

Universidad Autónoma de Madrid



Caracterización del fenotipo y de la capacidad migratoria de los linfocitos en pacientes con leucemia mieloide crónica tratados con dasatinib y efectos de este fármaco sobre el endotelio vascular

Tesis Doctoral

Beatriz Colom Fernández
Madrid 2019

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina



Caracterización del fenotipo y de la capacidad migratoria de los linfocitos en pacientes con leucemia mieloide crónica tratados con dasatinib y efectos de este fármaco sobre el endotelio vascular

Memoria presentada por el licenciado en Farmacia:

Beatriz Colom Fernández

Para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de la Tesis: Dra. Cecilia Muñoz Calleja

Este trabajo se realizó en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de la Princesa.

Madrid, 2019

Resumen

Dasatinib es un inhibidor de BCR-ABL de segunda generación que se usa como fármaco de primera línea en la leucemia mieloide crónica, y a cuya gran eficacia contribuyen efectos terapéuticos poco caracterizados sobre una inmunidad deficitaria por la acción crónica de la neoplasia. Por ello, en este trabajo nos hemos propuesto caracterizar, mediante citometría de flujo multiparamétrica, los cambios inmunofenotípicos que se producían durante la enfermedad, durante el tratamiento con dasatinib, y durante la linfocitosis que habitualmente induce el fármaco y que se propone como uno de sus principales efectos inmunomoduladores. Nuestros resultados demuestran que los principales efectos de la enfermedad son la disminución de CD62L y CCR7, en correspondencia con la disminución de T_N . Por otra parte, al diagnóstico, los linfocitos NK presentan un fenotipo más maduro que el de sujetos sanos. Dasatinib es capaz de revertir total o parcialmente los déficits que se detectan al diagnóstico y además tiene efectos per se sobre algunas subpoblaciones linfocitarias como el aumento de HLA-DR. La caracterización de la linfocitosis demostró que el aumento de linfocitos tras la toma del fármaco tiene lugar a expensas de un aumento de LT efectores y su correspondiente disminución de T_N en SP, así como de un aumento de células NK más diferenciadas. Para intentar explicar la linfocitosis, nos planteamos que el fármaco estuviese afectando a la migración linfocitaria de los LT hacia órganos linfoides secundarios y observamos que los LT de nuestros pacientes migraban menos hacia CCL19 y 21 tras dos horas de la toma del fármaco; la causa era la disminución de la proporción de los LT CCR7+ en SP y no un efecto directo de dasatinib sobre la capacidad migratoria o la expresión de CCR7. En cuanto a la asociación de la respuesta terapéutica a dasatinib y los parámetros inmunológicos pudimos comprobar que el valor absoluto de los LT CD8+ al diagnóstico se asocia a una respuesta molecular temprana.

Por otro lado, dasatinib produce efectos adversos graves como el derrame pleural y la hemorragia intestinal, que conllevan la interrupción del tratamiento y cuya patogénesis se desconoce. Por ello, y a través de distintos abordajes experimentales, comprobamos que dasatinib produce una importante desorganización del citoesqueleto de actina de células endoteliales HUVEC que se acompaña de una pérdida de las uniones homotípicas que abre espacios entre las células adyacentes. Este efecto tiene lugar de forma rápida, es dosis-dependiente y reversible. Su mecanismo molecular incluye la fosforilación de la cadena ligera de la miosina que probablemente se traduce en la activación de la NMII y en un aumento de la contractilidad celular. Experimentos de permeabilidad in vivo confirmaron que dasatinib produce una pérdida de la función de barrera del endotelio vascular.

En resumen, los datos aportados en esta tesis contribuyen al conocimiento de los efectos de la LMC y del tratamiento crónico con dasatinib sobre el sistema inmunitario, lo que es de crucial importancia en uno de los cánceres hematológicos en el que el potencial curativo del SI es más evidente. Además, la identificación, al menos en parte, de las causas de los efectos adversos más graves de dasatinib puede mejorar notablemente el manejo terapéutico de estos pacientes.

Índice

Abreviaturas.....	3
Introducción	9
1. Células del sistema inmunitario	11
1.1. Recirculación y homing linfocitarios.....	15
2. Endotelio Vascolar	17
2.1. Uniones intercelulares.....	17
2.2. Uniones célula-matriz extracelular.....	18
2.3. Regulación de la permeabilidad vascular	19
3. Leucemia Mieloide Crónica.....	23
4. Inhibidores de las tirosina cinasas	26
4.1. Tratamiento con los ITC de primera generación: Imatinib.....	27
4.3. ITC de tercera generación: Ponatinib.....	29
4.4. Efectos adversos del tratamiento con los ITC	29
4.5. Efectos inmunomoduladores de los ITC	31
Objetivos	33
Material y Métodos	37
1. Pacientes	39
2. Hemograma.....	40
3. Citometría de flujo	40
4. Ensayos de migración <i>in vitro</i>	43
5. Cultivo de células endoteliales.....	44
6. Estudio de impedancia.....	44
7. ITC	45
8. Microscopía de fluorescencia. Análisis de las uniones endoteliales célula-célula y célula-matriz.	45
9. Microscopía in vivo	46
10. Ensayos de cierre de brecha o wound healing.....	47
11. Cuantificación de la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina (RLC) por densitometría.	47
12. Western blot.....	47
13. Ensayos in vivo de permeabilidad endotelial.	48
14. Análisis estadísticos	48
Resultados.....	51

1. Estudio de los efectos de la enfermedad y del tratamiento crónico con Dasatinib sobre el fenotipo de los linfocitos.	53
2. Caracterización de la linfocitosis inducida por Dasatinib	56
2.1. Cambios en los valores absolutos y relativos de las principales subpoblaciones linfocitarias producidos por Dasatinib: pacientes movilizadores y no movilizadores.	56
3. Evaluación del efecto del dasatinib en la capacidad de migración de los linfocitos.	63
3.1. La toma de Dasatinib inhibe la capacidad migratoria de los linfocitos	63
4. Evaluación de la respuesta clínica a tratamiento con Dasatinib	66
5. Efectos del dasatinib sobre el endotelio vascular.....	68
5.1. Las concentraciones terapéuticas de dasatinib no son tóxicas para las células endoteliales.	68
5.2. Dasatinib induce una desestructuración de la monocapa endotelial de manera dosis-dependiente.....	68
5.3. Dasatinib induce una desorganización de citoesqueleto de actina de forma rápida y reversible y produce una retracción de las uniones interendoteliales.....	70
5.4. Dasatinib retrasa el cierre de brecha al inhibir la formación de los contactos célula-célula.	72
5.5. Dasatinib aumenta la actividad de la miosina II/ROCK.....	74
5.6. Dasatinib produce aumento de la permeabilidad vascular en vivo.	76
<i>Discusión</i>	77
<i>Conclusiones</i>	89
<i>Bibliografía</i>	93
<i>Anexos</i>	105
<i>Publicaciones científicas del doctorando durante su tesis doctoral</i>	107

