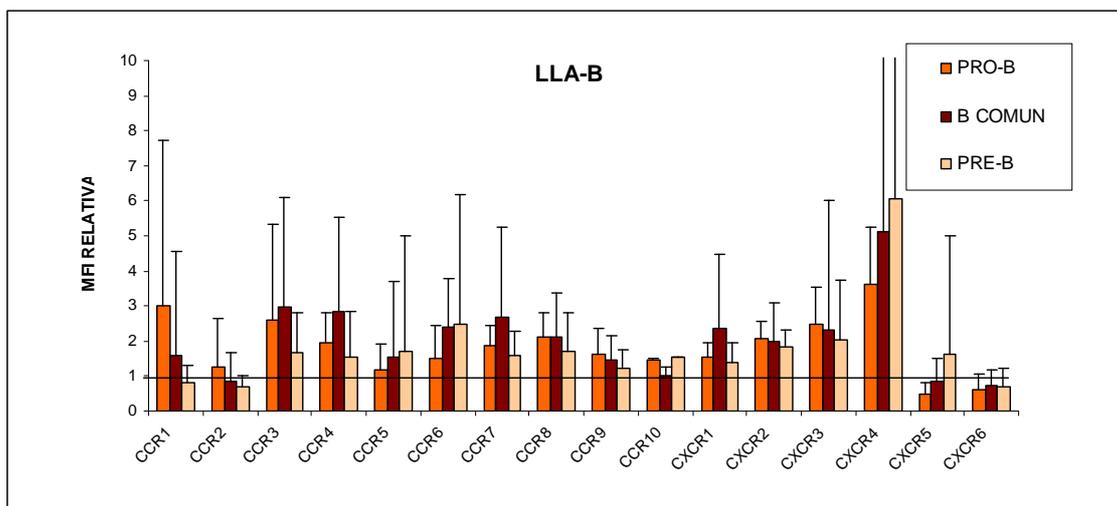


Figura 17 .MFI relativa de receptores CCR y CXCR en LLA-B según subtipo. La MFI se calculó como el ratio entre el valor de MFI de cada receptor y el valor de MFI del isotipo. Se representó el promedio y la desviación estándar de las MFI cuantificadas en cada uno de los receptores.

El receptor CCR1 se expresó con mayor intensidad en las LLA Pro-B mientras el receptor CCR3 se encontró más elevado en las LLA Pro-B y B Común.

Los receptores CCR4, CCR7 y CXCR1 se expresaron con mayor intensidad en las LLA B Común que en los otros dos subtipos. También se observó que la LLA B Común fue el subtipo con mayor expresión de receptores de quemoquinas. El receptor CXCR4 se expresó con mayor intensidad en las LLA Pre-B, aunque su expresión fue muy elevada en todos los subtipos de LLA-B. La variabilidad en la expresión de quemoquinas fue tan elevada que las diferencias apuntadas nunca fueron estadísticamente significativas. En resumen, la expresión fue variada sin ningún patrón asociado a riesgo, linaje o estadio madurativo.

3 Estudio del perfil de expresión y cuantificación de ligandos de quemoquinas en muestras de LCR al diagnóstico.

En las muestras de LCR al diagnóstico se estudió la expresión de los ligandos de quemoquinas mediante las técnicas Bioplex y Elisa convencional. Para ello se cuantificaron los niveles de 17 ligandos descritos anteriormente en el apartado de material y métodos.

3.1 Cuantificación de ligandos de quemoquinas en las muestras de LCR de LLA según linaje:

A continuación se muestran los resultados de cuantificación de quemoquinas en LCR según linaje.

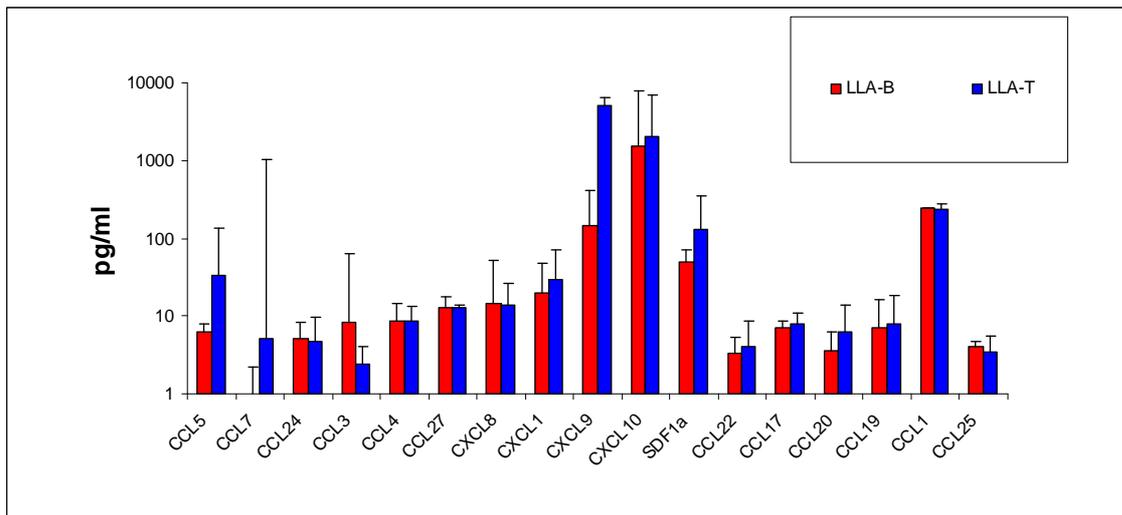


Figura 18. Concentración de ligandos en pg/ml según linaje de las LLA .Se representó el promedio y la desviación estándar de las concentraciones cuantificadas en cada uno de los ligandos de quemoquinas.

Se encontró una gran variabilidad en la expresión de los ligandos de quemoquinas encontrados en los sobrenadantes de los LCR de niños diagnosticados de LLA. La concentración de CXCL9 fue mayor en las LLA-T que en las LLA-B pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.1697$).

3.2 Cuantificación de ligandos de quemoquinas en las muestras de LCR de LLA-T según riesgo:

A continuación se muestran en la figura 19 los resultados de expresión de quemoquinas en LCR según el grupo de riesgo en las LLA-T

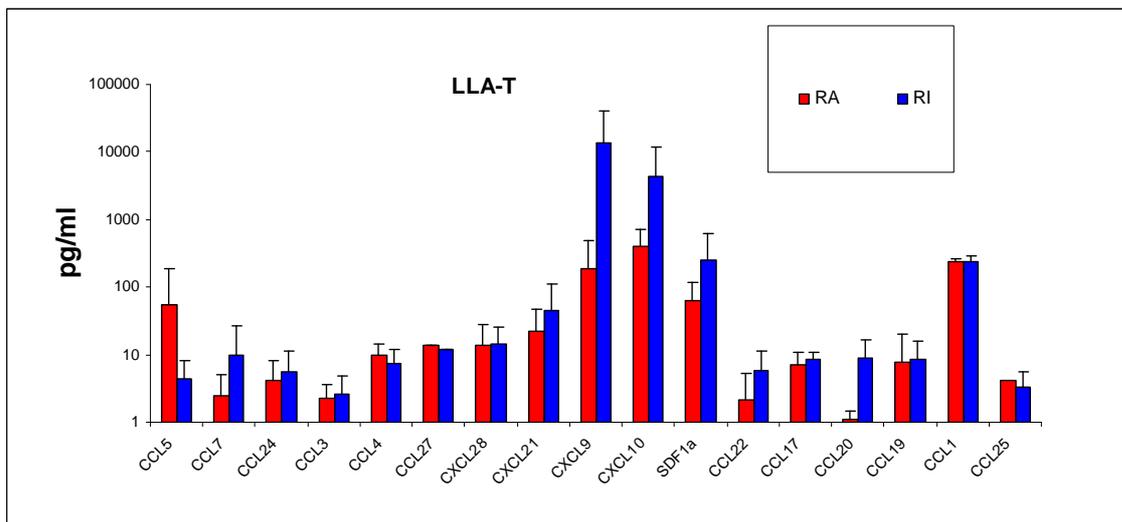


Figura 19. Concentración de ligandos en pg/ml según riesgos en las LLA-T. Se representó el promedio y la desviación estándar de las concentraciones cuantificadas en cada uno de los ligandos de quemoquinas.

En las LLA-T de riesgo intermedio la concentración de CXCL9 y CXCL10 fue mayor que en las de riesgo alto pero la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.8658$ para CXCL9) ($p=0.39$ para CXCL10).

3.3 Cuantificación de ligandos de quemoquinas en las muestras de LCR de LLA-T según estadio madurativo de los blastos:

A continuación se muestran los resultados de la cuantificación de ligandos de quemoquinas en LCR según el estadio madurativo de los blastos en las LLA-T.

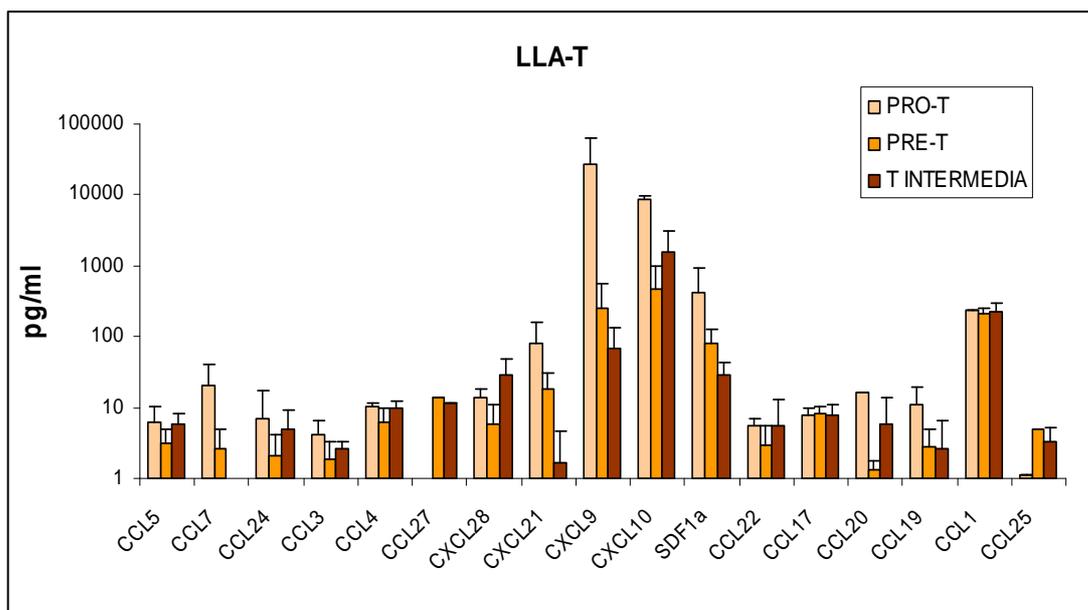


Figura 20. Concentración de ligandos en pg/ml según estadio madurativo de los blastos en las LLA-T. Se representó el promedio y la desviación estándar de las concentraciones cuantificadas en cada uno de los ligandos de quemoquinas.

Al analizar los resultados por subtipos de LLA-T, la variabilidad de los ligandos fue tan elevada que las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas. En resumen, la expresión fue variada sin ningún patrón asociado a riesgo, linaje o estadio madurativo.

3.4 Cuantificación de ligandos de quemoquinas en las muestras de LCR de LLA-B según riesgo:

A continuación se muestran los resultados de la cuantificación de ligandos de quemoquinas en LCR según el grupo de riesgo en las LLA-B.

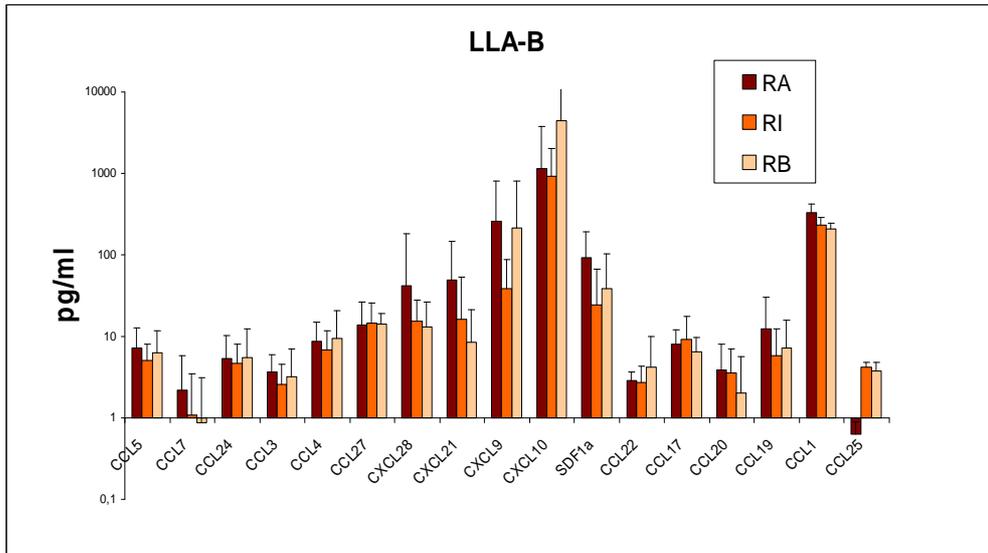


Figura 21. Concentración de ligandos en pg/ml según riesgos en las LLA-B. Se representó el promedio y la desviación estándar de las concentraciones cuantificadas en cada uno de los ligandos de quemoquinas.

Al analizar los resultados por riesgos las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas.

3.5 Cuantificación de ligandos de quemoquinas en las muestras de LCR de LLA-B según estadio madurativo de los blastos:

A continuación se muestran los resultados de la cuantificación de ligandos de quemoquinas en LCR según el estadio madurativo de los blastos en las LLA-B.

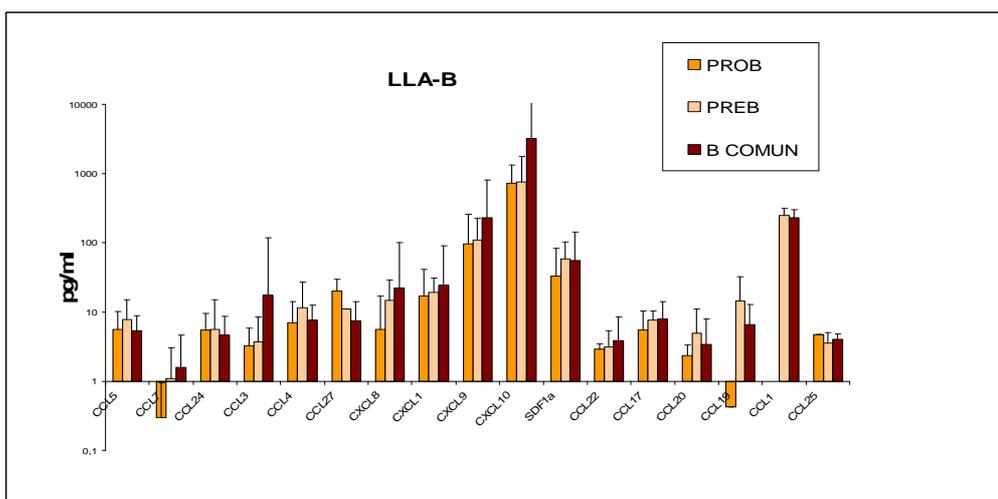


Figura 22. Concentración de ligandos en pg/ml según riesgos en las LLA-B. Se representó el promedio y la desviación estándar de las concentraciones cuantificadas en cada uno de los ligandos de quemoquinas.

Al analizar los resultados por subtipos de LLA-B la variabilidad de los ligandos fue tan elevada que las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas. En resumen, la expresión fue variada sin ningún patrón asociado a riesgo, linaje o estadio madurativo.

4. Perfil de expresión de receptores en infiltración.

A continuación se hicieron estudios de asociación estadística para ver si había diferente perfil de receptores de quemoquinas según la infiltración del SNC. Se utilizó el porcentaje de blastos analizado por CMF para distinguir infiltración de no infiltración. Se consideró infiltración del SNC cuando el porcentaje de blastos al diagnóstico fue mayor de 0.5%. No se encontró asociación estadísticamente significativa de ninguna variable (expresión de receptores y nivel de ligando) con la infiltración leucémica del SNC. Los resultados no fueron significativos para considerar el perfil de expresión de receptores o el de quemoquinas como un valor predictivo de infiltración leucémica del SNC.

A continuación se estudió si existía alguna asociación entre las variables descritas (expresión de receptores y niveles de ligandos) y la recaída leucémica.

5. Perfil de expresión de receptores y recaídas.

5.1 Perfil de expresión de receptores y recaídas medulares y extramedulares

De los 94 pacientes incluidos en el estudio, 15 pacientes recayeron en cualquier sitio (medular y/o extramedular), 8 pacientes recayeron en SNC (sólo 3 pacientes tuvieron recaída aislada en el SNC), 12 pacientes recayeron en la MO(7 pacientes tuvieron recaída medular únicamente).

Una vez descritos los resultados de expresión de receptores en la MO y sus respectivos ligandos en el LCR, se estudió si estos valores se asociaban a recaída leucémica. Para ello se agruparon las muestras de los pacientes del estudio en dos grupos, los pacientes que recayeron (n=15) en cualquier localización frente a los pacientes del diagnóstico que no recayeron.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los receptores al estudiar todas las recaídas. Cálculo de p estadístico mediante el test de Wilcoxon.

	NO RECAIDA		RECAIDA		p
	MEAN+EEM	MEDIANA	MEAN+EEM	MEDIANA	
CCR1	1,50+2,74	0,8	1,48+1,15	1,35	0,0421
CCR2	0,89+0,76	0,75	0,8+0,35	0,7	
CCR3	2,66+2,90	1,5	8,31+18,26	3,4	0,0211
CCR4	3,13+4,24	1,65	4,02+3,92	2,55	0,0953
CCR5	1,43+2,17	0,8	2,51+1,44	1,96	0,0002
CCR6	2,26+1,94	1,8	2,87+1,62	2,6	0,0655
CCR7	2,44+2,40	1,6	3,47+2,72	3	0,0186
CCR8	2,06+1,22	1,61	3,67+1,77	3,4	0,0004
CCR9	1,45+0,68	1,36	1,58+0,26	1,69	
CXCR1	2,22+0,19	1,67	2,73+1,38	2,9	0,0271
CXCR2	1,97+0,97	1,74	2,03+0,76	2,24	
CXCR3	2,9+3,13	2,26	4,70+3,80	3,9	0,0307
CXCR4	6,37+9,56	2,9	3,06+2,83	2,2	
CXCR5	0,93+1,48	0,69	0,85+0,23	0,8	
CXCR6	0,73+0,44	0,65	0,94+0,51	0,88	

Tabla 6. Expresión de receptores de quemoquinas de las LLA cuando se compararon las no recaídas con las recaídas totales expresado como la media + eem, mediana y p estadístico.

Al estudiar todas las recaídas (medulares y extramedulares) se encontraron algunos receptores expresados a niveles significativamente mayores ($p < 0.05$) en el grupo de las recaídas ($p < 0.05$). Es el caso de CCR1, CCR3, CCR5, CCR7, CCR8, CXCR1 y CXCR3. Las diferencias de expresión de CCR4 y de CCR6 no alcanzaron el nivel de significación del 5%.

Considerando la diferente biología de la LLA-T y B se estudió la expresión de los receptores por el linaje de la LLA.

A continuación en la siguiente tabla se muestran los resultados de la expresión de receptores por el linaje de la LLA según recaída o no recaída (n=15)

	LLA-T					LLA-B				
	NO RECAIDA		RECAIDA			NO RECAIDA		RECAIDA		
	MEAN+EEM	MEDIANA	MEAN+EEM	MEDIANA	p	MEAN+EEM	MEDIANA	MEAN+EEM	MEDIANA	p
CCR1	1,05+1,07	0,6	1,22+0,59	1		1,58+2,94	0,81	1,58+1,33	1,36	0,085
CCR2	0,92+0,50	0,8	0,64+0,10	0,67	0,0765	0,89+0,80	0,73	0,86+0,40	0,75	
CCR3	2,38+3,51	1,01	19,5+34,60	2,55	0,0475	2,72+2,84	1,71	3,84+2,16	4,27	0,0891
CCR4	6,70+9,43	1,26	3,92+2,40	3,08		2,60+2,47	1,66	4,06+4,50	2,3	
CCR5	0,84+0,36	0,71	2,09+0,89	1,8	0,019	1,54+2,33	0,86	2,67+1,62	1,97	0,0036
CCR6	1,67+1,12	1,18	3,62+2,41	2,6	0,0477	2,38+2,03	1,93	2,54+1,17	2,6	
CCR7	2,16+2,43	1,35	2,81+0,88	3,19	0,066	2,49+2,42	1,7	3,79+3,31	2,5	0,0819
CCR8	1,84+1,23	1,425	3,21+0,80	3,04	0,0475	2,09+1,24	1,68	3,87+2,07	3,9	0,0028
CCR9	1,66+0,69	1,63	1,60+0,25	1,69		1,41+0,68	1,33	1,58+0,28	1,66	
CXCR1	2,06+1,29	1,73	3,07+2,22	2,85		34,07+255,23	1,66	2,56+0,88	2,9	0,0599
CXCR2	2,03+0,74	1,98	1,53+0,97	1,72		1,97+1,01	1,7	2,25+0,58	2,3	0,0767
CXCR3	2,03+1,90	1,14	7,48+5,82	5,77	0,0237	3,07+3,29	2,59	3,59+2,18	3,6	
CXCR4	11,08+19,36	4,6	3,12+2,83	3,35		5,71+7,08	2,95	3,04+3,00	2,2	
CXCR5	0,75+0,38	0,66	1,00+0,29	1,03	0,089	0,97+1,60	0,69	0,76+0,15	0,78	
CXCR6	0,79+0,36	0,68	1,17+0,83	0,98		0,73+0,45	0,64	0,81+0,20	0,88	

Tabla 7. Expresión de receptores de quemoquinas según linaje de LLA cuando se compararon las no recaídas con las recaídas totales expresado como la media + eem, mediana y p estadístico.

En los pacientes con LLA-T se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión de los receptores CCR3, CCR5, CCR6 CCR8 y CXCR3.

A continuación se representan en diagramas de cajas los receptores expresados a niveles significativamente mayores en el grupo de las recaídas ($p < 0.05$).

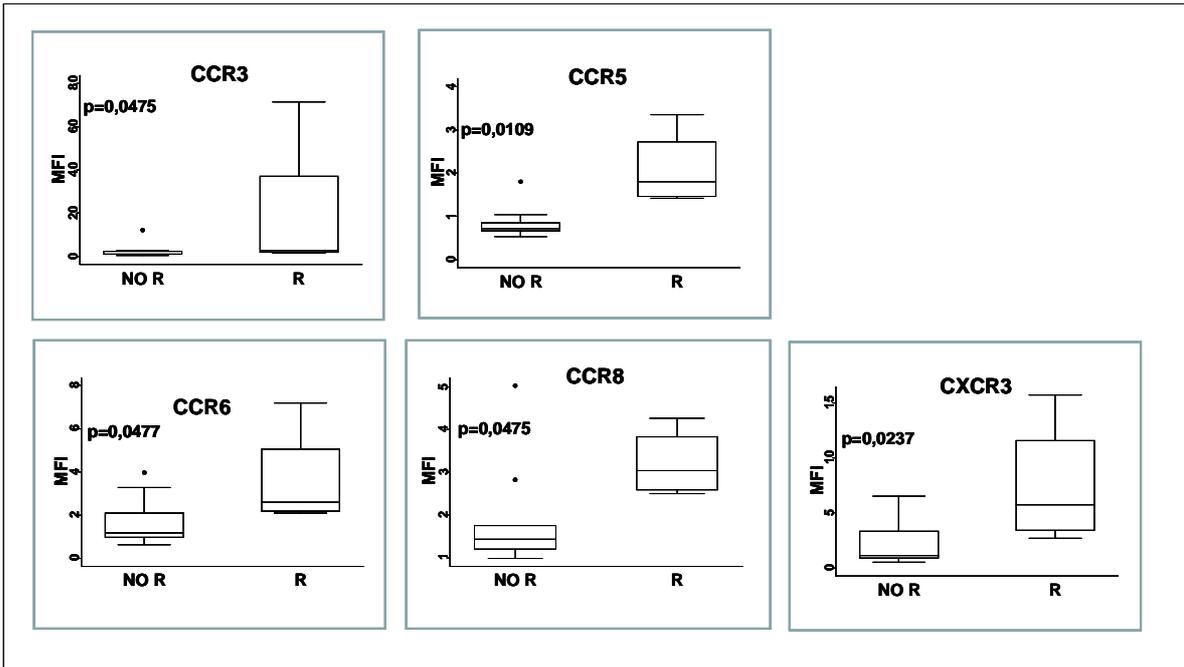


Figura 23. Expresión de CCR3, CCR5, CCR6, CCR8 y CXCR3 en la LLA-T según recaída o no. Se representa la mediana de no recaída frente a la mediana de recaída de cada receptor.

En los pacientes con LLA-B se encontraron algunos receptores expresados a niveles significativamente mayores en el grupo de las recaídas ($p < 0.05$). Fue el caso de los receptores CCR5 y CCR8. A continuación se representan en diagramas de cajas los receptores cuya expresión fue significativa ($p < 0.05$) al comparar no recaída frente a cualquier recaída

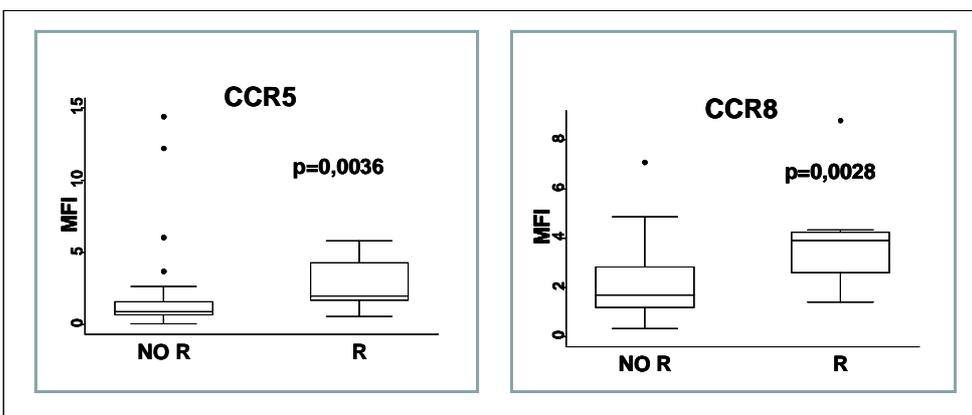


Figura 24. Expresión de CCR5 y CCR8 en la LLA-B según recaída o no. Se representa la mediana de no recaída frente a mediana de recaída.

5.2 Perfil de expresión de receptores y recaídas medulares:

En la siguiente tabla se muestran los resultados de los receptores cuando se compararon recaídas en MO (se excluyeron recaídas solo en el SNC) frente a no recaídas.

	NO RECAIDA	RECAIDA MO	P
	MEDIANA	MEDIANA	
CCR1	0,8	1,3	
CCR2	0,75	0,7	
CCR3	1,5	2,4	0,0993
CCR4	1,65	2,4	
CCR5	0,8	2,1	0,0015
CCR6	1,82	2,6	
CCR7	1,6	3	0,0306
CCR8	1,61	3,28	0,0032
CCR9	1,36	1,7	
CXCR1	1,67	2,7	
CXCR2	1,74	2,24	
CXCR3	2,26	3,7	0,092
CXCR4	2,96	2,2	
CXCR5	0,69	0,83	0,0755
CXCR6	0,65	0,88	0,0974

Tabla 8. Expresión de receptores de quemoquinas en células de LLA cuando se compararon las no recaídas con las recaídas en MO. Se representan las medianas y p estadístico.

A la vista de los resultados se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión de los receptores CCR5, CCR7 y CCR8. Considerando la diferente biología de la LLA-T y LLA-B se estudió la expresión de los receptores de quemoquinas según linaje, comparando recaídas en MO (se excluyeron recaídas solo en el SNC) frente a no recaídas.

	LLA-T			LLA-B		
	NO RECAIDA	RECAIDA MO	P	NO RECAIDA	RECAIDA MO	P
	MEDIANA	MEDIANA		MEDIANA	MEDIANA	
CCR1	0,6	1,1		0,81	1,35	
CCR2	0,8	0,7		0,73	0,75	
CCR3	1,01	2,4	0,0905	1,71	3,25	
CCR4	1,26	2,7		1,66	2,05	
CCR5	0,715	1,5	0,028	0,86	2,56	0,0091
CCR6	1,18	2,9	0,063	1,93	2,52	
CCR7	1,35	3,1		1,7	2,9	0,0677
CCR8	1,42	3,4	0,0626	1,68	3,17	0,027
CCR9	1,63	1,74		1,33	1,7	
CXCR1	1,73	2		1,66	2,81	
CXCR2	1,98	1,8		1,7	2,27	
CXCR3	1,14	7,41	0,0425	2,59	3,6	
CXCR4	4,6	1,2		2,95	2,4	
CXCR5	0,66	1,16	0,042	0,69	0,78	
CXCR6	0,68	1,3		0,64	0,88	

Tabla 9. Expresión de receptores de quemoquinas según linaje de LLA cuando se compararon las no recaídas con las recaídas en MO expresado como la mediana y p estadístico.

Dentro de las LLA-T se encontraron tres receptores con diferencias significativas en los niveles de expresión CCR5, CXCR3 y CXCR5.

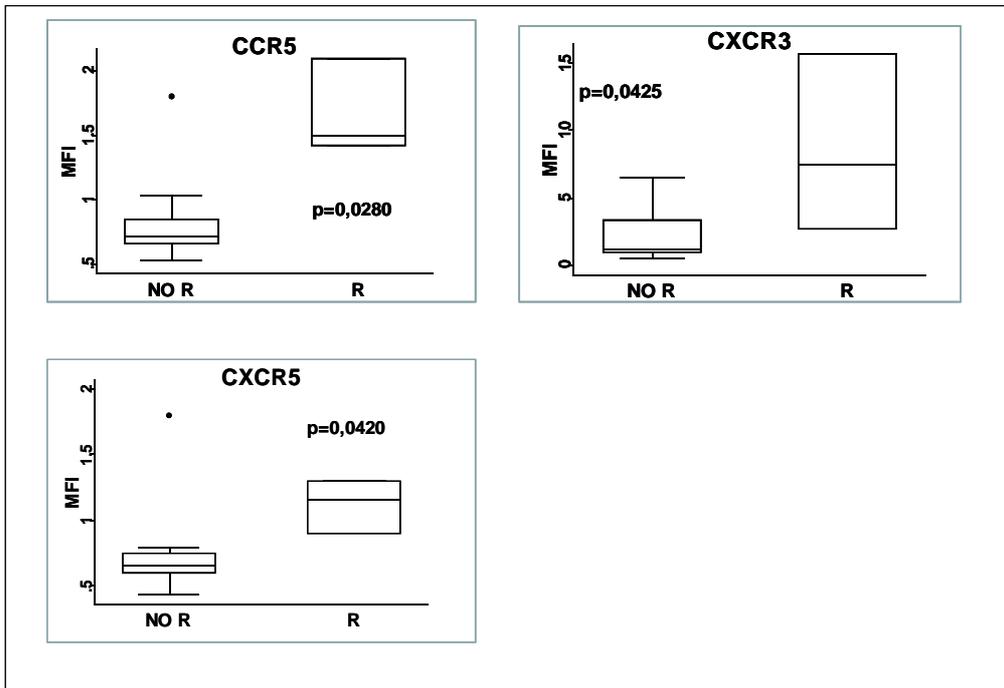


Figura 25. Expresión de CCR5, CXCR5 y CXCR3 en la LLA-T según recaída o no en MO. Se representa la mediana de no recaída frente a mediana de recaída

Dentro de las LLA-B, cuando comparamos no recaídas con recaídas en MO, encontramos dos receptores, CCR5 y CCR8, con diferencias significativas en los niveles de expresión.

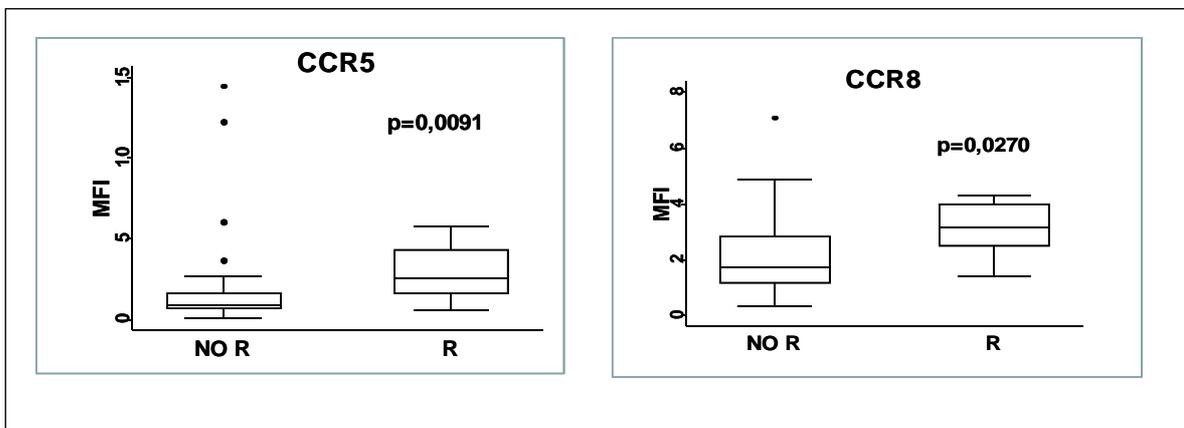


Figura 26. Expresión de CCR5 y CCR8 en la LLA-B según recaída o no en MO. Se representa la mediana de no recaída frente a mediana de recaída .

5.3 Perfil de expresión de receptores y recaídas en SNC:

A continuación se muestra en la siguiente tabla los resultados obtenidos cuando se analizó la relación entre receptores cuantificados en MO, ligandos cuantificados en LCR y recaída en el SNC (se excluyeron las recaídas en MO que no recayeron en el SNC).

	NO RECAIDA	RECAIDA SNC	
	MEDIANA	MEDIANA	P
CCR1	0,8	1,3	0,0446
CCL5	5,2	9,39	
CCR2	0,75	0,64	
CCL7	0,11	0,36	
CCR3	1,5	5,36	0,0022
CCL24	4,18	5,57	
CCR4	1,65	3,47	
CCL22	2,61	3,26	
CCL17	7,39	7,94	
CCR5	0,8	1,82	0,0023
CCL3	2,48	2,21	
CCL4	7,76	8,7	
CCR6	1,8	2,84	
CCL20	1,66	0,89	
CCR7	1,6	3,29	0,0175
MIP 3 β	4,58	7,08	
CCR8	1,61	4,25	0,0012
CCL1	212	255	
CCR9	1,36	1,63	
CCL25	4,7	3,05	
CXCR1	1,67	3,55	
CXCL8	9,63	17,26	
CXCR2	1,74	2,07	
CXCL1	7,47	0,01	0,085
CXCR3	2,26	4,58	0,02751
CXCL9	44,79	186,1	
CXCL10	597,1	3917,92	0,0275
CXCR4	2,96	2,18	
SDF1 α	28,48	32,22	
CXCR5	0,69	0,96	0,0564
CXCR6	0,65	0,77	

Tabla 10. Expresión de receptores de quemoquinas y ligandos en las LLA cuando se compararon las no recaídas con las recaídas en MO, expresado como la mediana y la p estadística (cálculo de p mediante el test de Wilcoxon) (R: recaída; NO R: no recaída).

A la vista de los resultados se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de expresión de los receptores CCR1, CCR3, CCR5, CCR7, CCR8 y CXCR3. La diferencia de expresión de CXCR5 no alcanzó el nivel de significación del 5%. El único ligando encontrado con diferencias significativas fue CXCL10.