Abreviaturas

Ac: anticuerpo
AcMo: anticuerpo monoclonal
ADCC: citotoxicidad celular dependiente de ac (del inglés, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*)
Ag: antígeno
AJ: las uniones adherentes (del inglés, *adherens junctions*)
ARA-C: citarabina o arabinósido de citosina
BCR: receptor de célula B (del inglés, *Breakpoint Cluster Region*)
CB: crisis blástica
CDC: citotoxicidad celular dependiente de complemento (del inglés, *complement-dependent cytotoxicity*)
Cdc42: del inglés, *Cell division control protein 42*
CMF: citometría de flujo
CPA: célula presentadora de antígeno
CPH: complejo principal de histocompatibilidad
DIC: Microscopía de Contraste Diferencial interferencial (del inglés, *Differential interference contrast*)
EA: efecto adverso
EGF: factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *Epidermal Growth Factor*)
ELC: cadena ligera esencial (del inglés *Essential Light Chain*)
ELN: European LeukemiaNet
FA: fase acelerada
FAK: cinasa de adhesión focal (del inglés, *focal adhesión kinase*)
FC: fase crónica
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés, *Fibroblast Growth Factor*)
FISH: hibridación in situ fluorescente (del inglés, *fluorescence in-situ hybridization*)
GAP: proteínas activadoras de GTPasas (del inglés, *GTPase-activating proteins*).
GEF: factores de intercambio de guanina (del inglés, *guanine-exchange factors*)
HBSS: solución salina balanceada de Hank (del inglés, *Hank's Balanced Salt Solution*)
HER: factor de crecimiento de hepatocitos (del inglés, *Hepatocyte Growth Factor*)
HEV: vénulas de endotelio alto (del inglés, *High Endotelial Venules*)
HUVEC: células endoteliales de la vena umbilical humana (del inglés, *Human umbilical vein endothelial cells*)
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1 (del inglés, *Intercellular Adhesión Molecule 1*)
IF: inmunofluorescencia
IFN- γ : interferón gamma (del inglés, *Interferon gamma*)
IRIS: *International Randomized Study of Interferon and STI57*
ITC: inhibidores tirosina cinasa
JAK/STAT: del inglés, *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*
JAM: molécula adhesiva de la unión (del inglés, *junctional adhesion molecules*)

KIR: receptor inhibitor de células NK (del inglés, *killer inhibitory receptor*)

LB: linfocitos B

LFA-1: antígeno asociado a la función de linfocito 1 (del inglés, *Lymphocyte Function –associated Antigen 1*)

LGL: linfocitos grandes granulares

LMC: leucemia mieloide crónica

LT: linfocitos T

MAP: proteína activada por mitógenos (del inglés, *mitogen activated protein*)

MDSC: células supresoras de estirpe mieloide (del inglés, *myeloid derived suppressor cells*),

MEC: matriz extracelular

MHCII: cadena pesada de miosina II (del inglés, *Myosine Heavy Chain*)

MLC: cadena ligera de miosina (del inglés, *Myosine Light Chain*).

MLCK: cinasa de la cadena ligera de miosina (del inglés, *Myosin Light Chain Kinase*)

MO: médula ósea

MYPT1: fosfatasa específica de miosina MYPT1 (del inglés, *Myosin phosphatase targeting protein*)

NCR: receptores de citotoxicidad natural (del inglés, *natural cytotoxicity receptors*)

NIH (Instituto Nacional de Salud, del inglés, *National Institutes of Health*)

NK: del inglés, *natural killer*

NMII: miosina no muscular de tipo II (del inglés, *non-muscle myosin II heavy chain*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

OSL: órganos linfoides secundarios

PBMC: células mononucleares de sangre periférica (del inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS: tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate-Buffered Saline*)

PCR: del inglés, *Polymerase Chain Reaction*

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, *Platelet-Derived Growth Factor*)

PECAM1: molécula de adhesión plaqueto-endotelial 1 (del inglés, *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*)

Ph: cromosoma

PI3K: fosfatidilinositol-3-OH-quinasa (del inglés, *Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase*)

PNAAd: Adresina de ganglio (del inglés, *Peripheral Node Addressin*)

Rac1: del inglés, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RCy: respuesta citogenética

RCyC: respuesta citogenética completa

RH: respuesta hematológica

RHC: respuesta hematológica completa

RhoA: miembro A de la familia de genes homólogos de Ras (del inglés, *Ras homolog gene family member*)

RI: respuesta inmunitaria
RLC: cadena reguladora ligera (del inglés *Regulatory Light Chain*)
RM: respuesta molecular
RMM: respuesta molecular mayor
ROCK: cinasa de dominio super-enrollado asociada a Rho (del inglés, *Rho associated Coiled-coil Kinase*)
S1P: la esfingosina-1-fosfato (del inglés, *Sphingosine-1-Phosphate*)
SG: supervivencia global
SI: sistema inmunitario
SLP: supervivencia libre de progresión
SP: sangre periférica
Src: protooncogeno de la tirosina cinasa (del inglés, *proto-oncogene tyrosine-protein kinase*)
T_{CM}: linfocitos T memoria central
TCR: receptor de células T (del inglés, *T cell receptor*)
T_{EM}: linfocitos T de memoria efectores
TJ: uniones estrechas (del inglés, *tight junctions*)
T_N: linfocitos T *naïve*
TNF: factor de necrosis tumoral (del inglés, *Tumor Necrosis Factor*)
T_{SCM}: linfocitos T *stem cell-like memory*
T_{TE} o T_{EMRA}: Linfocitos T efectores terminales
VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1 (del inglés, *Vascular Cell-Adhesion Protein 1*)
VEGFR: receptor para el factor de crecimiento endotelial (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)
VE-PTP: proteína tirosina fosfatasa vascular endotelial (del inglés, *Vascular Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase*)
VLA-4: proteína de activación tardía 4 (del inglés, *Very Late Antigen-4*)
WB: del inglés, *western blot*
WHO: *World Health Organization*

Introducción

1. Células del sistema inmunitario

Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario (SI) y la respuesta coordinada de todas ellas a la entrada de sustancias extrañas en el organismo se denomina respuesta inmunitaria (RI). La principal función fisiológica del SI es la protección frente a las infecciones, pero también sabemos que proporciona defensa frente a los tumores¹.

La primera línea de defensa del SI lo constituye la inmunidad innata que actúa de forma inmediata tras la detección de la molécula extraña, ya que está mediada por células y moléculas presentes de forma "innata" o "natural" en el organismo antes de la infección. Se trata de una respuesta rápida e inespecífica ya que no detecta diferencias finas en las moléculas que reconoce y que, además, no genera memoria inmunológica². Los principales componentes de la inmunidad innata son las barreras físicas y químicas del organismo, células como los fagocitos, las células dendríticas y los linfocitos NK (del inglés, *natural killer*), proteínas plasmáticas como las que componen el sistema del complemento y los reactantes de fase aguda, y las citocinas, que son proteínas que coordinan y regulan las funciones de las células del SI³.