Considerando la diferente biología de la LLA-T y B se estudió la expresión de los receptores y sus respectivos ligandos por el linaje de la LLA. A continuación en la

siguiente tabla se muestran los resultados de la expresión de receptores y ligandos por el linaje de la LLA, según recaída o no en el SNC.

	LLA-T					LLA-B				
	NO RECAIDA		RECAIDA EN SNC			NO RECAIDA		RECAIDA EN SNC		
	MEAN+EEM	MEDIANA	MEAN+EEM	MEDIANA	p	MEAN+EEM	MEDIANA	MEAN+EEM	MEDIANA	p
CCR1	1,05+1,07	0,6	1,26+0,72	0,91		1,58+2,94	0,81	2,21+1,94	1,31	0,0608
CCL5	33,62+99,88	5,01	13,82+8,13	12,09		5,77+4,86	5,23	18,63+32,24	0,03	
CCR2	0,92+0,50	0,8	0,69+0,045	0,7	0,0765	0,89+0,80	0,73	0,90+0,66	0,61	
CCL7	5,10+10,17	2	0,50+0,28	0,5		1,19+2,29	0,11	0,01	0,01	
CCR3	2,38+3,51	1,01	25,5+39,75	2,7	0,0422	2,72+2,84	1,71	5,78+1,22	5,8	0,0127
CCL24	4,89+4,68	3,78	14,6+10,4	13,2	0,0704	4,71+5,50	4,18	2,09+3,61	0,01	
CCR4	6,70+9,43	1,26	4,53+2,54	3,47		2,60+2,47	1,66	5,65+6,68	3,29	
CCL22	2,34+2,23	1,95	3,18+0,25	3,04		3,64+4,05	2,7	8,26	8,26	
CCL17	7,04+2,68	7,11	8,87+1,69	8,5		7,63+5,45	7,39	5,17	5,17	
CCR5	0,84+0,36	0,715	2,29+0,97	2,1	0,018	1,54+2,33	0,86	2,7+2,07	1,75	0,032
CCL3	2,43+1,65	2,29	5,02+2,34	5,39	0,0833	13,27+83,92	2,63	0,64+1,09	0,02	0,0836
CCL4	8,82+4,63	8,63	12,26+4,13	10,63		8,45+8,66	7,76	2,94+4,57	0,4	
CCR6	1,67+1,12	1,18	3,87+2,89	2,3	0,063	2,38+2,03	1,93	2,78+1,85	3,39	
CCL20	3,84+6,30	1,5	1,35	1,35		3,69+4,85	1,66	0,43	0,43	
CCR7	2,16+2,43	1,35	3,25+0,13	3,29	0,0425	2,49+2,42	1,7	6,67+6,8	6,67	
MIP 3β	7,03+9,96	3,75	6,80+4,11	8,75		8,51+10,6	5	5,41	5,41	
CCR8	1,84+1,23	1,42	3,45+0,79	3,4	0,0626	2,09+1,24	1,68	5,78+2,59	4,34	0,0089
CCL1	210+33,68	205	255	255		236+67,28	219	255	255	
CCR9	1,66+0,69	1,63	1,60+0,25	1,69		1,41+0,68	1,33	1,48+0,20	1,48	
CCL25	4,00+1,77	4,17	2,93	2,93		3,91+0,97	4,17	3,18	3,18	
CXCR1	2,06+1,29	1,73	3,43+2,57	3,7		34,07+255,23	1,66	2,15+1,97	2,15	
CXCL8	16,65+15,76	11,5	28,13+14,25	23,44		12,0+12,08	9,14	5,97+10,15	0,2	
CXCR2	2,03+0,74	1,98	1,44+1,17	1,65		1,97+1,01	1,7	2,42+0,76	2,55	
CXCL1	30,01+42,52	22,6	0,98+1,68	0,01		15,59+24,52	7,47	0,01	0,01	
CXCR3	2,03+1,90	1,14	9,08+5,96	7,41	0,018	3,076+3,29	2,59	4,23+3,17	3,88	
CXCL9	4976,19+15937	61,96	245,97+194,03	350,1		184,23+453,42	42,08	16,39	16,39	
CXCL10	2136,12+4784,8	686,4	7599,94+4312,5	7603	0,0433	2386,92+10165,41	556,2	1820,17+2370,22	625	
CXCR4	11,08+19,36	4,6	3,76+3,1	5,5		5,71+7,08	2,95	1,95+0,57	1,77	
SDF1α	126,69+227,98	59,33	40,55+25,88	53,72		49,56+59,25	24,42	9,05	9,05	
CXCR5	0,75+0,38	0,66	0,9+0,26	0,9	0,089	0,97+1,60	0,69	1,02	1,02	
CXCR6	0,79+0,36	0,68	1,13+1,02	0,67		0,73+0,45	0,64	0,88	0,88	

Tabla 11 Expresión de receptores de quemoquinas y ligandos según linaje de la LLA cuando se compararon las no recaídas con las recaídas en SNC expresado como la media + eem, mediana y p estadístico.

Dentro de las LLA-T se encontró expresión diferencial de los receptores CCR3, CCR5 y CCR7 pero sin aumento en la expresión de sus ligandos correspondientes.

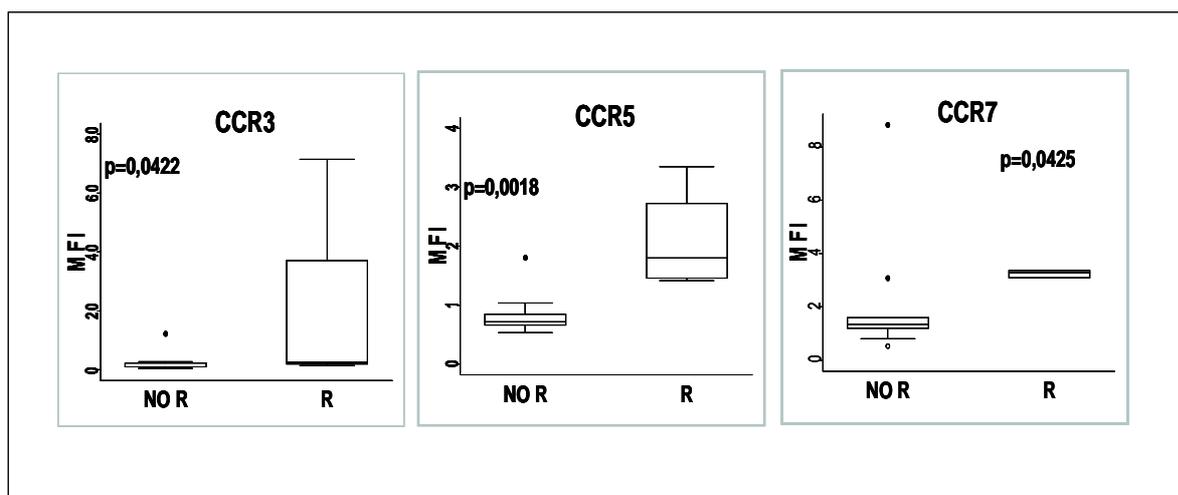


Figura 27. Expresión de CCR3, CCR5 y CCR7 en la LLA-T según recaída en el SNC o no. Se representa la mediana de no recaída frente a mediana de recaída.

Dentro de las LLA-T se encontró expresión significativa del receptor CXCR3 y su ligando CXCL10 cuando se enfrentaron pacientes que no recaen con pacientes que recaen en SNC.

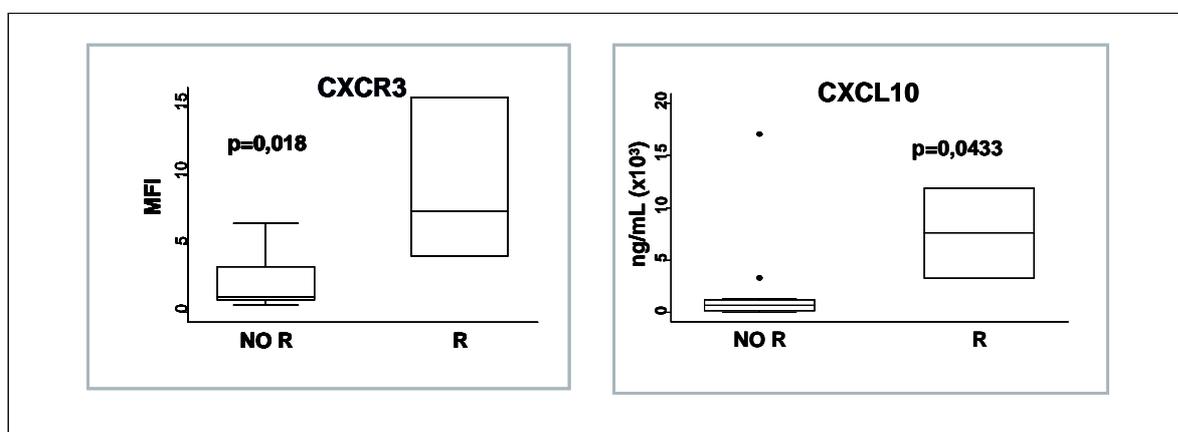


Figura 28. Expresión de CXCR3 y CXCL10 en la LLA-T según recaída en el SNC o no. Se representa la mediana de no recaída frente a mediana de recaída.

Dentro de las LLA-B se encontraron tres receptores expresados de forma significativamente diferente en los casos de recaída: CCR3, CCR5 y CCR8. No se encontró expresión significativamente distinta en los respectivos ligandos.

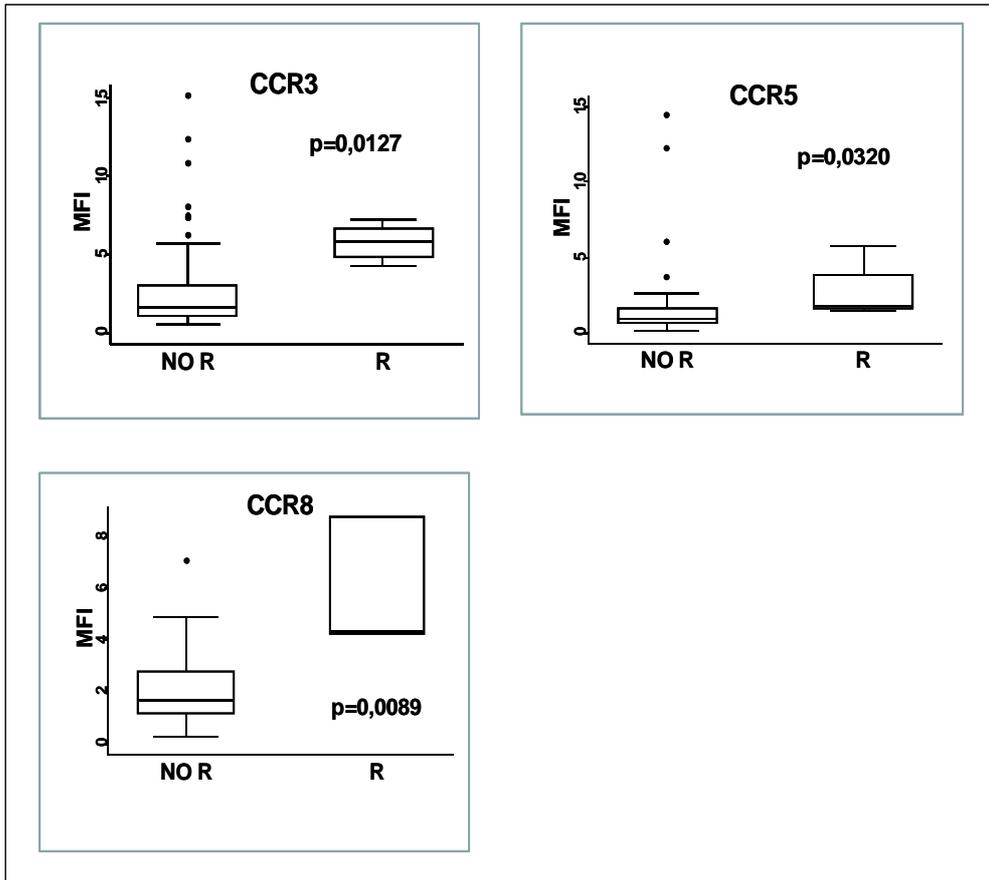


Figura 29. Expresión de CCR3, CCR5 y CCR8 en la LLA-B según recaída en el SNC o no. Se representa la mediana de no recaída frente a mediana de recaída.

A continuación en la siguiente tabla se muestran los resultados de la expresión de receptores según linaje al comparar recaídas en el SNC con recaídas en MO.

	LLA-T		LLA-B	
	RECAÍDA MO	RECAÍDA SNC	RECAÍDA MO	RECAÍDA SNC
	p	p	p	p
CCR1				0,0608
CCR2		0,0765		
CCR3	0,0905	0,0422		0,0127
CCR4				
CCR5	0,028	0,018	0,0091	0,032
CCR6	0,063	0,063		
CCR7		0,0425	0,0677	
CCR8	0,0626	0,0626	0,027	0,0089
CCR9				
CXCR1				
CXCR2				
CXCR3	0,0425	0,018		
CXCR4				
CXCR5	0,042	0,089		
CXCR6				

Tabla 12. Expresión de receptores de quemoquinas según linaje de la LLA cuando se compararon las recaídas en SNC con MO. Se expresó el valor de p (test de Wilcoxon).

A la vista de los resultados, el receptor CCR5 se expresaba a niveles significativamente más elevados en las recaídas, independientemente del fenotipo de la LLA y lugar de la recaída. En el caso de CCR8, las diferencias fueron casi significativas, independientemente del fenotipo de la LLA y lugar de la recaída. En los casos de los receptores CCR3, CCR6, CCR7, CXCR3 y CXCR5, las diferencias encontradas fueron significativas o casi significativas, pero dependientes bien del lugar de la recaída, o bien del tipo de LLA.

5.4 Perfil de expresión de receptores de quemoquinas al diagnóstico y recaída.

A continuación se muestran los resultados de los tres pacientes del estudio en los que se estudiaron los receptores de quemoquinas al diagnóstico y en la recaída. Se realizó una comparación intrapaciente que se muestra en la siguiente figura.

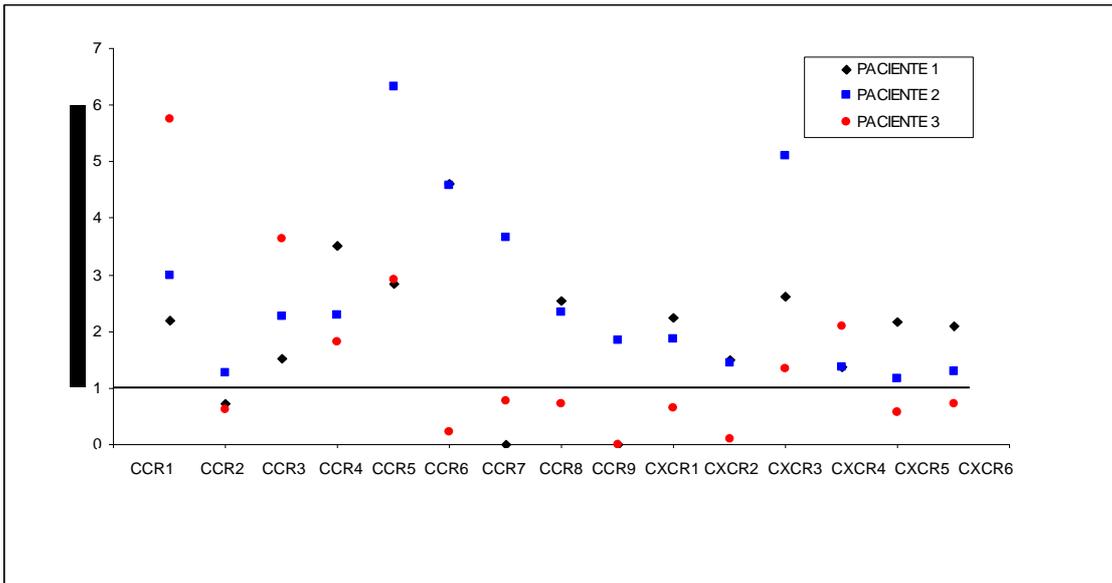


Figura 30. MFI de receptores CCR y CXCR expresada como el ratio entre el valor de MFI del diagnóstico y el valor de MFI de la recaída.

En estos tres pacientes se comprobó que la muestra de la recaída expresaba mayores niveles de receptores de quemoquinas (ratio mayor de 1) para la mayoría de los receptores.

En el único paciente con LLA-T en el que se pudo estudiar el LCR tanto al diagnóstico como en la recaída se encontraron diferencias que se muestran en la siguiente figura.

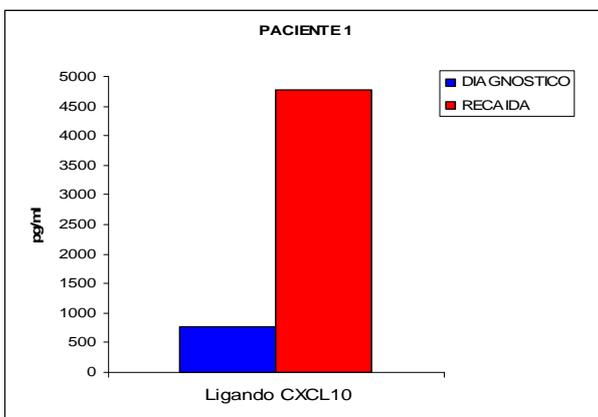


Figura 31. Concentración del ligando CXCL10 expresado en pg/ml en el momento del diagnóstico y de la recaída

Hasta aquí se estudiaron los factores univariantes (receptores y ligandos) que se podían asociar a la recaída. También se estudiaron modelos de regresión logística para ver cuáles de estas variables podían tener un mayor efecto para clasificar a los individuos. Debido al pequeño tamaño del grupo de recaídas no se encontró un modelo multivariante que presentase un ajuste significativo.

PAPEL DEL EJE CXCR3/CXCL10 EN LA RECAIDA EN LA LLA

1 El eje CXCR3/CXCL10 en la recaída

Estos resultados de asociación clínica-analítica sugieren que el eje CXCR3/CXCL10 puede estar implicado en la RECAIDA leucémica del SNC en niños con LLA-T.

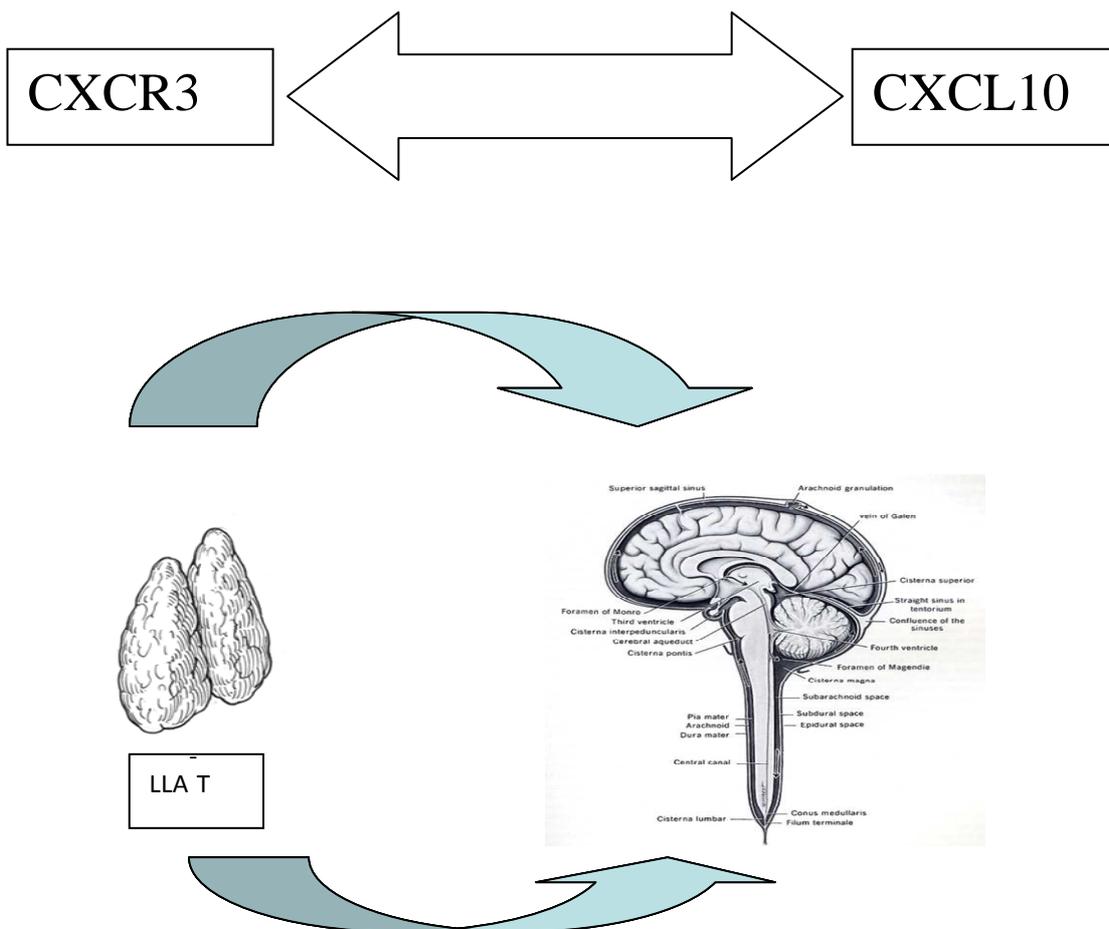


Figura 32. La LLA-T se origina en el timo y para recaer en el SNC tienen que migrar los blastos leucémicos a ese lugar.

Según nuestra hipótesis, el eje CXCR3/CXCL10 puede tener un papel en la quimiotaxis, en la resistencia a la quimioterapia o en ambos procesos. Para evaluar ambas posibilidades se estudiaron las implicaciones del eje CXCR3/CXCL10 como factor de quimiotaxis, y como factor de supervivencia (resistencia a fármacos antileucémicos). Para ello se hicieron ensayos de quimiotaxis y de viabilidad *in vitro*. Se utilizaron tanto muestras primarias como líneas celulares que expresaron diferentes niveles de CXCR3.

1.1 Papel del eje CXCR3/CXCL10 en la quimiotaxis:

A continuación se realizaron ensayos *in vitro* de quimiotaxis con líneas celulares. Primero se hicieron experimentos de quimiotaxis dosis/respuesta con la proteína recombinante CXCL10 para elegir la dosis, como se muestra en la siguiente figura. Se utilizó la línea NALM-6 (por presentar expresión de CXCR3) para elegir la dosis del ligando.

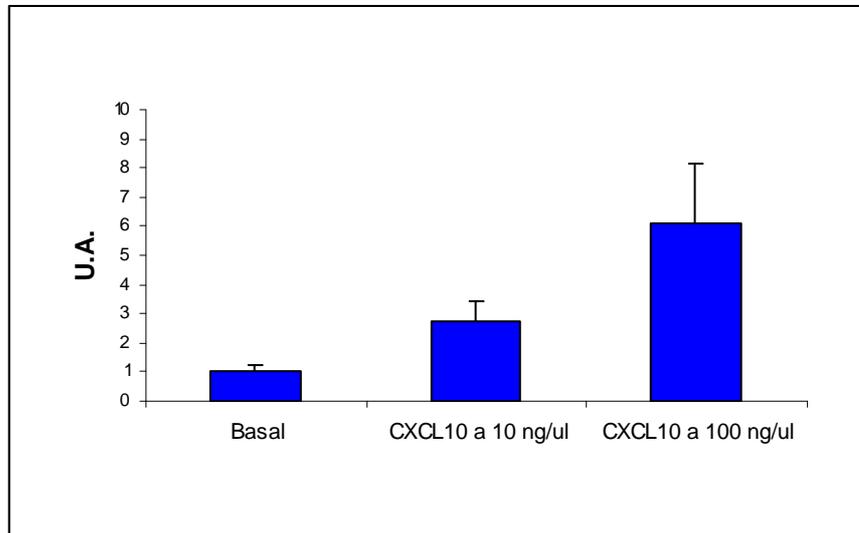


Figura 33. Ensayo quimiotaxis dosis/respuesta con NALM-6 y CXCL10 a distintas concentraciones.

A la vista de los resultados para los siguientes experimentos se utilizó CXCL10 a 100 ng/ul. A continuación se muestran los resultados de los ensayos de quimiotaxis con las líneas celulares NALM-6 y KASUMI-1, en las diferentes condiciones estudiadas descritas anteriormente en el apartado de material y métodos. Las células que habían realizado quimiotaxis fueron contadas para su análisis por CMF.

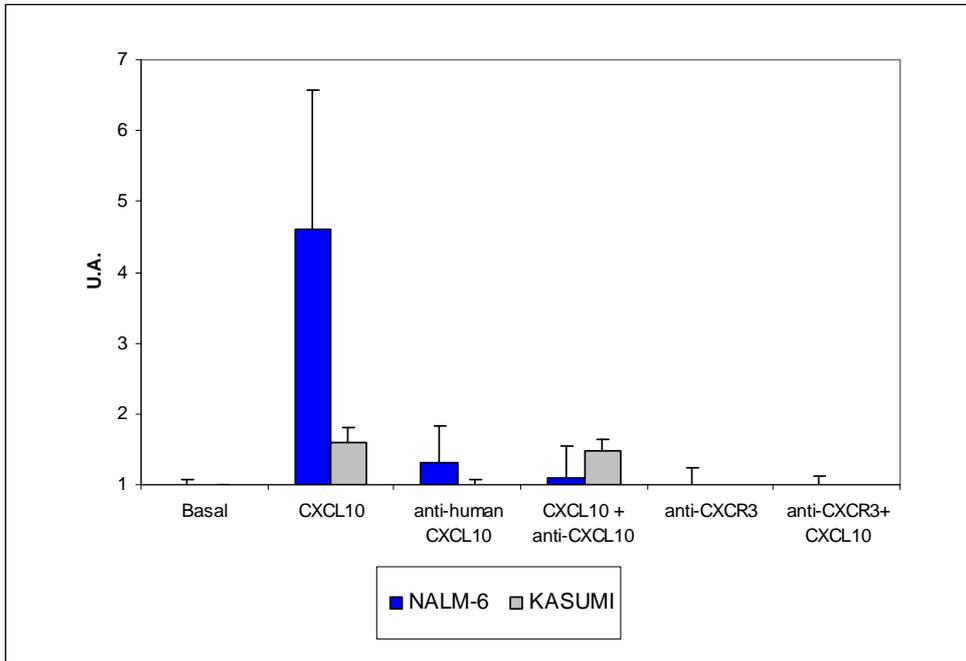


Figura 34. Células NALM-6 y KASUMI-1 recuperadas por pocillo que migraron activamente. Análisis realizado por CMF y expresado en U.A. (Unidades Arbitrarias).

La quimotaxis inducida por CXCL10 en NALM-6 fue 4 veces mayor que en el control y la quimotaxis inducida por CXCL10 en KASUMI-1 fue ligeramente superior que en la situación control.

La línea tumoral NALM-6 presentó una quimotaxis mayor que la línea KASUMI-1. En ambos casos la quimotaxis fue inducida por el ligando CXCL10 e inhibida por el anti-CXCL10. En ambos casos las diferencias fueron significativas como se muestra en la siguiente tabla (test de Wilcoxon):

	NALM-6	KASUMI
	CXCL10	CXCL10
Basal	p=0,0039	p=0,0369
anti-human CXCL10	p=0,0039	p=0,0369
anti-CXCR3	p=0,0039	p=0,0369

Tabla 13. Cálculo de p estadístico mediante el test de Wilcoxon.

A continuación se realizaron ensayos *in vitro* de quimotaxis con muestras primarias. Se analizaron las muestras primarias de MO, criopreservadas al diagnóstico. Se seleccionaron 5 pacientes con alta expresión de CXCR3 por los blastos leucémicos. En la siguiente tabla se muestra la MFI relativa del receptor CXCR3, expresada por los blastos al diagnóstico estudiado por CMF.

	M F I C X C R 3
p a c i e n t e 1	7 . 4 0
p a c i e n t e 2	5 . 1 6
p a c i e n t e 3	3 . 0 7
p a c i e n t e 4	2 . 3
p a c i e n t e 5	6 . 2 3

Tabla 14. Pacientes con alta expresión de CXCR3 al diagnóstico.

También se seleccionaron las muestras primarias de MO criopreservadas al diagnóstico de 3 pacientes con baja expresión de CXCR3. En la siguiente tabla se muestran los valores de MFI relativa del receptor.

	M F I C X C R 3
p a c i e n t e 1	0 , 8 4
p a c i e n t e 2	0 , 8
p a c i e n t e 3	1 , 2 2

Tabla 15. Pacientes con baja expresión de CXCR3 al diagnóstico

A continuación se muestran los resultados de quimotaxis de las muestras primarias, expresados en unidades arbitrarias.

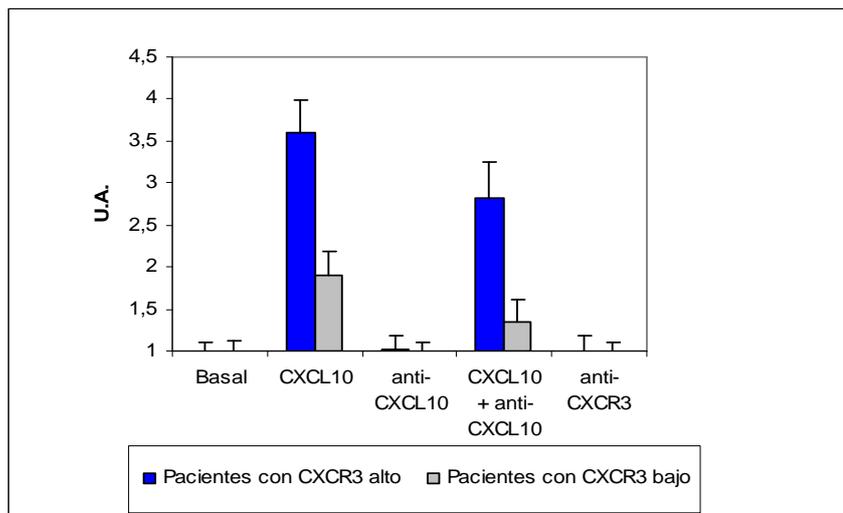


Figura 35. Quimotaxis de células blásticas de MO. Análisis realizado por CMF y expresado en U.A.

Los pacientes con expresión de CXCR3 elevada por sus células leucémicas, presentaron una quimotaxis mayor que los pacientes con baja expresión de CXCR3. En ambos casos la quimotaxis fue inducida por el ligando CXCL10 e inhibida por el anti-CXCL10, y en ambos casos la diferencia con el control fue significativo, como se muestra en la siguiente tabla (test de Wilcoxon). Se observó que los pacientes con expresión de CXCR3 elevada, presentaron 3.5 veces más quimotaxis en presencia de CXCL10 que en la situación control y que en la condición de inhibición del ligando y del receptor.

	pacientes CXCR3 alto	pacientes CXCR3 bajo
	CXCL10 (p)	CXCL10 (p)
Basal	0,0001	0,0476
anti-CXCL10	0,0001	0,0452
CXCL10 + anti-CXCL10	0,1324	0,1917
anti-CXCR3	0,0002	0,0444

Tabla 16. Cálculo de p estadístico mediante el test de Wilcoxon.

1.2. Papel del eje CXCR3/CXCL10 en la resistencia a fármacos antileucémicos:

A continuación se estudió si el eje CXCR3/CXCL10 podía ser un factor de resistencia a la quimioterapia. Para ello se hicieron ensayos de viabilidad con fármacos antileucémicos, utilizados en el tratamiento de la LLA infantil. Se realizaron ensayos *in vitro* de viabilidad con líneas celulares.

Primero se hicieron experimentos de viabilidad con la línea NALM-6 para elegir la concentración de quimioterápico (figuras 36 a 38). La viabilidad se analizó por CMF como se muestra en las figuras 39 y 40.

A continuación se muestran los resultados obtenidos tras 24 y 48 horas de cultivo de las células NALM-6 con citarabina, MTX e Hidrocortisona a distintas concentraciones (0, 1, 10 ,100 y 1000 μ M). Las células recuperadas fueron marcadas para su análisis con 7AAD para determinar su viabilidad expresada en porcentaje.

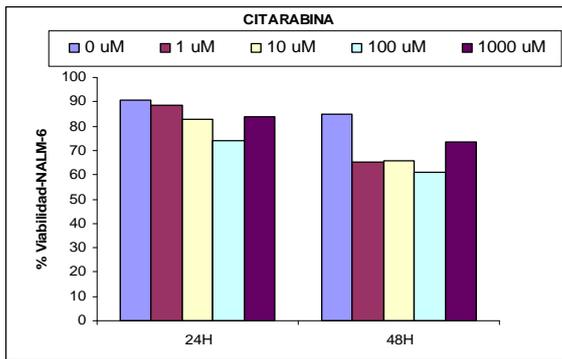


Figura 36. Viabilidad a las 24 y 48 horas de células NALM-6 en presencia de Citarabina a distintas concentraciones.

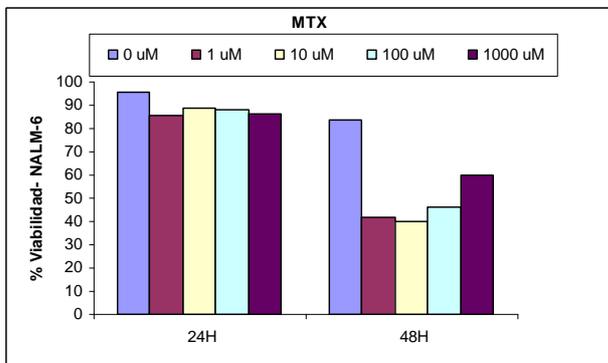


Figura 37. Viabilidad a las 24 y 48 horas de células NALM-6 en presencia de MTX a distintas concentraciones.

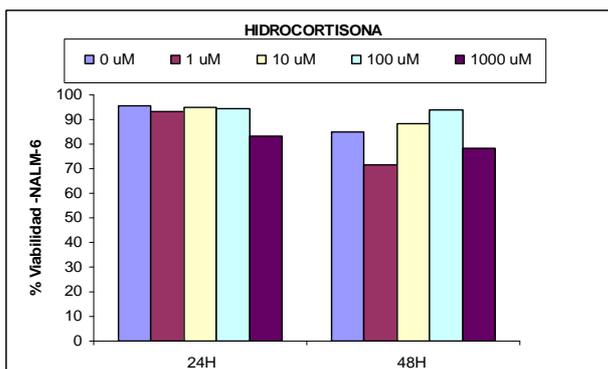


Figura 38. Viabilidad a las 24 y 48 horas de células NALM-6 en presencia de Hidrocortisona a distintas concentraciones.

La concentración elegida de Ara-C y MTX para los siguientes ensayos de viabilidad fue de 1µM. No se hicieron ensayos con hidrocortisona por la variabilidad detectada.

ENSAYO DE VIABILIDAD DE NALM-6 CON CITARABINA.

A continuación se muestran los resultados del ensayo de viabilidad de NALM-6 a las 48 horas de tratamiento con citarabina a 1 micromolar con CXCL10, con anti-CXCL10, con anti-CXCR3, y cultivos control sin tratamiento con citarabina. Tras el cultivo las células recuperadas fueron marcadas para su análisis por CMF con 7AAD.

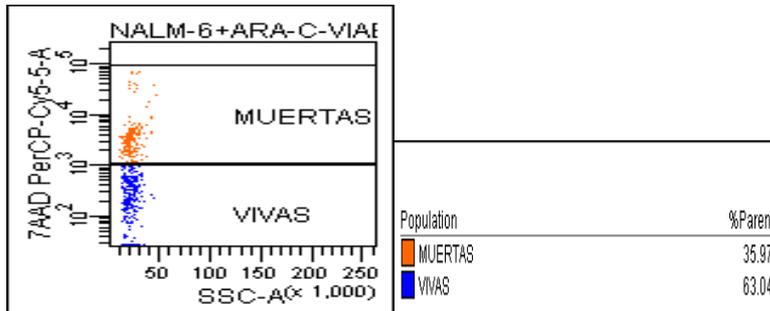


Figura 39. Viabilidad de células NALM-6 tratadas con citarabina.