En contraste con la inmunidad innata, existen otras respuestas inmunitarias que se desarrollan tras la infección y que aumentan en potencia y eficacia con cada nueva exposición al microorganismo. Es decir, son respuestas que se adaptan a la infección y por tanto a su conjunto se la denominó inmunidad adaptativa¹. Sus principales características son una especificidad exquisita en el reconocimiento de la molécula extraña y la capacidad de desarrollar memoria inmunológica. El SI adaptativo está integrado por las células presentadoras de antígenos (CPA) y los linfocitos T (LT) y B (LB) y sus productos, entre ellos los anticuerpos (ac) o inmunoglobulinas. Los linfocitos expresan receptores que reconocen específicamente una amplia variedad de moléculas extrañas que se denominan antígenos (ag).

Los LT son los principales mediadores de la RI adaptativa celular. A través de su receptor para el ag o TCR (del inglés, *T cell receptor*) reconocen péptidos que derivan de proteínas previamente procesadas por las CPA (que incluyen células dendríticas, macrófagos y LB) y que se encuentran unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH)⁴. Como resultado, los LT reconocen solo ag asociados a la membrana celular pero no ag solubles. Desde el punto de vista funcional se clasifican en varias subpoblaciones, siendo las mejor caracterizadas los LT CD4+, colaboradores o helper, que colaboran con los macrófagos y los LB en la eliminación de los microorganismos, y los LT CD8+ citotóxicos que matan directamente las células infectadas¹.

La RI adaptativa mediada por los LT puede resumirse en los siguientes pasos: 1) presentación antigénica por las CPA, principalmente células dendríticas, en los órganos linfoides secundarios (OLS) (que incluyen ganglios linfáticos, bazo y tejido linfóide asociado a las mucosas) y reconocimiento del ag por los LT *naïve* (T_N), 2) activación y proliferación del clon de linfocitos específicos para dicho ag (expansión clonal), 3) diferenciación en LT de memoria efectoras (T_{EM}), 4) migración de los LT efectoras al tejido periférico donde se encuentre el foco antigénico y 5) eliminación del ag (Figura 1).

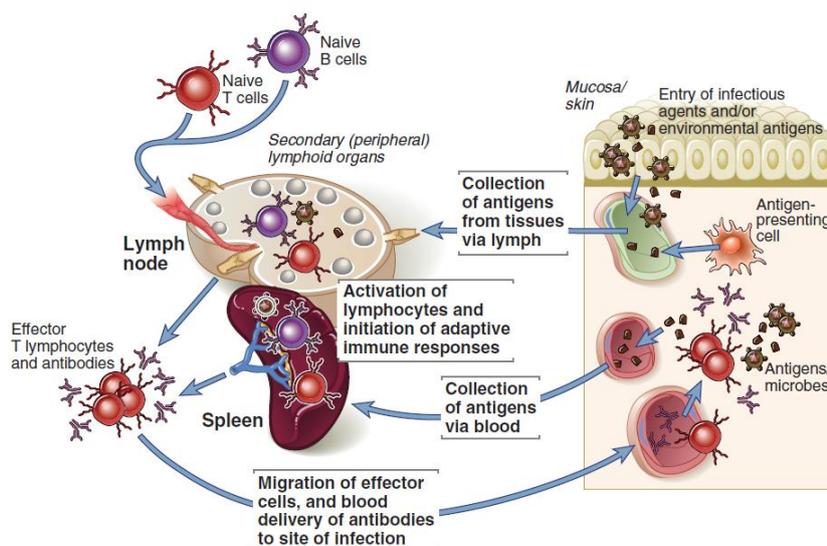


Figura 1. Resumen de los principales procesos de la inmunidad adaptativa mediada por los linfocitos T. Los T_N migran a OSL, donde son activados por ag para así diferenciarse a T_{EM} que posteriormente migrarán a tejido periférico. Extraída Abbas AK, et al. (2015)¹.

Todos estos procesos se asocian a cambios en la expresión de numerosas moléculas de superficie o intracelulares que desempeñan un papel importante en la inducción y regulación de las respuestas inmunitarias. Este hecho, junto con el desarrollo de ac monoclonales (AcMo) que reconocen multitud de moléculas asociadas a linaje y estadio madurativo, y el gran avance tecnológico en la técnica de citometría de flujo (CMF) de los últimos años, ha permitido diseccionar muy finamente las distintas subpoblaciones linfocitarias. Así, en el caso de los LT podemos clasificarlos en linfocitos T_N , LT *stem cell-like memory* (T_{SCM}), LT de memoria central (T_{CM}), linfocitos T_{EM} y LT efectores terminales o exhaustos (T_{TE} o T_{EMRA})⁵, cada una de ellas con sus particulares características funcionales como veremos a continuación (Tabla 1).

Los T_N , tanto T CD4+ como T CD8+, proceden del timo donde sufren los procesos de selección positiva y negativa que garantizan la eliminación de los LT autoreactivos. Una vez abandonan el timo se encuentran recirculando continuamente entre los OLS y la sangre periférica (SP), a través del sistema linfático, en el proceso denominado recirculación linfocitaria que favorece el encuentro del T_N con su ag específico. De hecho, durante este estadio celular coexpresan el receptor de quimiocinas CCR7 y la molécula de adhesión L-selectina o CD62L⁶, que les permite su unión al endotelio de las venas de endotelio alto (HEV) de los OLS y posterior extravasación hasta el interior de los mismos, donde reconocerán su ag específico previamente procesado y presentado por una célula dendrítica. Además, los T_N de forma característica expresan en su superficie la molécula CD45RA, una isoforma de la molécula CD45 que está implicada en la transducción de señal necesaria para su activación y diferenciación a LT de memoria y la molécula CD27 que tiene función coestimuladora. Los linfocitos T_N ,

cuando son activados por primera vez por el ag correspondiente, median la RI primaria, y parte de ellos se diferenciará en LT de memoria. Las respuestas inmunitarias secundarias se producen por encuentros posteriores con el mismo ag y suelen ser más rápidas, de mayor magnitud y con mayor capacidad de eliminación del ag. Ello es debido a que los LT de memoria son células de vida larga capaces de responder de manera inmediata en reexposiciones sucesivas al ag. Dentro del conjunto de LT de memoria se pueden distinguir dos subpoblaciones con diferentes funciones, localización e inmunofenotipo: los linfocitos T_{CM} y los T_{EM} ⁷.

Los T_{CM} se localizan principalmente en los OLS y carecen de función efectora inmediata. Por el contrario, poseen una alta capacidad proliferativa ante una segunda exposición a su ag específico y generan de forma eficiente LT efectores. Los linfocitos T_{CM} expresan marcadores de memoria tales como la isoforma CD45RO y carecen de moléculas propias de células *naïve* tales como CD45RA, pero conservan CD27 y marcadores de reclutamiento hacia los OLS, como CCR7 y CD62L⁸ (Tabla 1).