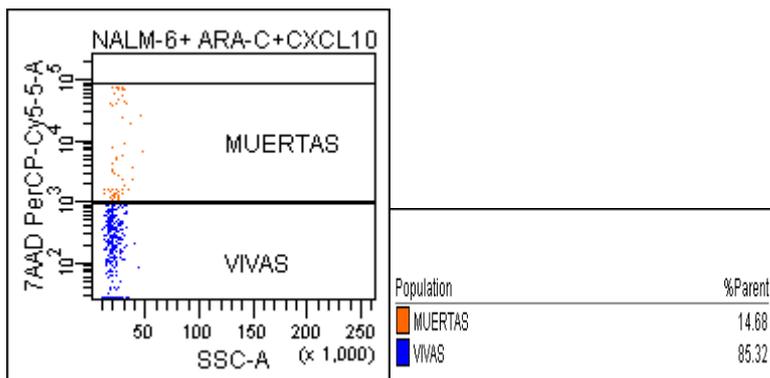


Figura 40. Viabilidad de células NALM-6 tratadas con citarabina y con CXCL10.

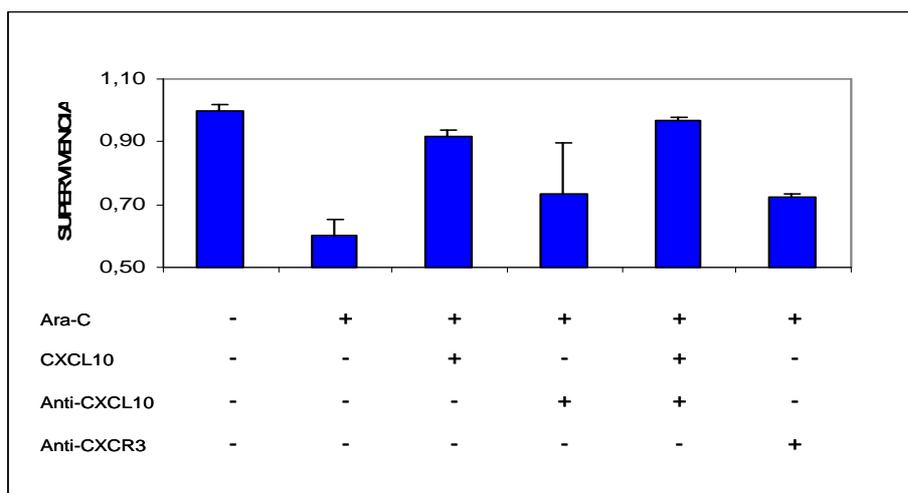


Figura 41. Viabilidad de las células NALM-6 con Ara-C a 1 μ M expresado como media + error estándar de la media (eem).

Con la presencia de CXCL10 se incrementó el número de células vivas. Por tanto los resultados mostraron que la apoptosis inducida por Ara-C, fue corregida casi totalmente con la adición de CXCL10. Los resultados fueron analizados por el test de Wilcoxon y se muestran en la siguiente tabla.

sin Ara-C	Ara-C+ CXCL10
Ara-C	p=0,0046
Ara-C+ CXCL10	p=0,0046
Ara-C+ anti-CXCL10	p=0,0036
Ara-C+ CXCL10+ anti-CXCL10	p=0,0513
Ara-C+ anti-CXCR3	p=0,0196

Tabla 17. Cálculo de p estadístico mediante el test de Wilcoxon

ENSAYO DE VIABILIDAD NALM-6 CON MTX

A continuación se muestran los resultados del ensayo de viabilidad a las 48 horas con MTX a 1 micromolar, con CXCL10, con anti-CXCL10, con anti-CXCR3, y cultivos control sin tratamiento con MTX. Tras el cultivo, las células recuperadas fueron marcadas para su análisis por CMF con 7AAD.

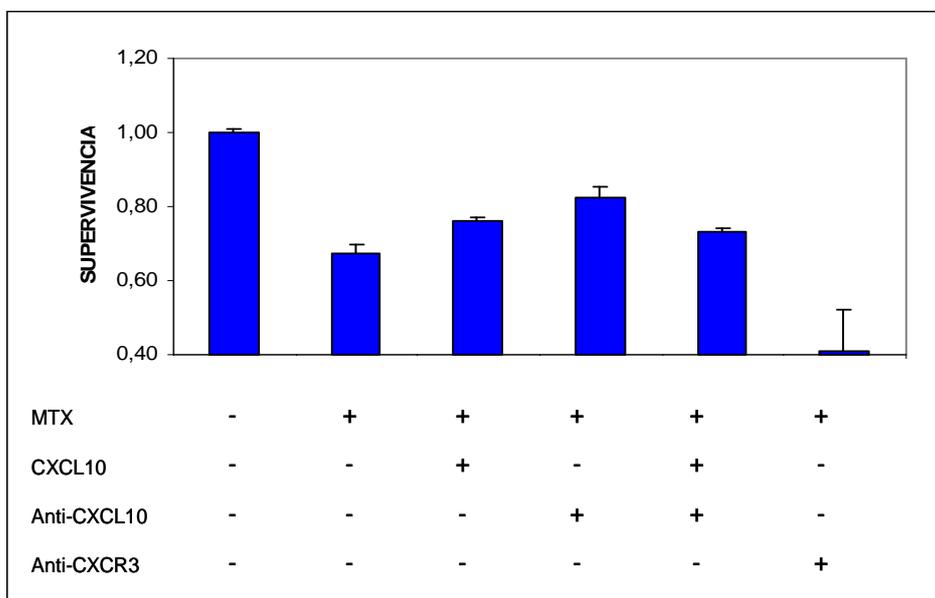


Figura 42. Viabilidad de las células NALM-6 con MTX a 1 μ M expresado como media +eem

Con la presencia de CXCL10 se incrementó el número de células vivas. Por tanto los resultados mostraron que la apoptosis inducida por MTX fue parcialmente corregida con la adicción de CXCL10. Los resultados fueron analizados por el test de Wilcoxon y se muestran en la siguiente tabla.

	MTX+CXCL10
sin MTX	p=0,0463
MTX	p=0,0463
MTX+anti-CXCL10	p=0,0772
MTX+CXCL10+anti-CXCL10	p=0,2683
MTX+anti-CXCR3	p=0,0463

Tabla 18. Cálculo de p estadístico mediante el test de Wilcoxon

A continuación se muestran los ensayos de viabilidad de la línea celular KASUMI-1. Los ensayos fueron realizados a las 24 y 48 horas de cultivo de las células KASUMI-1 con citarabina, MTX e Hidrocortisona a distintas concentraciones (0, 1, 10, 100 y 1000 μ M). Las células recuperadas fueron marcadas para su análisis con 7AAD para determinar su viabilidad expresada en porcentaje. Se hicieron experimentos de viabilidad con la línea KASUMI-1 para elegir la concentración de quimioterápico.

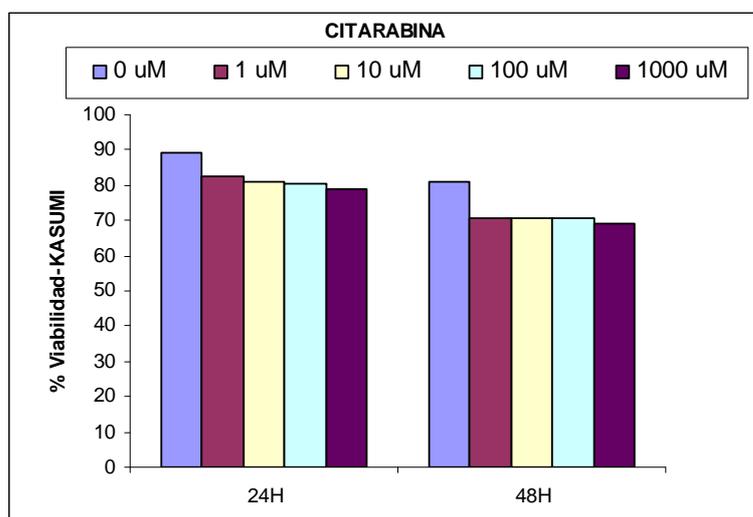


Figura 43. Viabilidad a las 24 y 48 horas de KASUMI-1 en presencia de Ara-C a distintas concentraciones.

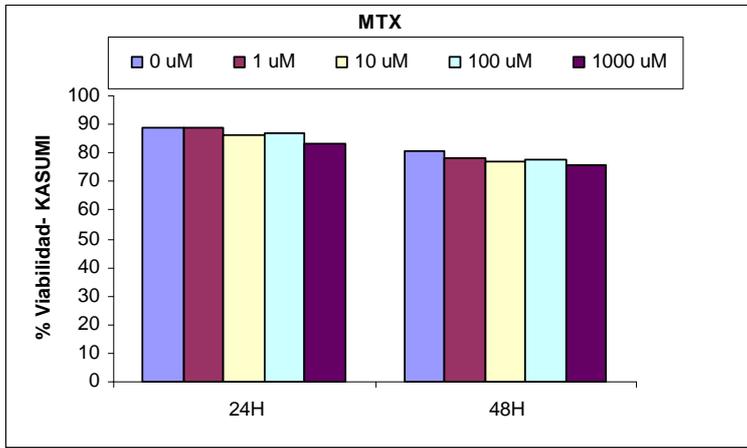


Figura 44. Viabilidad a las 24 y 48 horas de KASUMI-1 en presencia de MTX a distintas concentraciones.

La concentración elegida de Ara-C para los siguientes ensayos de viabilidad fue de 1 μ M.

ENSAYO DE VIABILIDAD DE KASUMI CON CITARABINA.

A continuación se muestran los resultados del ensayo de viabilidad de KASUMI-1 a las 48 horas de tratamiento con citarabina a 1 micromolar con CXCL10, con anti-CXCL10, con anti-CXCR3, y cultivos control sin tratamiento con citarabina. Tras el cultivo las células recuperadas fueron marcadas para su análisis por CMF con 7AAD.

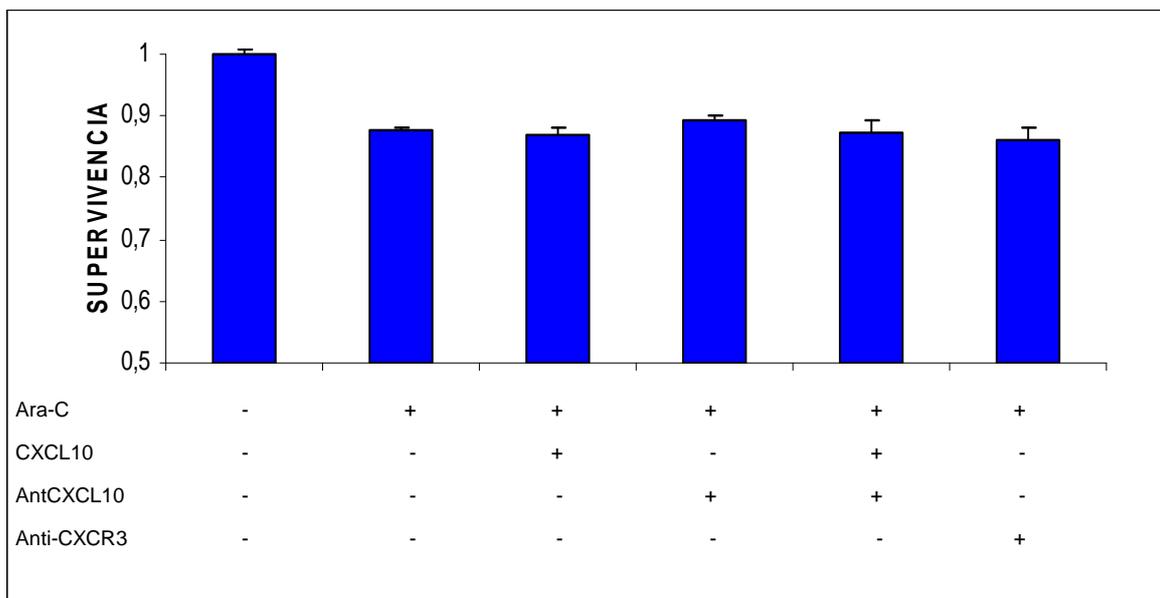


Figura 45. Viabilidad a las 48 horas de las células KASUMI-1 tratadas con citarabina a 1 μ M expresado como media + eem.

Con la presencia de CXCL10 no se incrementó de manera significativa el número de células KASUMI-1 vivas. Por tanto los resultados mostraron que la apoptosis inducida por Ara-C no fue corregida con la adición de CXCL10 en esta línea celular.

2 Estudio de expresión de CXCL10 en muestras de LLA.

Selección de pacientes: Se incluyeron 17 pacientes en el momento del diagnóstico, y 4 pacientes en el momento de la recaída. Se estudiaron los niveles de CXCL10 en muestras de MO mediante Q-PCR. Visto el papel que tenía CXCR3 en la viabilidad, se quiso estudiar si la leucemia producía de forma autocrina este factor de viabilidad.

A continuación se muestran los resultados de los niveles de expresión del gen CXCL10, mediante la técnica de Q-PCR. Se calculó el ΔCt como el Ct del gen target (CXCL10) - Ct ec (control endógeno).

	SITUACION	U.A. CXCL10 (Q-PCR)	MFI CXCR3	CXCL10 (pg/ml)
NALM-6		no se detecta	5	
KASUMI		no se detecta	1,9	
PACIENTE 1	RECAIDA	10,81	7,41	3285,0
PACIENTE 2	RECAIDA	19,12	0,8	292,0
PACIENTE 3	DIAGNOSTICO	no se detecta	2,9	6,5
PACIENTE 4	DIAGNOSTICO	no se detecta	1,03	765,0
PACIENTE 5	DIAGNOSTICO	no se detecta	0,86	292,0
PACIENTE 6	DIAGNOSTICO	no se detecta		
PACIENTE 7	DIAGNOSTICO	no se detecta	0,84	919,0
PACIENTE 8	DIAGNOSTICO	no se detecta	3,16	268,0
PACIENTE 9	DIAGNOSTICO	no se detecta	2,59	873,0
PACIENTE 10	DIAGNOSTICO	no se detecta		
PACIENTE 11	DIAGNOSTICO	20,3	3,32	2426,0
PACIENTE 12	DIAGNOSTICO	10,55	0,83	1022,0
PACIENTE 13	DIAGNOSTICO	no se detecta	6,53	64,0
PACIENTE 14	DIAGNOSTICO	no se detecta	3,35	3295,0
PACIENTE 15	DIAGNOSTICO	no se detecta	1,7	230,0
PACIENTE 16	DIAGNOSTICO	13		
PACIENTE 17	DIAGNOSTICO	Ct endogeno>25		
PACIENTE 18	DIAGNOSTICO	Ct endogeno>25	0,97	
PACIENTE 19	DIAGNOSTICO	Ct endogeno>25	0,98	69,0
PACIENTE 20	RECAIDA	Ct endogeno>25	4,13	7603,0
PACIENTE 21	RECAIDA	Ct endogeno>25	8,38	

Tabla 19. Niveles de expresión de CXCL10 expresado en U.A comparado con los niveles de CXCR3 en MO y de CXCL10 en LCR.

Se observó que los niveles de CXCL10 fueron detectables únicamente en 3 pacientes estudiados en el momento del diagnóstico, y en 2 pacientes estudiados en la recaída. En 11 pacientes al diagnóstico no se detectó RNAm de CXCL10, y en 5 pacientes (3 diagnósticos y 2 recaídas) no fue posible obtener un resultado fiable debido a la mala calidad del RNA y se obtuvo un Ct del gen endógeno no válido para esta técnica.

La mayoría de las muestras de pacientes y líneas no expresaron CXCL10 y de aquellos pacientes en los que se detectó RNAm de CXCL10 no se evidenciaron niveles más altos de la proteína en el LCR.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Quemoquinas y SNC

El tratamiento de la LLA, quimioterapia sistémica y terapia dirigida al SNC (TTI), ha mejorado el pronóstico de estos pacientes de manera muy importante en los últimos años. Las recaídas continúan siendo el reto más importante para conseguir la curación total. Descubrir los factores celulares y moleculares que confieran resistencia al tratamiento, permitirá administrar nuevas terapias a este grupo de pacientes.

Uno de los factores que se han asociado clásicamente a las recaídas leucémicas es la localización anatómica de dichas recaídas, de manera predominante en testículo y en el sistema nervioso central, lo que justificó la consideración de dichos órganos como santuarios. Intuitivamente, santuario apunta a la seclusión de los blastos dentro de estos órganos respecto del ambiente exterior, en este caso, de la quimioterapia sistémica. Testículo y SNC representarían pues una barrera para la llegada de niveles adecuados de fármacos antileucémicos, por lo que los blastos capaces de recluirse en estos santuarios, se encontrarían menos expuestos a la quimioterapia, y por tanto, mejor capacitados para recaer. En este sentido, es muy importante caracterizar qué moléculas están implicadas en la colonización leucémica de estos santuarios, puesto que podrían convertirse en dianas terapéuticas específicas de leucemias con alta capacidad para recaer.

Existe además otra característica de cualquier santuario que tiene importancia en el tema de la recaída leucémica, y es la posibilidad que los órganos santuarios aporten factores que aumenten la capacidad de los blastos a resistir la agresión de la quimioterapia. En este caso, los blastos capaces de recluirse en estos santuarios, se encontrarían expuestos a un ambiente que les protegería frente al tratamiento antileucémico, y por tanto, les ayudaría a resistir la quimioterapia. En este sentido, es muy importante identificar qué moléculas están implicadas en esta protección que conferiría el ambiente de estos santuarios, puesto que también podrían convertirse en dianas terapéuticas específicas para el tratamiento de leucemias con alta capacidad para recaer. Por tanto, cuando se habla de santuario leucémico, estas dos opciones

pueden estar presentes: bien indirectamente (aislando del exterior), bien directamente (aportando protección), el santuario permite la supervivencia de los blastos leucémicos en su interior. Ambas opciones no son excluyentes, y es de esperar que en cada caso individual pueda tener importancia variable cada una de ellas.