Por su parte, una vez generados tras la activación de los linfocitos T_N , los linfocitos T_{EM} abandonan los OLS, vuelven a la circulación sanguínea y migran de forma preferencial a los tejidos de la periferia para realizar ahí su función. Para ello, dejan de expresar CCR7 en superficie y la expresión de CD62L es más heterogénea. En cambio, expresan moléculas de adhesión tales como ligandos para las selectinas P y E endoteliales además de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$, y receptores para quimiocinas inflamatorias, lo que facilita su reclutamiento hacia los tejidos inflamados^{9,10}. Este subtipo de LT se caracteriza por su rápida acción efectora y mayor capacidad para producir citoquinas.

Finalmente, los T_{EMRA} , que también se denominan LT exhaustos⁵, se generan como consecuencia de una exposición prolongada al ag, pierden su capacidad efectora y se caracterizan por una sobreexpresión de moléculas inhibitoras como PD1 y CTLA4.

Tabla 1. Características de los linfocitos T en función de la fase de diferenciación. T_N: Linfocitos T *naïve*; T_{CM}: Linfocitos T de memoria central; T_{EM}: linfocitos T de memoria efectoras.

	T _N	T _{EM}	T _{CM}
Migración	Preferentemente a OSL	Preferentemente a tejido inflamado	Preferentemente a tejido inflamado y mucosas
Frecuencia de respuesta a ag	Muy baja	Alta	Baja
Funciones efectoras	Ninguna	Secreción citocinas y actividad citotóxica	Ninguna
Ciclo celular	No	Si	Si
Expresión de proteínas de membrana			
IL-2R (CD25)	Baja	Alta	Baja
L-selectina (CD62L)	Alta	Baja	Variable
IL-7R (CD127)	Moderadamente alta	Baja	Alta
Moléculas de adhesión: integrinas, CD44	Baja	Alta	Alta
CCR7	Alta	Baja	Variable
Isoformas CD45	CD45RA	CD45RO	CD45RO variable
Morfología	pequeño y escaso citoplasma	grande y escaso citoplasma	pequeña
Inmunofenotipo	CD27- CD45RA+ CCR7+	CD27+CD45RA- CCR7- Terminales: CD27+ CD45RA+ CCR7-	CD27+ CD45RA- CCR7+

Este perfil de expresión de moléculas y receptores de quimiocinas nos informa además sobre el estado de activación o la capacidad de secretar un determinado patrón de citocinas, y por tanto sobre el tipo de diferenciación que ha sufrido el linfocito tras su encuentro con el ag. De esta manera, podemos clasificar a los LT CD4⁺ de memoria en Th1, Th2, Th17 y Th22, en función de la expresión diferencial de receptores de quimiocinas como CCR4, CCR5, CCR6 y CXCR3¹¹. Dichos linfocitos ejercen funciones de diferentes a través de la síntesis diferencial de determinadas citocinas.

Otros tipos de LT CD4⁺ bien caracterizados incluyen los LT helper foliculares y los LT reguladores. Los primeros se diferencian a partir del T_N activado por el ag, se localizan en los folículos linfoides de los OLS y son esenciales en las reacciones del centro germinal, como el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y el incremento de afinidad de los LB por el ag¹².

Los LT reguladores son los encargados de moderar o suprimir la RI convencional y garantizar la tolerancia periférica a través de la inhibición de la activación y/o función de los LT autoreactivos; y los defectos en su generación y/o función favorecen la aparición de patologías autoinmunes¹³.

Los LT CD8⁺, denominados también LT citotóxicos, juegan un papel en la defensa inmunitaria contra los patógenos intracelulares, incluidos virus y bacterias, y contra los tumores. Reconocen los péptidos presentados por moléculas del CPH de clase I, que se expresan en todas las células nucleadas.

Eliminan la célula diana bien por la unión del receptor FasL con el ligando Fas, bien por la exocitosis de perforinas y granzimas que generan poros en la membrana de la células diana e inducen su apoptosis¹⁴. Se clasifican en las mismas subpoblaciones que los LT CD4+ en función de su historia de exposición antigénica.

Los LB son los principales mediadores de la RI adaptativa humoral a través de la producción de anticuerpos (ac) que reconocen específicamente su ag y median distintos mecanismos efectores de defensa como la neutralización de ag, la citotoxicidad celular dependiente de ac o ADCC (del inglés, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) o la citotoxicidad dependiente de complemento o CDC (del inglés, *complement-dependent cytotoxicity*)¹⁵. Hay también distintos tipos de LB entre los que destacan los foliculares y los de la zona marginal. Los primeros presentan el ag a través del CPH de clase II a los LT CD4+ cooperadores de la zona T de los OLS que han sido previamente activados por dicho ag. Esta interacción permite el cambio de clase de las Ig y el aumento de la afinidad de las mismas por el ag. Al igual que sucede con los LT, los LB también se clasifican en distintos estadios en función de su historia de exposición antigénica¹.

Finalmente, los linfocitos o células NK son linfocitos capaces de eliminar de forma rápida células infectadas o tumorales y contribuyen a modular tanto la RI innata como la adaptativa¹. A diferencia de los LT, carecen de expresión de CD3 o TCR y ejercen su actividad citotóxica independientemente de la presentación antigénica por el CPH¹⁶. Son células CD3⁻CD56⁺CD16⁺ cuya actividad está regulada por el equilibrio entre señales que derivan de distintos receptores entre los que se incluyen: a) los receptores lectina tipo C, de los que destacamos el heterodímero activador NKG2D/CD94 que reconoce la molécula no clásica del CPH, HLA-E; b) los receptores de citotoxicidad natural NCR (del inglés, *natural cytotoxicity receptors*), que incluyen NKp30, NKp44 y NKp46, expresados exclusivamente por las NK; c) los receptores de la familia de las Igs, llamados receptores KIR (del inglés, *killer inhibitory receptor*), los cuales pueden ser activadores o inhibidores y d) el receptor CD16 o receptor de baja afinidad para la región Fc de la IgG (Fc gamma RIII). Los mecanismos de acción de las células NK incluyen: (a) la ADCC a través de la unión del CD16 a la región Fc de las IgG que se encuentran opsonizando una célula; b) la unión de sus receptores activadores NKp30, NKp44, NKp46, DNAM-1 y NKG2D a sus ligandos o (c) la identificación de la pérdida de expresión de moléculas del CPH de tipo I en células infectadas o tumorales a través de sus receptores KIR (teoría del *missing self*)¹⁷.