El SNC cuenta con una barrera, la BHE, estructura histológica y funcional que protege al Sistema Nervioso Central, constituida por células endoteliales especializadas que recubren el sistema vascular cerebral y tiene una importancia capital en el mantenimiento de la homeostasis de las neuronas y las células gliales, y en el bloqueo del acceso de sustancias tóxicas endógenas o exógenas (Hawkins BT y col., 2005). El paso a través de ella exige que las células que lo hacen, presenten en su membrana una serie de moléculas de adhesión específicas, capaces de responder a los ligandos que se producen en las áreas de entrada. Una vez traspasada la BHE, para poder progresar por el parénquima del SNC, se necesitan otras moléculas distintas a las primeras. Los procesos de llegada, paso de la BHE y progresión en el parénquima, requieren pues un conjunto de moléculas diferentes, con un papel distinto según la localización (Wilson EH y col., 2010).

La LLA es una enfermedad que no se origina en el SNC, por lo que su presencia en el LCR indica una migración de las células blásticas desde la MO en las LLA-B o desde el timo en las LLA-T, al espacio subaracnoideo y al parénquima cerebral y/o medular. En este trabajo hemos estudiado algunas moléculas que pueden estar implicadas en la colonización del SNC por parte de los blastos leucémicos. No existe mucha información previa a este respecto, por lo que hemos asumido que las células leucémicas pueden emplear la maquinaria molecular utilizada por los leucocitos cuando asientan en este órgano. Dentro del conjunto de moléculas de adhesión leucocitarias, las quemoquinas representan unos candidatos importantes en la colonización del SNC, y además han sido implicadas en el proceso de metástasis a los órganos diana en algunos tumores.

Las quemoquinas son citoquinas proinflamatorias con capacidad quimioatrayente que participan en la modulación del tráfico leucocitario, regulando el trasvase de leucocitos hacia órganos y tejidos, proceso en el que participan otras muchas proteínas como selectinas, integrinas, moléculas de adhesión y citoquinas.

Constituyen una familia de más de 40 proteínas de pequeño tamaño, de bajo peso molecular (8-14 KDa) que se unen a receptores que señalizan vía proteína G (Zlonik A, Yoshie O, 2000).

Las quemoquinas provienen de varias fuentes celulares y más allá de su papel en el reclutamiento y activación de los leucocitos, su estudio ha despertado gran interés, debido a la selectividad que tienen para activar y dirigir el tráfico de distintas subpoblaciones de leucocitos a los sitios de inflamación por atracción y activación de las integrinas que se unen a sus receptores en las células endoteliales (Ebnet and Vestwebwe, 1999). También inducen el tráfico de células dendríticas, los linfocitos Th1, Th2 y B en el tejido linfoide secundario, lo cual contribuye a la ubicación celular en diferentes localizaciones anatómicas (Cyster JG y col., 1999). Once receptores de quemoquinas CC (CCR1-CCR11) y seis receptores CXC han sido identificados en el hombre (Mackay, 2001) y existe expresión de los receptores de quemoquinas en los distintos tipos celulares.

La expresión de los distintos receptores de quemoquinas por parte de los linfocitos T y B durante sus estadios de maduración es un tema parcialmente conocido. Los blastos leucémicos pueden expresar los receptores correspondientes a los estadios madurativos en los que se encuentra la LLA, o bien podría suceder una expresión aberrante, secundaria a alteraciones genéticas intrínsecas de la enfermedad. Paul E. Love y colaboradores en 2011, describen los distintos estadios del desarrollo del timocito y como distintas quemoquinas regulan su migración al timo. La célula T originaria de la MO, derivada de los progenitores hematopoyéticos debe migrar a los distintos compartimentos anatómicos del timo para completar su maduración, y para ello necesita de receptores de quemoquinas como CCR9 y CCR7 (Zlotoff DA. Y col., 2010; Krueger A. y col., 2010; Schwarz BA. Y col., 2007). Ya dentro del timo los progenitores tempranos de la célula T también expresan CXCR4 (Hérendez-López y col., 2002). Los ligandos de CCR7 (CCL19 y CCL20) y de CCR9 (CCL25) se expresan también en el timo, los primeros en la médula y el segundo en las células del estroma. Dentro de los linfocitos T postímicos, el receptor CXCR3 es expresado en linfocitos T activados con fenotipo Th1, como describió Luster AD en 1998. En el caso del linfocito B, su localización hacia órganos linfoides o hacia la MO se ha asociado en parte a la diferente expresión de receptores de quemoquinas en los

distintos estadios de maduración de la célula B (Bowman, E. P. y colaboradores en 2000). El receptor CXCR4 también está relacionado con el precursor de la célula B (Burger, J.A. y col., 2002). Un estudio de Wong S y colaboradores en 2004 describió que los linfocitos B de donantes sanos (n=20), eran positivos para los receptores CXCR4, CXCR5 y CCR6, negativos para CCR5 y con expresión variable para CCR7 y CXCR3.

2. Receptores de quemoquinas y ligandos en LLA al diagnóstico

Tras analizar los blastos de la MO de 84 pacientes diagnosticados de LLA nuestros resultados mostraron que la expresión de receptores de quemoquinas fue muy variada. En nuestro estudio aquellos niños con LLA de linaje T presentaron una mayor expresión de CXCR4 y CCR4. Como ya hemos comentado, está descrito la expresión de CXCR4, CCR7, CCR9 y CCR4 en el desarrollo y maduración del linfocito T dentro de los distintos compartimentos del timo (Bunting MD y col., 2011). CXCR4 está implicado en el asentamiento de las células madre hematopoyéticas en la MO (Liles W.C. y col., 2003). Es posible que la expresión de CXCR4 por los blastos de LLA-T tenga un papel en la infiltración de la MO por estas células.

En nuestros resultados, el resto de receptores analizados presentaron una ratio de MFI cercana a 1, siendo 1 un nivel de expresión igual que el control isotípico, lo que significa una expresión inexistente o muy baja de los receptores. La importancia funcional de estos receptores con índice de 1 es posiblemente poco significativa. En los blastos de LLA-B analizados en nuestro estudio, los receptores CXCR4, seguido de CCR3 y CXCR3, se expresaron con mayor intensidad, mientras que el resto de receptores presentaron una MFI con niveles no muy superiores a 1.

Nuestros resultados coinciden con otros autores, Wong y col en 2004, quienes vieron que células de LLA-B precursora (n=16) de MO expresaban niveles moderados de CXCR4, variable expresión de CXCR3, y no encontraron expresión de otros receptores como CXCR5, CCR5, CCR6 y CCR7. Nuestros resultados mostraron que la expresión de receptores de quemoquinas no se asociaba a ningún patrón constante según el linaje T o B. Esto coincide con lo descrito por otros autores (Ishida y col, 2003) que encontraron que las células de leucemia y linfoma expresaban un amplio repertorio de receptores de quemoquinas, probablemente por su origen

hematopoyético, y que en las LLA-T de adultos las células leucémicas expresaban CCR4. No hemos encontrado otros estudios comparando expresión de receptores de quemoquinas entre LLA-B y LLA-T.

Nuestros resultados se parecen a los de otros autores al encontrar elevado el nivel de expresión del receptor CXCR4. Este receptor, además de encontrarse elevado en muchos tipos de cánceres (Balkwill, 2004), se encuentra también expresado en tejido normal, y juega un papel en el desarrollo fetal, movilización de células madre hematopoyéticas y movimiento de linfocitos naive (Rossi and Zlotnik, 2000)

Nuestros resultados mostraron que la expresión de receptores de quemoquinas según grupo de riesgo de los pacientes fue variada y heterogénea, sin ningún patrón asociado a ningún subgrupo. En las LLA-T de RA se expresaban con mayor intensidad CXCR4 y CCR4, mientras el resto de receptores analizados tenían un nivel de expresión similar al control isotípico, cercano a 1. En las LLA-T de RI analizadas, se vio un patrón variado de expresión de receptores, sin una mayor expresión de ninguno en particular.

Cuando se analizaron solamente los pacientes con LLA-B, se encontró una diferente expresión de receptores de quemoquinas por los linfoblastos según fuera el grupo de riesgo del paciente. Dentro de las LLA-B de RA se expresaron con una mayor intensidad los receptores CXCR3 y CXCR4. En las LLA-B de RI los receptores que más se expresaron fueron CCR3, CCR4 y CXCR4. En las LLA-B de RB, los receptores que se expresaron con intensidades de fluorescencia elevadas fueron CCR3, CCR7, CXCR3 y CXCR4. Todas estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. No hemos encontrado estudios que analicen la expresión de receptores de quemoquinas al diagnóstico en LLA según sea el grupo de riesgo del paciente.

En cuanto al análisis de los receptores según estadio madurativo de los blastos, en nuestros resultados el patrón de receptores de quemoquinas encontrado fue también muy variado. Existen estudios de receptores de quemoquinas en muestras primarias de niños con LLA-B similares al nuestro (Corcione y col, 2006), que fueron realizados con pocos casos. CXCR2 y CXCR3 fueron detectados con alta MFI en todos los estadios madurativos y la MFI de CXCR5 fue alta en LLA B común y baja en los demás subtipos. La expresión de los receptores fue analizada por CMF.

En nuestros resultados, el estadio madurativo correspondiente a LLA-B común, presentó los niveles de expresión de receptores de quemoquinas con mayor MFI, comparados con estadios más inmaduros (Pro-B). Este hecho no se cumplió con CXCR4, que se expresó con mayor intensidad en las LLA Pre-B, aunque su expresión fue muy elevada en todos los subtipos de LLA-B. Sobre la maduración de la célula B y los receptores de quemoquinas, algunos autores (Marek Honczarenko y col., 2002) describieron niveles de CCR5 expresados en todos los progenitores de célula B de MO, aunque a niveles más bajos que los de CXCR4. En cuanto a los progenitores de la célula T y los receptores de quemoquinas, como ya hemos comentado anteriormente, CCR9 es crucial para que el progenitor T vaya al timo y madure dentro de él (Paul E. Love y col., 2011). También intervienen en la maduración de la célula T los receptores CCR7, CXCR4 y CCR4 (Bunting MD y col., 2011). La variabilidad obtenida en nuestros resultados en la expresión de quemoquinas en MO, fue tan elevada que las diferencias apuntadas nunca fueron estadísticamente significativas. Mientras que en las LLA-B, la MO es el órgano de origen de los blastos leucémicos, en las LLA-T la MO debe considerarse un órgano metastásico. Es posible que el perfil de receptores que expresan los blastos de LLA-T en la MO no sea exactamente igual que el que puedan expresar en timo, aunque esta hipótesis no se puede comprobar con las muestras que se obtienen de los pacientes rutinariamente.

La expresión de un receptor cualquiera de quemoquina no implica capacidad de localizarse en un órgano específico, a no ser que dicho órgano produzca el ligando específico. Por eso en este trabajo, tan importante ha sido conocer el perfil de expresión de los receptores como los niveles de ligandos en el órgano diana de interés, el SNC. En los 84 LCR analizados al diagnóstico, nuestros resultados mostraron que la expresión de los ligandos de quemoquinas analizados fue variada, sin ningún patrón asociado a linaje, riesgo o estadio madurativo de los blastos. En los LCR analizados se encontraron concentraciones muy elevadas de CXCL9, CXCL10 (ligandos de CXCR3), SDF1 α (ligando de CXCR4) y CCL1 (ligando de CCR8). No se conocen los niveles de quemoquinas en los LCR de humanos sanos, por lo que no podemos saber si nuestros hallazgos están o no influidos por la presencia de leucemia en los pacientes.

No encontramos ninguna asociación entre los niveles de quemoquinas en el LCR y la presencia de blastos en el SNC. Es probable que el proceso de infiltración leucémica del SNC no dependa únicamente de los niveles de quemoquinas como se comenta más adelante, tampoco encontramos asociación entre infiltración leptomeníngea y expresión de receptores de quemoquinas por las leucemias.

Algunos autores ya han descrito la implicación en el tráfico de células inmunes hacia el SNC de quemoquinas como CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en la célula T en procesos virales (Muse M y col., 2008), y CXCL12 está expresado en el SNC por células endoteliales en casos de esclerosis múltiple (McCandless EE y col., 2006) pero no hemos encontrado publicaciones que relacionen alguna quemoquina con el movimiento de células blásticas humanas de LLA hacia el SNC. En nuestros resultados la concentración de CXCL9 fue mayor en las LLA-T que en las LLA-B pero la diferencia no fue estadísticamente significativa; por otro lado, en las LLA-T de RI las concentraciones de CXCL9 y CXCL10 fueron mayores que en las de RA pero la diferencia tampoco fue estadísticamente significativa.

En otras neoplasias la expresión de quemoquinas se ha relacionado con la infiltración de los leucocitos en el tumor y la progresión del tumor. Es el caso de la enfermedad de Hodgkin, cuyas células expresan CCL17, CCL11, CCL22, CXCL10, CXCL9, CCL2, CCL3, CCL5 y CXCL1 (Skinnider y Mak, 2002). Células cancerosas de mama expresan CCL2 y CCL5 (Saji y col., 2001) y se ha asociado a peor pronóstico. También existen controversias en este caso, ya que niveles altos de CCL2 en suero en pacientes con cáncer de páncreas fueron asociados a buen pronóstico (Monti y colaboradores, 2003).

La interacción de las quemoquinas con sus receptores participa también en procesos de angiogénesis y metástasis según describieron H. Kulbe y colaboradores en 2004. Las células tumorales expresan receptores de quemoquinas (CCR y CXCR) mientras sus ligandos se producen en los órganos diana de las metástasis. La interacción de receptores y ligandos representa una de las bases moleculares que explica la localización anatómica preferente de las metástasis tumorales. Las quemoquinas se han implicado en las metástasis de tumores en órganos específicos. La asociación entre quemoquinas y metástasis no significa necesariamente que la expresión de los receptores específicos sea una alteración genética del tumor, sino

que las células tumorales que expresan dichos receptores se aprovechan de la función natural de los ejes receptores de quemoquinas-ligandos (concepto descrito por Zlotnik y col.,2011). En condiciones normales algunas quemoquinas dirigen las células a localizaciones específicas donde sus ligandos son expresados, como es el caso de CCR10/CCL27 en la piel, CCR9/CCL25 en el intestino delgado, CCR7/CCL19, CCL21 y CXCR5/CXCL13 en tejido linfóide secundario, y CXCR4/CXCL12 en la médula ósea. Según la propuesta de Zlotnik, aquellas células tumorales que expresan naturalmente estos receptores, tendrán preferencia por asentarse en los órganos apuntados.

Muchos autores ya han relacionado la localización específica de la metástasis de tumores con la expresión de receptores de quemoquinas (ver tabla siguiente), siendo la metástasis el factor que más limita la supervivencia en los pacientes con cáncer.

TIPO DE TUMOR	RECEPTORES DE QUEMOQUINAS	REF BIBLIOGRAFICA
cáncer de mama	CXCR4,CCR7	Li, Y.M.y col,2004
cáncer de ovario	CXCR4	Kajiyama, H y col,2008
cáncer de prostata	CXCR4	Akashi,T y col,2008
cáncer de pancreas	CXCR4	Liang, J.J y col, 2010
melanoma	CXCR4, CCR11,CCR7,CCR9	Franco, R. y col,2010
cáncer esofágico	CXCR4	Ding, Y, y col,2003
cáncer de pulmón	CXCR4, CCR7	Takanami,I, 2003
cáncer de cabeza y cuello	CXCR4, CCR7, CXCR5	Muller, A. y col, 2006
cáncer de vejiga	CXCR4	Eisenhardt,A. y col, 2005
cáncer colorectal	CXCR4, CCR7	Kim,J. y col, 2006
osteosarcoma	CXCR4	Oda, Y. y col, 2006
neuroblastoma	CXCR4	Russel, H.y col, 2004
leucemia linfoblástica aguda	CXCR4, CXCR3	Wu,S. y col, 2006
leucemia linfocítica crónica	CXCR4, CCR7	Alfons-Perez, M. y col, 2006
cáncer de estomago	CXCR4, CCR7	Mashino, K. y col, 2006
linfoma no Hodgkin	CCR7	Yang,J. y col, 2011
leucemia de célula T	CCR7	Buonamici, S. y col, 2009

Tabla obtenida de Zlotnik A. y col., 2011.

La presencia de enfermedad leucémica en el SNC es un proceso complejo que depende de muchos factores. Nuestros estudios de asociación estadística para ver si había diferente perfil de receptores de quemoquinas según infiltración o no del SNC (presencia de blastos analizados por CMF) no encontraron asociación significativa con ningún perfil concreto. Debido al número tan escaso de recaídas que sucedieron en la muestra de niños analizados en el momento del diagnóstico, tampoco se pudo

encontrar un perfil que pudiese predecir una recaída posterior. Sin embargo, es interesante destacar que, en aquellos tres casos en los que pudimos analizar las muestras del diagnóstico y la de la recaída, encontramos un incremento en los niveles de expresión de casi todos los receptores.

3. Receptores de quemoquinas y ligandos en LLA en la recaída en MO y en el SNC.

Estudiamos también si existía alguna asociación entre las variables descritas (expresión de receptores y niveles de ligandos) y la recaída leucémica en la LLA. La situación clínica de la recaída tiene un sustrato biológico diferente a la infiltración, puesto que la recaída demuestra una infiltración y además una resistencia a la quimioterapia.

En nuestros resultados no hemos encontrado que la infiltración ni la recaída se asocie a una única molécula, sino que hemos identificado varias, reflejando seguramente la complejidad que supone la infiltración de los órganos diana. Es el caso de CCR1, CCR3, CCR5, CCR7, CCR8, CXCR1 y CXCR3, receptores expresados a niveles significativamente mayores en el grupo de las recaídas totales, medulares y extramedulares ($p < 0.05$). También en las recaídas medulares CXCR5, CXCR3 y CCR5 estaban expresados a niveles significativamente mayores en el grupo de las recaídas ($p < 0.05$) en las LLA-T.

CXCR5 se encontró asociado a la recaída en MO en las LLA-T; es posible que la expresión de esta molécula confiera a cualquier célula la preferencia por asentarse en la MO. Ya otros autores han asociado CXCR5 con la localización en la MO de células metastásicas del neuroblastoma (Airoldi I. y col, 2008). No hemos encontrado publicaciones que relacionen otros receptores de quemoquinas con la recaída en MO de la enfermedad tumoral.

En la LLA infantil existen escasas publicaciones que relacionen algún receptor de quemoquina con la recaída en MO de esta enfermedad. En 2006, Shuling Wu y colaboradores realizaron un estudio en 100 casos de LLA B en recaída. Analizaron la expresión de IL-8, CXCR3 y CXCR4 por RT-PCR y encontraron el receptor CXCR4 asociado a la recaída. En nuestros resultados, CXCR4 se encuentra elevado en MO de niños con LLA pero no asociado a la recaída. Los distintos resultados encontrados

por Wu y los nuestros pueden ser debidos a la diferente metodología a la hora de cuantificar los receptores y al diferente número de casos de recaída (n=100 y n=15 en nuestro caso).

Encontramos en nuestros resultados que el perfil de receptores asociados a recaída fue más rico en las LLA-T que en las LLA-B. CCR5 Y CCR8 estaban implicados en las recaídas de LLA-T y LLA-B, pero en las LLA-T, además CCR3, CCR6 y CXCR3. En el caso de recaídas medulares podría deberse a la diferente biología de ambas leucemias. La LLA-B se origina en la MO, y la recaída podría compararse a una recaída local de un tumor primario. Por su parte, la LLA-T se origina en el timo y la recaída medular supone una localización metastásica.

En cuanto a las recaídas del SNC (extramedular), nuestra hipótesis de trabajo fue que las células tumorales expresan receptores de quemoquinas mientras que sus ligandos se producen en los órganos diana de las metástasis. Por tanto la interacción receptor-ligando puede explicar la localización metastásica de los tumores y en nuestro caso la localización y/o recaída de la LLA en el SNC. Un estudio de Nicola E. Annels y colaboradores en 2004 sobre 11 pacientes pediátricos con LLA-T encontró en un paciente con recaída extramedular, alta expresión de CCR9 en los blastos, y de su ligando CCL25 en el intestino, que fue la localización de la recaída.

En nuestros resultados, dentro de las LLA-T se encontró expresión significativamente elevada de los receptores CCR3, CCR5 y CCR7 en los blastos de LLA en recaída en SNC, pero sin aumento en la expresión de sus ligandos correspondientes en las muestras de LCR. Estos resultados sugieren que estas moléculas tienen un papel en el proceso. La producción de los ligandos puede ser un fenómeno muy local, que no tenga repercusión en la muestra de LCR estudiada. La ausencia de asociación entre niveles elevados de receptor y de ligando en los casos apuntados, se podría explicar por este hecho. Una situación comparable sucede con el ligando de CCR6 en la EM, el cual se produce localmente en los plexos coroideos, lugar por donde entran los CD4+ patogénicos (Reboldi A y col., 2009; Villares R. y col., 2009).

Wilson y colaboradores en 2010 describen la implicación de las quemoquinas en el tráfico de las células inmunes en el SNC. Algunas moléculas de adhesión y sus ligandos, identificadas en el SNC, podían ser específicas de inflamación neuronal.

Por ejemplo, los receptores de quemoquinas CCR6, CCR7 y sus ligandos CXCL20 y CXCL19 intervienen en el tráfico de los leucocitos desde el capilar sanguíneo hasta las meninges en presencia de virus, bacterias y algunos parásitos (Malipiero U y col., 2006) (Mahadevan A y col., 2007).

En nuestros resultados, CCR7 está asociado a la recaída en el SNC, mientras que CCR6 presentó una asociación casi significativa para la recaída en SNC en LLA-T. Estos resultados sugieren que la LLA puede utilizar estas moléculas, ya descritas en otras situaciones patológicas, en las que los leucocitos activamente cruzan la BHE en el contexto de inflamación.

CCR7 es el único receptor de quemoquina que se ha asociado a la infiltración leucémica del SNC en LLA-T. El laboratorio del Dr Aifantis en 2009, en un modelo exclusivamente murino, usando técnicas de bioluminiscencia, histoquímica y modelos de manipulación genética describió como la expresión de CCR7 fue un regulador esencial y una señal de adhesión requerida en la infiltración del SNC por células de LLA-T. Más aún, la inhibición de la expresión de CCR7 o de su ligando, CCL19, resultaron en la eliminación específica de la infiltración del SNC. En este trabajo no se plantearon modelos de recaída post-tratamiento.

En cuanto al receptor CCR8 y el SNC, algunos autores (Jurgen Haas y col., 2008) encuentran expresado este receptor en células T reguladoras en casos de meningitis carcinomatosa. Nosotros lo encontramos elevado de forma significativa en las recaídas del SNC, pero no su ligando. Como se ha comentado en el apartado de material y métodos, la cuantificación de algunos ligandos no se pudo realizar en todos los casos por motivos técnicos, siendo el ligando de CCR8 uno de estos casos. No podemos descartar la posibilidad de que el eje CCR8-CCL1 esté activo en los casos de recaída leucémica del SNC.

En cuanto al receptor CCR5 y sus ligandos, Ubogu EE. y colaboradores en 2006 describieron su implicación en el movimiento de células inmunes hacia el SNC. Otros autores lo han asociado a la migración de los linfocitos T al LCR de pacientes con esclerosis múltiple (Dos Santos AC y col., 2005). En nuestros resultados los receptores CCR5 y CCR8 estuvieron implicados en la recaída leucémica, independientemente del fenotipo (T o B).

Otras quemoquinas y sus receptores como CXCR3, CXCR4, CXCL10 y CXCL12 están involucrados en el paso de los leucocitos desde las meninges hasta el parénquima cerebral a través de las células de la glía. También describen algunos autores (Muller y col., 2007) la migración celular dependiente de CXCR3 al SNC en encefalomiелitis viral. Sporici y colaboradores en 2010 describieron que CXCR3 interviene en la migración de células T al SNC en pacientes con esclerosis múltiple.

Nuestros resultados mostraron una asociación significativa únicamente en el caso de CXCR3 y CXCL10. Por tanto, encontramos que el eje CXCR3/CXCL10 puede estar implicado en la recaída del SNC en LLA-T, algo no descrito hasta el momento en la LLA. Los resultados están en consonancia con autores que relacionan receptores de quemoquinas con infiltración inmune del SNC (Wilson EH y col., 2010), y con lo descrito por Zlotnit y colaboradores en 2011: en la metástasis, las células tumorales deben responder primero a señales quemoquóticas, y después deben sobrevivir en ese lugar. Las quemoquinas participan en ambos procesos.

La identificación de todos los receptores mencionados asociados a la recaída leptomenígea en nuestros pacientes, además de CXCL10, sugiere que la recaída leucémica y la infiltración en el SNC son dos procesos que comparten mecanismos similares. Aquellas células que expresan un perfil adecuado de moléculas de adhesión podrán acceder al SNC, independientemente de la naturaleza de dichas células, sea neoplásica o sea inmune.

4. Papel del eje CXCR3/CXCL10 en recaída de LLA en SNC.

CXCR3-CXCL10 es un eje ya implicado en otra patología del SNC: encefalitis (Muller y col., 2007). El eje CXCR3/CXCL10 ha sido ya implicado en el reclutamiento de los linfocitos T en encefalitis. La producción de CXCL10 en esta patología, se adjudica a los astrocitos de la glía y a las neuronas (Mc Kimmie CS. y col., 2010). Este hecho explicaría que en la LLA los blastos no sólo infiltrasen las meninges, sino que llegasen hasta el parénquima cerebral. De esta manera, las células tumorales en la LLA se pueden localizar en áreas donde la quimioterapia no alcanza niveles adecuados. En nuestro caso, CXCL10 no fue producido principalmente por los blastos leucémicos. En nuestros resultados de RT-PCR la mayoría de las muestras de pacientes y líneas tumorales no expresaban CXCL10, y de aquellos pacientes en los

que se detectó RNAm de CXCL10 no se evidenciaron niveles más altos de la proteína en el LCR. A la vista de los resultados de nuestro laboratorio, hay que asumir que los altos niveles de CXCL10 detectados en las muestras de LCR provenían de células residentes en el SNC. En nuestro caso, las LLA parecen aprovechar una situación no específica de ellas, sino de un tipo de respuesta del SNC a agresiones. En un único paciente con LLA-T en el que se pudo estudiar el LCR al diagnóstico y en la recaída encontramos niveles de CXCL10, más elevados en la recaída.

Para comprobar que el eje CXCR3-CXCL10 tenía implicación funcional en las LLA, se llevaron a cabo experimentos en modelos *in vitro* de quimotaxis. Con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, comprobamos la inducción de quimotaxis mediada por CXCL10 tanto en líneas celulares, como en muestras primarias. Estos resultados demostraron que CXCR3-CXCL10 cumplía el primer criterio que habíamos adjudicado al concepto de santuario. El SNC actúa para aislar a la LLA del exterior, impidiendo que se alcancen niveles adecuados de quimioterapia. Resultados similares a los nuestros, pero referidos a otra quemoquina, han sido publicados por Stephen y colaboradores, que en 2011 describieron la contribución de CXCL12 a la migración de células de LLA de líneas celulares mediante ensayos de quimotaxis. Este papel de CXCL10 como inductor de quimotaxis en las LLA es hasta cierto punto esperable, dada la amplia literatura que existe implicando a esta (y demás quemoquinas) en el tráfico de diferentes células por el organismo.

Comprobamos además, mediante ensayos de viabilidad con líneas celulares, que CXCL10 protege a la LLA de la agresión que supone la quimioterapia funcionando como un factor de resistencia a la apoptosis. Estos resultados suponen la prueba del segundo criterio de santuario: el SNC aporta a la LLA señales para protegerse de la quimioterapia.

Hasta la fecha, los datos acerca de la posible relación de CXCL10 y la supervivencia y/o la apoptosis celular son controvertidos. CXCL10 se ha implicado en la muerte de algunas estirpes celulares, como neuronas (Sui y col, 2004) o células acinares pancreáticas (Singh y col., 2010). Otros autores han encontrado que CXCL10 puede estar implicado en la supervivencia de células neoplásicas (Giuliani y col., 2006). Nuestros resultados van en la línea de que CXCL10, en determinadas circunstancias, pudiera comportarse como una quemoquina homeostática, con una

función protectora. Esta función ha sido descrita para otras quemoquinas en la homeostasis de diversos órganos (Hérendez-López y col., 2002; Zlotnik y col., 2011), pero no para CXCL10. En el campo de las leucemias, Stephen y colaboradores en 2011 estudiaron las interacciones a través de CXCL12/CXCR4 entre células de LLA (líneas celulares y muestras primarias) y tres tipos celulares presentes en el espacio subaracnoideo y parénquima (astrocitos, células de los plexos coroideos y células de las meninges). Estos tipos celulares protegían de la apoptosis a las células leucémicas de la apoptosis inducida por la quimioterapia, mejorando su viabilidad (Akers SM. Y col., 2011). Este efecto protector no se adscribió a ninguna molécula en particular en el estudio de Stephen y colaboradores. Sería interesante comprobar si alguna de esas líneas celulares ejerce su acción protectora por medio de CXCL10.

A la vista de estos resultados, proponemos que el eje CXCR3-CXCL10 es una explicación molecular a los dos conceptos de santuario. Por un lado, sirve para aislar a la LLA del exterior a la BHE, en su vertiente quimotáctica. Por otro lado, es una molécula producida por el ambiente del SNC, que confiere resistencia a la quimioterapia. De esta manera, una sola molécula, CXCL10, permite que las LLA que expresen niveles altos de CXCR3, se aprovechen del santuario que es el órgano que la produce.

5. Implicaciones traslacionales

La inhibición específica de este eje podría resultar en un tratamiento para un subgrupo de pacientes que actualmente tienen muy mal pronóstico. Existen inhibidores específicos que merece la pena probar en modelos preclínicos (Jonhson y col., 2007; Baba y col., 1999). El potencial de estas moléculas como drogas antagonistas anti-CXCR3 ya se ha evaluado tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de enfermedades inmunes y neoplásicas, e incluso existe una primera experiencia en humanos (Tonn y col., 2009).

Por otro lado, sería importante estudiar la posible implicación de este eje en las metástasis cerebrales de otros tumores, linfomas, carcinomas, neuroblastomas, puesto que son enfermedades de muy mal pronóstico. Es posible que otras células tumorales aprovechen en su beneficio, un mecanismo propio de la respuesta del SNC frente a agresiones de origen diverso.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Hemos encontrado una expresión variada de receptores de quemoquinas por los blastos leucémicos, en muestras de leucemia linfoblástica aguda infantil, que no se asoció a linaje, estadio madurativo o riesgo de recaída.
2. Hemos encontrado cantidades variadas de quemoquinas en el líquido cefalorraquídeo de niños con LLA al diagnóstico, que no se asoció a linaje, estadio madurativo o riesgo de recaída.
3. No hemos detectado un perfil específico de expresión de receptores o de cantidad de quemoquinas en el LCR, asociado a infiltración del sistema nervioso central.
4. En el momento del diagnóstico, no se identificó ningún perfil de expresión de receptores que predijese la recaída posterior.
5. Los casos de recaída medular presentaron una expresión significativamente elevada de CCR5, CCR7 y CCR8.
6. Los casos de recaída en SNC presentaron una expresión significativamente elevada de CCR1, CCR3, CCR5, CCR7, CCR8 y CXCR3-CXCL10.
7. El eje CXCR3-CXCL10 tiene un papel inductor de quemotaxis y de protección contra la quimioterapia en la LLA-T, que se asocia a recaída en el SNC. Cumple pues los criterios exigidos para participar en el santuario leucémico en ese órgano.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Akashi T, et al. 2008. Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastasis prostate cancer. *Cancer Sci.* 99, 539-542.

Akers SM, Rellick SL, Fortney JE, Gibson LF. 2011. Cellular elements of the subarachnoid space promote ALL survival during chemotherapy. *Leuk Res.* 35, 705-11.

Aifantis I, Raetz E, & Buonamici S, 2008. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nature Rev. Immunol.* 8, 380-390.

Airoldi I, Cocco C, Morandi F, Prigione I, Pistoia V. 2008. CXCR5 may be involved in the attraction of human metastatic neuroblastoma cells to the bone marrow. *Cancer Immunol Immunother.* 57, 541-8.

Ambrosini E, and Aloisi F, 2004. Chemokines and glial cells: a comple network in the central nervous system. *Neurochem. Res.* 29, 1017-1038.

Annels NE, Willemze AJ, van der Velden VH, Faaij CM, van Wering E, Sie-Go DM, Egeler RM, van Tol MJ, Revesz T. 2004. Possible link between unique chemokine and homing receptor expression at diagnosis and relapse location in a patient with childhood T-ALL. *Blood.* 103, 2806-8.

Asencio VC, Campbell IL, 1999. Chemokines in the CNS, plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci.* 22, 504-512.

Aur RJ, Simone J, Hustu HO, Walters T, Borellia L, Pratt C, Pinkel D. 1971. Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia. *Blood.* 37, 272-81.

Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, Shiraishi M, Aramaki Y, Okonogi K, Ogawa Y, Meguro K, Fujino M. 1999. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96,5698-703.

Bacon K.B. and Harrison J.K. 2000. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J. Neuroimmunol.* 104, 92-97.

Bagaeva L, Rao P, Powers J, Segal B, 2006. CXC chemokine ligand 13 plays a role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 176, 7676-7685.

Bajetto A, Bonavia R, Barbero S and Schettini G. 2002. Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J. Neurochem.* 82, 1311- 1329.

Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. 1999. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 6873–6878.

Balkwill F, 2004. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Nature Cancer Reviews*, in press.

Benne MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. 1995 Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 9, 1783-6.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 33, 451-8.

Biber K, Zuurman M W, Dijkstra I M. and Boddeke H.W. 2002. Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2, 63–68.

Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. 2000. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 96,24-33.

Bowman EP, Campbell JJ, Soler D, et al. 2000. Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. *The Journal of Experimental Medicine.* 191, 1303 – 1318.

Bührer C, Hartmann R, Fengler R, Dopfer R, Gadner H, Gereein V, Göbel U, Reiter A, Ritter J, Henze G. 1993. Superior prognosis in combined compared to isolated bone marrow relapses in salvage therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 21, 470-6.

Bunting MD, Comerford I, and McColl SR. 2011. Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus. *Immunology and Cell Biology.* 89, 185-196.

Buonamici S, Trimarchi T, Ruocco M, Reavie L, Cathelin S, Mar B, Klinakis A, Lukyanov Y, Tseng J, Sen F, Gehrie E, Li M, Newcomb E, Zavadil J, Meruelo D, Lipp M, Ibrahim S, Efstratiadis A, Zagzag D, Bromberg J, Dustin M., Aifantis I, 2009. CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature* 459, 1000–1004.

Burger JA, Burger M and Kipps TJ. 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 M, Glodek A, Hartmann T, schmitt-graff A, Silberstein LE, Fujii N, Kipps TJ and Burger JA. 2003. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung

cancer cells mediates migration, integrin activation and adhesion to stromal cells. *Oncogene*, 22: 8093-8101.

Cardona M, Liu L, Savarin C, & Ransohoff RM. 2008. Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 84, 587-594.

Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M and Krause KH. 2004. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48, 16-42.

Charo IF, Ransohoff RM. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354, 610-621.

Christensen JE, et al. 2004. Efficient T-cell surveillance of the CNS requires expression of the CXC chemokine receptor 3. *J Neurosci.* 24, 4849-4858.

Corcione A, Arduino N, Ferretti E, Pistorio A, Spinelli M, Ottonello L, Dallegri F, Basso G, Pistoia V. 2006. Chemokine receptor expression and function in childhood acute lymphoblastic leukemia of B-lineage. *Leukemia Research* 30, 365-372.

Crazzolaro R, Kreczy A, Mann G, Heitger A, Eibl G, Fink FM, Mohle R, Meister B. 2001. High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 115, 545-53.