1.1. Recirculación y homing linfocitarios

Una de las características distintivas de las células del SI es su capacidad de movimiento. Como ya se ha mencionado arriba, la recirculación linfocitaria es el proceso mediante el cual los T_N maduros entran en los OLS con el fin de encontrar ag extraños presentados por las células dendríticas. Si el T_N no encuentra a su ag específico en ese OLS concreto, ese linfocito permanecerá en su estadio *naïve*, volverá al torrente sanguíneo y repetirá su migración y entrada en otro OLS¹⁸. Este es el mecanismo por el cual los linfocitos acabarán encontrando su ag específico en cualquier localización del organismo¹⁹. Por

su parte, el término “*homing*” hace referencia al proceso según el cual determinadas subpoblaciones linfocitarias entran selectivamente en determinados órganos, ya sean o no linfoides, y no en otros. Finalmente, la inflamación tiene lugar cuando los leucocitos y las proteínas plasmáticas se extravasan hacia los sitios de infección o daño tisular con el fin de eliminar el agente causal.

En general, el reclutamiento de los leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia el tejido subyacente, ya sea linfoide o no, tiene lugar a través de la denominada cascada de extravasación leucocitaria en la que los leucocitos ruedan y se adhieren al endotelio de los vasos para después atravesar las células endoteliales y alcanzar el tejido subyacente. En esta cascada de adhesión participan diversos tipos celulares.

En el caso de la entrada de los linfocitos T_N en los OLS, las HEV de dichos órganos son vénulas postcapilares formadas por células endoteliales especializadas que expresan una serie de moléculas implicadas en la captación de linfocitos circulantes, como las adresinas PNAd (del inglés, *Peripheral Node addressin*), un grupo de sialomucinas que sirven de ligando para la L-selectina o CD62L presente en los linfocitos T_N . La unión de dichas moléculas es de baja afinidad y tiene una tasa rápida de unión y desunión que da lugar a un rodamiento de los linfocitos sobre el endotelio²⁰. Esto permite que el receptor de quimioquinas CCR7 expresado en la membrana de los linfocitos se una a sus ligandos, las quimiocinas homeostáticas CCL19 y CCL21, producidas y expuestas por el endotelio. Dicha unión inicia una cascada de señalización que da lugar a un cambio conformacional en las integrinas de la membrana del linfocito, VLA-4 (del inglés, *Very Late Antigen-4*) y LFA-1 (del inglés, *Lymphocyte Function – associated Antigen 1*)²¹, que adquieren mayor afinidad y avidéz por las moléculas de adhesión VCAM-1 (del inglés, *Vascular Cell-Adhesion Protein 1*) e ICAM-1 (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1*) presentes en el endotelio, lo que garantiza la adhesión firme del linfocito al endotelio. y su posterior migración a través del endotelio en el proceso conocido como diapédesis o transmigración gracias a un gradiente de quimiocinas²⁰. En este último paso el linfocito debe abrirse camino hacia la membrana basal para llegar al tejido subyacente.

Por su parte, en la reacción inflamatoria, la salida de los componentes del SI hacia el tejido es dependiente de cambios reversibles en los vasos sanguíneos del tejido infectado o inflamado en respuesta a citocinas y otros mediadores secretados por células tisulares tras su estimulación por moléculas microbianas o derivadas de daño tisular. Estos cambios incluyen la vasodilación, el aumento de la permeabilidad vascular y la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas endoteliales que favorecen la adhesión y extravasación de los leucocitos. En el caso concreto de los LT efectoras, el reclutamiento hacia los tejidos periféricos donde se encuentra el foco antigénico, ya sea infeccioso, tumoral o de otro tipo, está mediado por la expresión de las selectinas E y P y determinadas integrinas en la superficie endotelial activada de las vénulas postcapilares de los tejidos, que a su vez se unirán a sus respectivos ligandos en la superficie de los LT efectoras^{22,23}. Los T_N no poseen dichos ligandos, motivo por el cual no se extravasan de forma eficiente en los tejidos periféricos. Como hemos mencionado

anteriormente, la configuración de receptores de quimiocinas que caracteriza a cada subtipo de LT helper da lugar a un reclutamiento diferencial de los mismos.

2. Endotelio Vascular

El endotelio vascular constituye la monocapa celular más interna de los vasos sanguíneos, separa el torrente circulatorio del tejido subyacente y, como acabamos de ver, juega un papel muy importante en todos los procesos de reclutamiento leucocitario hacia los distintos tejidos²⁴. Además, actúa como una barrera que controla la permeabilidad de los vasos sanguíneos, y en consecuencia el intercambio de sustancias entre la SP y los tejidos subyacentes, incluyendo el intercambio gaseoso en los pulmones y de nutrientes en el intestino. Durante la inflamación, la capacidad de adhesión de los leucocitos activados así como la permeabilidad de la monocapa endotelial aumentan, lo que conduce a edema, hemorragia e infiltración leucocitaria.

2.1. Uniones intercelulares

Las uniones entre las células endoteliales o uniones homotípicas se componen de diferentes complejos de proteínas, muchos de los cuales conectan con el citoesqueleto de actina, el cual constituye a su vez una estructura dinámica de andamiaje celular que garantiza a las células su tensión interna, morfología, transporte vesicular intracelular, polaridad y capacidad de adhesión y migración²⁵. Es importante señalar que las uniones intercelulares no solo tienen una función estructural sino que además conforman plataformas de señalización al interior celular, permitiendo que las células intercambien señales de supervivencia, proliferación o posición, entre otras.

Los principales complejos proteicos que garantizan las uniones homotípicas de las células endoteliales son las uniones estrechas o TJ (del inglés, *tight junctions*) y las uniones adherentes o AJ (del inglés, *adherens junctions*) (Figura 2). Estos complejos están formados por proteínas transmembrana que funcionan como receptores de adhesión y proteínas adaptadoras que conectan con el citoesqueleto de actina; de esta manera, se establece una regulación recíproca entre proteínas integrantes de las uniones intercelulares (que contribuirían al mantenimiento de la arquitectura celular) y los cambios en el citoesqueleto (que a su vez modularían la integridad de dichas uniones) (Figura 2).

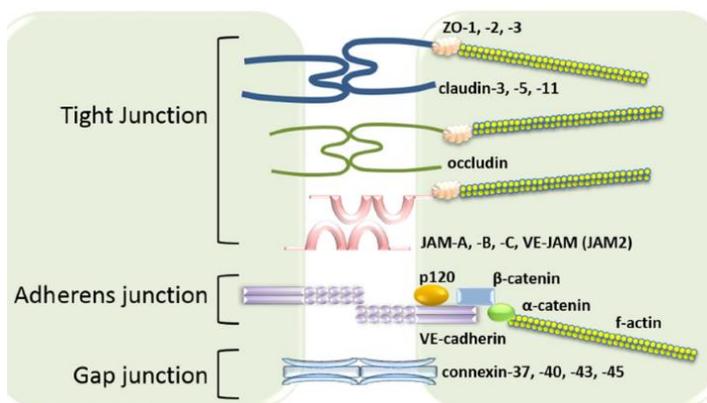


Figura 2. Resumen de las diferentes uniones de las células endoteliales: uniones estrechas (TJ), uniones adherentes (AJ) y las uniones gap.
Extraída de Komarova et al. (2017)²⁶.