Cyster J, 1999. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 189, 447-450.

DeVries ME, Kelvin AA, Xu L, Ran L, Robinson J, Kelvin DJ. 2006. Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. *J Immunol.* 176, 401-415.

Dos Santos AC, Barsante MM, Arantes RM, Bernard CC, Teixeira MM, Carvalho-Tavares J. 2005. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis--an intravital microscopy study. *J Neuroimmunol.* 162, 122-129.

Ding Y. et al. 2003. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 9, 3406-3412.

Ebnet K, and Vestweber D. 1999. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol*, 112, 1- 23.

Eisenhardt A. et al. 2005. Expression analysis and potential functional role of the CXCR4 chemokine receptor in bladder cancer. *Eur. Urol.* 47, 111-1178.

- Entschladen F, Drell TL 4th, Lang K, Joseph J, Zaenker KS. 2005. Neurotransmitters and chemokines regulate tumor cell migration: potential for a new pharmacological approach to inhibit invasion and metastasis development. *Curr Pharm.* 11, 403-11.
- Ernst P, Wang J, Korsmeyer SJ. 2002. The role of MLL in hematopoiesis and leukemia. *Curr Opin Hematol.* 9, 282-7.
- Ferrando AA, Look AT. 2003. Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 40, 274-80.
- Forster R, Davalos-Misnitz AC. & Rot A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Rev. Immunol.* 8, 362-371.
- Franco R. et al. 2010. Histomorphologic parameters and CXCR4 mRNA and protein expression in sentinel node melanoma metastasis are correlated to clinical outcome. *Cancer Biol. Ther.* 9, 423-429.
- Geminder H, Sagi-assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP. and Ben-baruch A, 2001. A Possible Role for CXCR4 and Its Ligand, the CXC Chemokine Stromal Cell-Derived Factor-1, in the Development of Bone Marrow Metastases in Neuroblastoma. *J Immunol*, 167, 4747-4757.
- Gilliland DG, Tallman MS. 2002. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell.* 1, 417-20.
- Giuliani N, Bonomini S, Romagnani P, Lazzaretti M, Morandi F, Colla S, Tagliaferri S, Lasagni L, Annunziato F, Crugnola M, Rizzoli V. 2006. CXCR3 and its binding chemokines in myeloma cells: expression of isoforms and potential relationships with myeloma cell proliferation and survival. *Haematologica.* 91, 1489-97.
- Giunti D. et al. 2003. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J. Leukoc. Biol.* 73, 584-590.
- Glass WG, Lim JK, Cholera R, Pletnev AG, Gao JL, Murphy PM. 2005. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med.* 202, 1087-1098.
- Greves M. 2005. In utero origins of childhood leukaemia. *Early Hum Dev.* 81, 123-9.
- Haas AH, van Weering HR, de Jong EK, Boddeke HW and Biber KP. 2007. Neuronal chemokines: versatile messengers in central nervous system cell interaction. *Mol. Neurobiol.* 36, 137- 151.
- Hass J, Schopp L, Storch-Hagenlocher B, Fritzsching B, Christian J, Milkova L, Fritz B, Schwars A, Suri-Payer E, Hensel M, Wildemann B. 2008. Specific recruitment of regulatory T cell into the CSF in lymphomatous and carcinomatous meningitis. *Blood.* Volume 111, number 2.

- Hesseltger J, and Horuk R. 1999. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J. Neurovirol.* 5, 13-26.
- Hasegawa H, Nomura T, Kohno M, Tateishi N, Suzuki Y, Maeda N, Fujisawa R, Yoshie O, Fujita S. 2000. Increased chemokine receptor CCR7/EBI1 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukemia cells. *Blood.* 95, 30-8.
- Hawkins BT, Davis TP. 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 57, 173-185.
- Hernández-López C, Varas A, Sacedón R, Jiménez E, Muñoz JJ, Zapata AG, Vicente A. 2002. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood.* 99, 546-54.
- Homey B, Muller A and Zlotnik A, 2002. Chemokines: Agents for the immunotherapy of cancer? *Nature Reviews* 2, 175-184.
- Hwang JH, Chung HK, Kim DW, Hwang ES, Suh JM, Kim H, You KH, Kwon OY, Ro HK, Jo DY, and Shong M, 2003. CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 408-416.
- Ishida T, Utsunomiya A, Iida S, Inagaki H, Takatsuka Y, Kusumoto S, Takeuchi G, Shimizu S, Ito M, Komatsu H, Wakita A, Eimoto T, Matsushima K, and UEDA R. 2003. Clinical significance of CCR4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma: its close association with skin involvement and unfavorable outcome. *Clin Cancer Res.* 9, 3625-3634.
- Johnson M, Li AR, Liu J, Fu Z, Zhu L, Miao S, Wang X, Xu Q, Huang A, Marcus A, Xu F, Ebsworth K, Sablan E, Danao J, Kumer J, Dairaghi D, Lawrence C, Sullivan T, Tonn G, Schall T, Collins T, Medina J. 2007. Discovery and optimization of a series of quinazolinone-derived antagonists of CXCR3. *Bioorg Med Chem Lett.* 17, 3339-43.
- Jones D, Benjamin RJ, Shahsafaei A, and Dorfman DM. 2000. The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 95, 627-632.
- Kajiyama H. et al. 2008. Involvement of SDF-1 α /CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* 122, 91-99.
- Kellerman S A , Hudak S , Oldham E R , Liu J and McEvoy, 1999. The CC chemokine receptor -7 ligands 6 Ckine and macrophage inflammatory protein 3 beta are potent chemoattractants for in vitro and in vivo derived dendritic cells. *J. Immunol.* 162, 3859-3864.

- Kim J, et al. 2006. Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. *Ann. Surg.* 244, 113-120.
- Kivisakk P, et al. 2003. Human cerebrospinal fluid central memory CD4⁺ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 8389-8394.
- Kivisakk P, et al. 2004. Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann. Neurol.* 55, 627-638.
- Kivisakk P, et al. 2002. T-cells in the cerebrospinal fluid express a similar repertoire of inflammatory chemokine receptors in the absence or presence of CNS inflammation: implications for CNS trafficking. *Clin Exp Immunol.* 129, 510-518.
- Klein RS, Lin E, Zhang B, Luster AD, Tollett J, Samuel MA, Engle M, and Diamond MS. 2005. Neuronal CXCL10 directs CD8⁺ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis. *J. Virol.* 79, 11457-11466.
- Kleinhans M, Tun-kyi A, Gilliet M, Kadin ME, Dummer R, Burg G, and Nestle FO, 2003. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in CD30⁺ cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 101, 1487-1493.
- Krueger A, Willenzon S, Lyszkiewicz M, Kremmer E, Forster R. 2010. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood* 115,1906-1912.
- Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, and Imamura M, 2000. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res.* 6, 3530-3535.
- Kulbe H, Levinson NR, Balkwill F, Wilson JL. 2004. The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement. *Int J Dev Biol.* 48, 489-96.
- Kuo AH, Yataganas X, Galicich JH, Fried J, Clarkson BD. 1975. Proliferative kinetics of central nervous system (SNC) leukemia. *Cancer.* 36, 232-9.
- Lalor SJ, Segal BM. 2010. Lymphoid chemokines in the CNS. *J Neurol* 224, 56-61.
- Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Assfalg G, Asemossen AM, Thiel E, Scheibenbogen C. 2004. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J Invest Dermatol.* 122, 685-90.
- Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J. 2004. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol.* 1, 95-104.

Liles, W. C. et al. 2003. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 102, 2728-2730.

Li YM, et al. 2004. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 6, 459-469.

Liang JJ, et al. 2010. High levels of expression of human stromal cell-derived factor-1 are associated with worse prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19, 2598-2604.

Luster A.D, 1998. Chemokines- chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl.J.Med.* 338, 436-445.

Ma X, Norsworthy K, Kundu N, Rodgers WH, Gimotty PA, Goloubeva O, Lipsky M, Li Y, Holt D, Fulton A. 2009. CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model. *Mol Cancer Ther.* 8, 490-8.

Mackay CR, 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2, 95-101.

Madero L, Lassaleta A, 2006. Manual de hematología pediátrica, capítulo 13, 159-170.

Mahadevan A, et al. 2007. Characterization of human immunodeficiency virus (HIV) infected cells in infiltrates associated with CNS opportunistic infections in patients with HIV clade C infection. *J Neuropathol Exp Neurol.* 66, 799 808.

Malipiero U, et al. 2006. TGFbeta receptor II gene deletion in leucocytes prevents cerebral vasculitis in bacterial meningitis. *Brain.* 129, 2404-2415.

Mantovani A, 1999. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* 20, 254-257.

Marek Honczarenko, Yi Le, Aleksandra M. Glodek, Marcin Majka, James J. Campbell, Mariusz Z. Ratajczak and Leslie E. Silberstein. 2002. CCR5-binding chemokines modulate CXCL12 (SDF-1)-induced responses of progenitor B cells in human bone marrow through heterologous desensitization of the CXCR4 chemokine receptor *Blood.* 100, 2321-2329.

Martinez C. 2011. Estudio de la infiltración del Sistema Nervioso Central en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda y papel de BMP4.

Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F , Ohta M, Shibuta K, Inoue H. and Mori M, 2002. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res.* 62, 2937-2941.

- Mc Candless EE, Wang Q, Woerner BM, Harper JM, Klein RS. 2006. CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 177, 8053–8064.
- Mc Kimmie CS, Graham GJ, 2010. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394 , 1006–1011.
- Monti P, Leone BE, Marchesi F, Balzano G, Zerbi A, Scaltrini F, Pasquali C, Calori G, Pessi F, Sperti C, Di carlo V, Allavena P, and Piemonti L, 2003. The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. *Cancer Res.* 63, 7451-7461.
- Müller G, Lipp M, 2003. Shaping up adaptive immunity: the impact of CCR7 and CXCR5 on lymphocyte trafficking. *Microcirculation* 10, 325–334.
- Muller M, et al. 2007. CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol.*179, 2774–2786.
- Muller A, et al. 2006. Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastasis spread and regulation during chemotherapy. *Int. J. Cancer* 118, 2147-2157.
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan M, McClanahan T, Murphy E, Yuan Y, Wagner S, et al. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 410, 50-56.
- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. 2007. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 446, 758-64.
- Murphy PM. 2001. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med.* 345, 833-5.
- Muse M, Kane JA, Carr DJ, Farber JM, Lane TE. 2008. Insertion of the CXC chemokine ligand 9 (CXCL9) into the mouse hepatitis virus genome results in protection from viral-induced encephalitis and hepatitis. *Virology.*382, 132–144.
- Oda Y, et al. 2006. CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis. *Mod. Pathol.* 19,738-745.
- Look AT. 1997. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science.* 278, 1059-64.

- Love PE, Bhandoola A. 2011. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat Rev Immunology*.11, 469-77.
- Pui CH, behm FG, Crist WM. 1993. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 82, 343-62.
- Pui CH.2001. Risk assessment in acute lymphoblastic leukemia: beyond leukemia cell characteristics. *J Pediatr Hematol Oncol*. 23, 405-8.
- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. 2011. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*.29, 551-65.
- Pui CH, Relling MV, Downing JR. 2004. Acute lymphoblastic leukemia. *Engl J Med* 350, 1535-1548.
- Pui CH, Campana D. 2000. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 14, 784-785.
- Pui CH, & Howard SC. 2008. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol*. 9, 257-268.
- Pui CH, & Evans WE. 2006. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med*. 354, 166-178.
- Ragozzino D. 2002. CXC chemokine receptors in the central nervous system: role in cerebellar neuromodulation and development. *J. Neurovirol*. 8, 559-572.
- Rappert A, Bechmann I, Pivneva T. et al. 2004. CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J. Neurosci*. 24, 8500-8509.
- Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, and Sallusto F. 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol*. 10, 514-523.
- Rempel SA, Dudas S, GE S, and Gutierrez JA, 2000. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 6, 102-111.
- Robledo MM, Bartolome RA, Longo N, Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Longo I, Van Muijen GN, Sanchez-Mateos P. and Teixido J, 2001. Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J Biol Chem*. 24, 24.
- Rossi D. and Zlotnik A. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol*. 18, 217-242.

Rubie C, Frick VO, Ghadjar P, Wagner M, Grimm H, Vicinus B, Justinger C, Graeber S, Schilling MK. 2010. CCL20/CCR6 expression profile in pancreatic cancer. *J Transl Med.* 10,8-45.

Rubnitz JE, Pui CH. 2003. Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Treat Rev.* 29, 31-44.

Russell HV, Hicks J, Okcu MF, AND Nuchtern JG. 2004. CXCR4 Expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases. *J. Pediatr. Surg.* 39,1506-1511.

Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K. and Toi M, 2001. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer.* 92, 1085-1091.

Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KE, Machtens S, Mengel M, Probst-Kepper M, Franzke A, Wollensak T, Gatzlaff P, Atzpodien J, Buer J. and Lauber J, 2002. CXCR4/ CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer.* 86, 1250-1256.

Schwarz, B.A. et al. 2007. Selective thymus settling regulated by cytokine and chemokine receptors, *J Immunol.* 178, 2208-2017.

Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G. and Balkwill FR, 2001. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 61, 4961-4965.

Singh L, Arora SK, Bakshi DK, Majumdar S, Wig JD. 2010. Potential role of CXCL10 in the induction of cell injury and mitochondrial dysfunction. *Int J Exp Pathol.* 91,210-23.

Smith J, Braziel R, Paoletti S, Lipp M, Uguccioni M, Rosenbaum J, 2003. Expression of B-cell-attracting chemokine 1 (CXCL13) by malignant lymphocytes and vascular endothelium in primary central nervous system lymphoma. *Blood* 101, 815-821.

Sorensen TL, et al. 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest.* 103, 807-815.

Speck NA, Gilliland DG. 2002. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 2, 502-13.

Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Patterson B, Trumper L, Kapp U. and Mak TW, 2002. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 618-626.

Skinnider BF, and Mak TW, 2002. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 4283-4297.

Sui Y, Potula R, Dhillon N, Pinson D, Li S, Nath A, Anderson C, Turchan J, Kolson D, Narayan O, Buch S. 2004. Neuronal apoptosis is mediated by CXCL10 overexpression in simian human immunodeficiency virus encephalitis. *Am J Pathol.* 164, 1557-66.

Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, and Mccauley L. K, 2002. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* 62, 1832-1837.

Takanami I, 2003. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J. Cancer* 105, 186-189.

Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, Yamamoto N, Otaka A, and Fujii N. 2003. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett.* 550, 79-83.

Tonn GR, Wong SG, Wong SC, Johnson MG, Ma J, Cho R, Floren LC, Kersey K, Berry K, Marcus AP, Wang X, Van Lengerich B, Medina JC, Pearson PG, Wong BK. 2009. An inhibitory metabolite leads to dose- and time-dependent pharmacokinetics of (R)-N-{1-[3-(4-ethoxy-phenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidin-2-yl]-ethyl}-N-pyridin-3-yl-methyl-2-(4-trifluoromethoxy-phenyl)-acetamide (AMG 487) in human subjects after multiple dosing. *Drug Metab Dispos.* 37,502-13.

Trentin L, Agostini C, Facco M, et al. 1999. The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J. Clin. Invest.* 104, 115 - 121.

Tun H, Personett D, Baskerville K, Menke D, Jaeckle K, Kreinest P, Edenfield, B, Zubair A, O'Neill B, Lai W, Park P, McKinney M, 2008. Pathway analysis of primary central nervous system lymphoma. *Blood* 111, 3200-3210.

Ubogu EE, Callahan MK, Tucky BH, Ransohoff RM. 2006. CCR5 expression on monocytes and T cells: Modulation by transmigration across the blood-brain barrier in vitro. *Cellular Immunology* 243, 19-29.

Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. 2008. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 267, 226-44.

Villares R, et al. 2009. CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues. *Eur J Immunol.* 39,1671-1681.

Vinet J, et al. 2010. Expression of CXCL10 in cultured cortical neurons. *J*

Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. 2010. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest.* 120, 1368-79.

- Wilson EH, et al. 2009. Behavior of parasite-specific effector CD8⁺ T cells in the brain and visualization of a kinesis-associated system of reticular fibers. *Immunity*. 30, 300–311.
- Wong SWJ, Fulcher DA. 2004. Chemokine Receptor Expression in B-cell Lymphoproliferative Disorders. *Leukemia & Lymphoma*. 45 , 2491–2496.
- Wu, S. et al. 2006. Chemokine IL-8 and chemokine receptor CXCR3 and CXCR4 gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia at first relapse. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 28, 216-220.
- Yang J, Wang S, Zhao G and Sun B. 2011. Effect of chemokine receptors CCR7 on disseminated behaviour of human T cell lymphoma: clinical and experimental study. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30, 51.
- Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. 2001. Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 2001, 78:57-110.
- Zeelenberg IS, ruuls-van stalle L. and Roos E, 2003. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res.* 63, 3833-3839.
- Zhou J, Stohlman SA, Hinton DR, Marten NW. 2003. Neutrophils promote mononuclear cell infiltration during viral-induced encephalitis. *J Immunol.* 170, 3331-3336.
- Zhang B, Chan YK, Lu B, Diamond MS, Klein RS. 2008. CXCR3 mediates region-specific antiviral T cell trafficking within the central nervous system during West Nile virus encephalitis. *J Immunol.* 180, 2641–2649.
- Zingoni A, Soto H, Hedrick JA, Stoppacciaro A, Storlazzi CT, Sinigaglia F, D'Ambrosio D, O'Garra A, Robinson D, Rocchi M, et al. 1998. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol.* 161, 547-551.
- Zlotnik A. 2004. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol.* 14, 181-185.
- Zlotoff DA. et al. 2010. CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. *Blood* 115, 1897-1905.
- Zlotnik A, Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12,121-127.
- Zlotnik A, Yoshie O and Nomiyama, H. 2006. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 7, 243.

Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. 2011. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol.* 11, 597-606.

Zou Y, Kottmann A, Kuroda M, Taniuchi I, Littman D. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and incerebellar development. *Nature.* 393,595-599.