Las TJ o *zonula occludens* se encuentran en la zona del lumen del endotelio vascular, a través de moléculas transmembrana como las ocludinas, claudinas, y las proteínas JAM (del inglés, *junctional adhesion molecules*). Todas ellas se asocian a complejos proteicos que incluyen proteínas como ZO-1,-2 y-3, y que actúan de puente con el citoesqueleto de actina. Las AJ o *zonula adherens* son complejos de unión que se sitúan próximas y basales a las TJ (aunque en endotelio pueden estar intercaladas)²⁷ y al igual que ellas forman una estructura a modo de cinturón en todo el perímetro celular. El principal componente en las AJ de las células endoteliales es la proteína VE-cadherina (CD144), específica del endotelio vascular.

Las VE-cadherinas de dos células contiguas conectan entre sí a través de su dominio extracelular, mientras que se asocia de manera indirecta mediante su región citoplásmica a los filamentos de actina, a través de un complejo de proteínas que incluyen alfa- y beta-cateninas, placoglobina (gamma-catenina), p120 catenina, vinculina y alfa-actinina. La molécula PECAM1 (del inglés, *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*) o CD31, junto con la VE-cadherina y el receptor para el factor de crecimiento endotelial (VEGFR) forman un complejo proteico a través del cual las células endoteliales son capaces de percibir cambios hemodinámicos e iniciar una señalización intracelular que media los cambios adaptativos pertinentes.

2.2. Uniones célula-matriz extracelular

La adhesión de las células endoteliales a la matriz extracelular (MEC) es esencial para la estabilidad de los vasos sanguíneos y el desarrollo de múltiples procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la reparación tisular y el cierre de heridas.²⁸⁻³⁰ Las uniones o adhesiones focales son complejos proteicos que unen mecánicamente el citoesqueleto de actina de la célula endotelial con la MEC a través de las integrinas, que son moléculas de adhesión presentes en la membrana celular para moléculas de MEC como fibronectina, colágeno o laminina. A nivel intracelular, las integrinas pueden interactuar con la actina de forma directa o a través de moléculas de unión a actina como la vinculina, la alfa-actinina, la paxilina y la talina^{31,32}. La cinasa de adhesión focal o FAK³³⁻³⁵ (del inglés, *focal adhesion kinase*), a través de su actividad enzimática y/o de su función de andamiaje, participa en el ensamblaje de las adhesiones focales en respuesta a multitud de señales intracelulares, como las provenientes de receptores de factores de crecimiento (PDGF (del inglés, *Platelet-Derived Growth Factor*), EGF (del inglés, *Epidermal Growth Factor*), HER (del inglés, *Hepatocyte Growth Factor*) y VEGF) y en la reorganización del citoesqueleto y las uniones intercelulares en múltiples procesos biológicos como la angiogénesis, la migración o la adhesión³⁶. Así, la adhesión mediada por integrinas da lugar a la fosforilación de FAK lo que favorece el reclutamiento de otras cinasas como Src (del inglés, *proto-oncogene tyrosine-protein kinase*) que de forma directa o, a través de otras moléculas de señalización como la paxilina, regulan la activación de las GTPasas de la familia Rho, a través de factores de intercambio de guanina o GEF (del inglés, *guanine-exchange factors*) o de proteínas activadoras de GTPasas o GAP (del inglés, *GTPase-activating proteins*) (Figura 3). Además, las integrinas también

transmiten señales derivadas de cambios en las propiedades mecánicas o físicas de la MEC a través de cambios conformacionales en proteínas asociadas a integrinas como Scr, p130Cas o vinculina que a su vez provocarán una reorganización del citoesqueleto y modificaciones en la contractilidad de la célula a través de vías de señalización como las Rho GTPasas (Figura 3). De forma recíproca, alteraciones en el citoesqueleto de actina o en la capacidad contráctil de las células regula la interacción dinámica de las integrinas con la MEC³⁶.

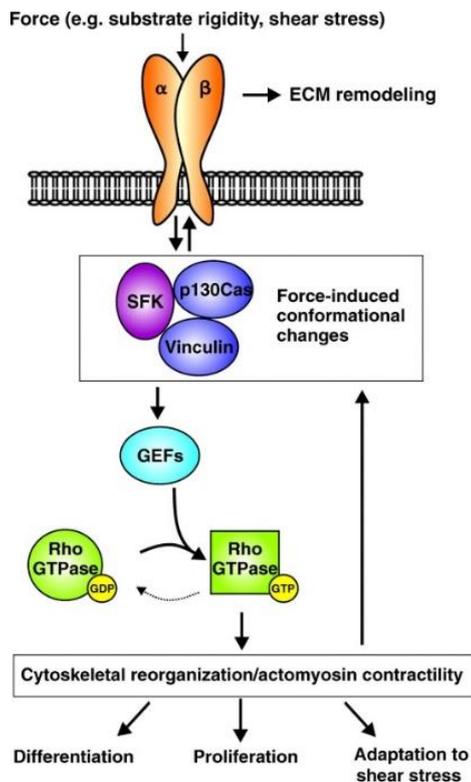


Figura 3. Regulación de la integrina a través de las Rho-GTPasas durante el proceso de adhesión celular. El cambio conformacional de las integrinas estimulan la actividad de SFK, p130Cas y vinculina, provocando una cascada de señalización a través de las Rho GTPasas con el fin de reorganizar el citoesqueleto.

Extraída de Huveneers S, et al (2009)³⁶.

2.3. Regulación de la permeabilidad vascular

La regulación de la permeabilidad vascular es compleja y en ella participan distintas moléculas y estructuras celulares entre las que destacan las uniones homotípicas de las células endoteliales así como las uniones de las células endoteliales con la MEC y con el citoesqueleto de actina.

Las causas que pueden llevar a un aumento de la permeabilidad vascular incluyen la alteración de la integridad de las AJ secundaria por ejemplo a estímulos proinflamatorios, así como fuerzas mecánicas que proceden de células contiguas y/o de la MEC o de la tensión intracelular generada por la maquinaria contráctil de la actomiosina.

Los cambios en la arquitectura de las AJ son los principales responsables de las variaciones en la permeabilidad endotelial. La integridad de las AJ está regulada por diversos mecanismos, que afectan

como por ejemplo las VE-PTP (del inglés, *Vascular Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase*), que defosforilan la VE-cadherina y las cateninas y, como resultado, estabilizan la unión cadherina-catenina y disminuyen la internalización de la VE-cadherina.

Además de los factores que afectan directamente a los componentes más específicos de las uniones intercelulares, las alteraciones en la tensión intracelular pueden afectar al ensamblaje de las uniones homotípicas o de las uniones focales con la MEC y, como consecuencia, a la función de barrera. La tensión intracelular la genera la maquinaria contráctil de la actomiosina y la miosina no muscular de tipo II (NMII) juega un papel primordial en el control de la tensión intracelular a nivel de las AJ.

Las miosinas son proteínas motoras de unión a los filamentos de actina y median gran parte de las funciones realizadas por estos últimos; de esta forma, juegan un papel fundamental en aquellos procesos celulares que implican reorganización del citoesqueleto de actina, como la citocinesis o la migración celular, entre otros. La superfamilia de las miosinas es muy amplia e incluye la NMII que se expresa de manera ubicua y que es capaz de generar fuerzas mecánicas dentro de la célula y también en su entorno.

La unidad funcional de NMII está compuesta por un hexámero que contiene dos cadenas pesadas o MHCII (del inglés, *Myosine Heavy Chain*) y cuatro cadenas ligeras MLC (del inglés, *Myosine Light Chain*). Las cadenas ligeras se dividen en las cadenas ELC (del inglés, *Essential Light Chain*) y RLC (del inglés, *Regulatory Light Chain*) (Figura 5 a). Las MHCII contienen el dominio de unión a actina y de actividad ATPasa que conforman el dominio motor de la NMII y que está muy conservado entre las distintas miosinas. Por su parte el dominio helicoidal de la MHCII actúa como dominio de dimerización de las dos MHCII. La unión de la miosina a la actina está mediada por la hidrólisis de ATP que es un proceso dependiente de Mg^{2+} y que promueve la adquisición de una conformación de alta afinidad por el filamento de actina. La unión de la NMII al filamento de actina genera fuerzas de tracción que pueden promover el movimiento de estructuras celulares a lo largo del filamento de actina o desplazar unos filamentos de actina sobre otros (Figura 5 b).

Las cadenas ligeras, al igual que las pesadas, tienen una función estructural, pero la MLC controla además la función del hexámero por fosforilación de residuos específicos que catalizan la actividad ATPasa de la MHCII y controlan el plegamiento conformacional del hexámero.

La NMII puede adoptar dos conformaciones: una capaz de interactuar con la actina, también denominada competente o activa, y otra incapaz. La primera interactúa con otros hexámeros de NMII (que forman minifilamentos antiparalelos de miosina) y con los filamentos de actina, formando estructuras celulares de actomiosina como las fibras de stress o las adhesiones focales. Estas dos conformaciones pueden ser reversibles y la adopción de una u otra está regulada por la fosforilación de dos residuos de la RLC, Ser19 y Thr18, principalmente por la acción de la cinasa ROCK (del inglés, *Rho associated Coiled-coil Kinase*) dependiente a su vez de la actividad de la GTPasa RhoA⁴⁴ (del inglés, *Ras homolog gene family member*). ROCK fosforila el residuo Ser19 de forma directa o por la inhibición de la fosfatasa específica de miosina MYPT1 (del inglés, *Myosin phosphatase targeting protein*). Por su parte, la cinasa de MLC o MLCK (del inglés, *Myosin Light Chain Kinase*) fosforila principalmente el residuo Ser19.⁴⁴⁻⁴⁶

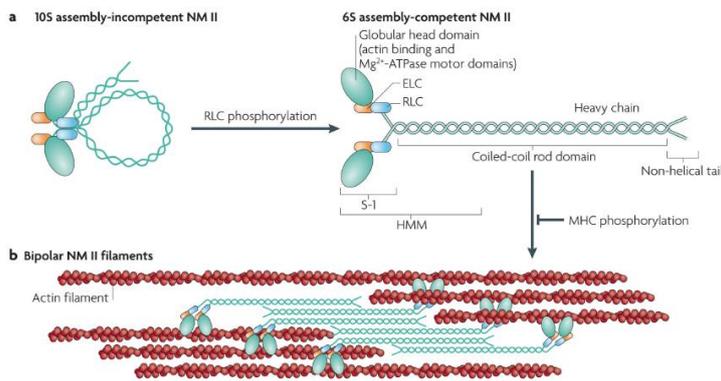


Figura 5. Estructura funcional y cambio conformacional del hexámero de miosina.

A) cambio conformacional del hexámero de miosina de una estructura de 10S inactiva, a una conformación 6S activa, por la fosforilación de residuos clave de la RLC. B). En conformación 6S, el hexámero puede formar uniones anti-paralelas con otros hexámeros de miosina e interactuar con los filamentos de actina, lo que le permite generar fuerzas mecánicas en las células.

Extraída de Vicente-Manzanares M et al. (2009)⁴⁶.

En este sentido es importante señalar el papel relevante que juegan RhoA, Rac1 (del inglés, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) y Cdc42 (del inglés, *cell division control protein 42*), todos ellos miembros de la familia de las RhoGTPasas en la reorganización del citoesqueleto de actina y la integridad de las AJ. Su actividad está regulada por un ciclo de unión a GDP o GTP.⁴⁷⁻⁴⁹ El paso de un estado a otro está controlado por proteínas activadoras de GTPasas o GAP (del inglés, GTPase activating proteins) que aceleran la hidrólisis de GTP y por tanto terminan la actividad de las RhoGTPasas, y por GEF que promueven el intercambio de GDP a GTP y por tanto activan las RhoGTPasas. En su estado de unión a GTP o estado activo se translocan a la membrana celular donde se unen a un amplio abanico de mediadores⁵⁰.

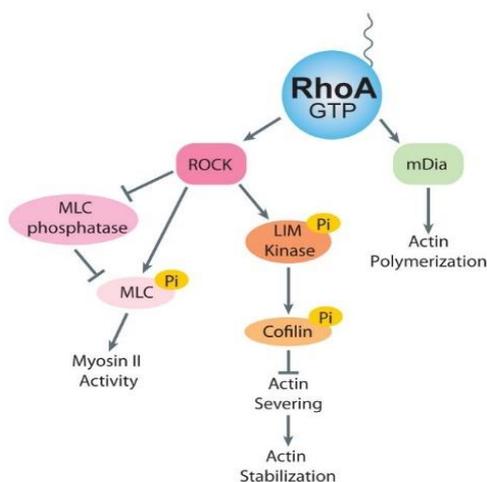


Figura 6. Cascada de señalización a través de RhoA.

Extraída de Lessey EC, et al. (2012)⁵⁰.

De forma muy resumida, Cdc42 promueve la nucleación y polimerización de la actina y juega un papel fundamental en el ensamblaje y el mantenimiento de las AJ, mientras que el papel de Rac1 en el mantenimiento de la integridad de la barrera endotelial depende mucho del contexto celular. Por su parte, la señalización de RhoA contribuye a la desestabilización de las AJ y el aumento de la permeabilidad vascular a través de la activación de dianas como ROCK y mDia, que promueven la contracción de la miosina y la polimerización de actina, respectivamente, lo que favorece el ensamblaje de fibras de stress y un aumento de la tensión intracelular que desestructura las AJ⁵¹⁻⁵⁴ (Figura 6). Estas fibras influyen dramáticamente en la tasa y tamaño de los espacios intercelulares que se forman cuando las células se retraen^{55,56} ya que generan una tensión centrípeta que contrarresta la tensión centrífuga ejercida por el entramado cortical de actina. Al contrario de lo que sucede con Cdc42 y Rac1, la actividad de RhoA suele estar inhibida a nivel de las AJ por múltiples mecanismos entre los que se incluyen la activación de la p190RhoGAP por Rac1, Scr o FAK^{57,58}.

Otra manera de alterar la permeabilidad vascular es a través de la inhibición de aquellos mediadores que aumentan la estabilidad de la barrera endotelial, causando así la pérdida de la integridad vascular. Ejemplos de estos estabilizadores de las uniones son el factor de crecimiento de fibroblastos, FGF (del inglés, *Fibroblast Growth Factor*) que aumenta la estabilización de VE-cadherina en las AJ a través de la modulación de su unión a p120catenina⁵⁹; la esfingosina-1-fosfato S1P, (del inglés, *Sphingosine-1-Phosphate*), mediante la fosforilación de FAK, produce redistribución de las adhesiones focales como puntos de unión de la actina, favoreciendo la formación del anillo de actina que estabiliza las uniones celulares⁶⁰⁻⁶³; y la angiopoyetina I, que inhibe la activación de la cinasa Src inducida por VEGF, inhibiendo de este modo la fosforilación e internalización de VE-cadherina⁶⁴.

3. Leucemia Mieloide Crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa clonal que se origina en una célula madre pluripotente común a los tres linajes hematopoyéticos⁶⁵, aunque lo que caracteriza a la LMC es la expansión de la serie granulocítica. Este clon leucémico se genera como consecuencia de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22⁶⁶, que da lugar a un cromosoma 22 derivativo conocido como cromosoma *Philadelphia* (Ph)^{67,68}. El resultado de esta translocación es un gen de fusión en el que parte del gen *BCR* (del inglés, *Breakpoint Cluster Region*) en el cromosoma 22, se une a un fragmento del gen *ABL* proveniente del cromosoma 9, y dan lugar al oncogen *BCR/ABL1*^{69,70} que es el marcador molecular patognomónico de la LMC. En función de los puntos de rotura en el gen *BCR* se han descrito varios transcritos de fusión *BCR/ABL1* siendo los más frecuentes los que codifican para la proteína p210^{BCR-ABL1} que se asocia al desarrollo de la LMC y para la proteína p190^{BCR-ABL1} asociada sobre todo a la aparición de la leucemia aguda linfoblástica Ph^{+71,72}. La oncoproteína *BCR/ABL1* contiene el dominio de oligomerización de *BCR* unido al dominio cinasa de *ABL* por lo que presenta una actividad tirosina cinasa constitutiva⁷³ que transforma la célula madre normal en una célula madre leucémica y es la responsable de la patogénesis de la enfermedad^{73,74}. Desde el punto de vista de la historia de la

medicina, estos descubrimientos fueron un hito ya que confirmaron la asociación de una alteración genética con la leucemogénesis.

La LMC es uno de los desórdenes mieloproliferativos crónicos más comunes (15% de todas las leucemias del adulto), con una incidencia anual de 1-3 casos por cada 100.000 habitantes. Dada su actual supervivencia, la prevalencia de esta enfermedad ha aumentado mucho y se espera que ésta sea la tendencia en los próximos años. La edad mediana en el momento del diagnóstico se sitúa alrededor de los 50 años, aunque puede aparecer a cualquier edad, y existe un ligero predominio en varones. Apenas se han descrito factores de riesgo para la LMC y entre ellos se incluyen la exposición a radiaciones ionizantes y agentes inhibidores de la topoisomerasa II del ADN, ya que inducen la translocación 9;22⁷⁵

Desde el punto de vista de la patogénesis, las proteínas tirosina cinasa BCR-ABL1 estimulan multitud de vías de señalización intracelulares que median proliferación, aumento de supervivencia, inhibición de la apoptosis, inestabilidad genómica y alteraciones de la migración y la adhesión celular. La dimerización de BCR-ABL1 produce autofosforilación que genera sitios de unión para proteínas adaptadoras como GRB2, CRK o CBL, entre otras, y éstas a su vez activan distintas vías de señalización entre las que destacan RAS, MAP (del inglés, *mitogen activated protein*), JAK/STAT (del inglés, *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*), fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3K), Myc y proteínas del citoesqueleto⁷⁶.

La patogénesis de la LMC está condicionada por la inmunosupresión y los mecanismos de evasión del SI asociados a los procesos neoplásicos, que impiden el desarrollo de respuestas anti-leucemia eficientes y favorecen la progresión de la enfermedad. La inmunosupresión está mediada en parte por la célula madre leucémica, que se caracteriza por su capacidad de autorenovación y su resistencia a la apoptosis⁷⁷. Además, se han descrito mecanismos de evasión de la célula madre leucémica tanto BCR-ABL dependientes como independientes como la disminución de la expresión de moléculas del CPH de clase II que dificultaría su reconocimiento por parte de los LT; este mecanismo y otros podrían justificar en la persistencia de la célula madre leucémica y la recaída tras la interrupción de los inhibidores de la actividad tirosina cinasa (ITC), que son los fármacos de elección para la LMC. Otros mecanismos de inmunosupresión descritos incluyen el aumento de células supresoras de estirpe mieloide (MDSC), derivadas también del clon leucémico⁷⁸, que promueven el reclutamiento y la función de otras células inmunosupresoras como los LT reguladores. Todo ello se traduce en diferentes alteraciones funcionales y numéricas en las principales células del SI con función efectora antitumoral, como las células NK, las células dendríticas y LT citotóxicos. Entre ellos destacan la disminución del número de células NK así como de su capacidad proliferativa y citotóxica⁷⁹, defectos numéricos y funcionales en las células dendríticas⁸⁰⁻⁸² que dificultan una adecuada presentación antigénica, así como déficits funcionales de los LT que incluyen una menor capacidad citolítica, una disminución en la síntesis y secreción de citocinas con un papel antitumoral relevante⁸³, como el TNF-alfa (del inglés, *Tumor Necrosis Factor*) o el IFN-gamma (del inglés, *Interferon gamma*), o el aumento de PD-1 en LT específicos de ag asociados a las células de la LMC⁸⁴.

En general, la mayoría de los pacientes con LMC Ph+ están asintomáticos en el momento del diagnóstico, por lo que éste suele ser casual, en coincidencia con un análisis rutinario, al detectarse en SP hiperleucocitosis acompañada frecuentemente de trombocitosis, granulocitos inmaduros (blastos, mielocitos y metamielocitos), la característica basofilia y la disminución de la fosfatasa alcalina granulocitaria. Más del 50% de estos pacientes presentan esplenomegalia al diagnóstico. Desde el punto de vista clínico, en la LMC se distinguen tres fases⁸⁵: la fase crónica (FC), que puede durar años y es en la que se diagnostican la mayoría de los pacientes, la fase final o crisis blástica (CB) que se define por la presencia de más de un 20% de blastos en SP o en médula ósea (MO) o enfermedad extramedular aparte del bazo, y la fase acelerada (FA), una fase previa a la CB que se identifica en algunos pacientes que no responden al tratamiento⁸⁶, en la que los blastos de SP o MO oscilan entre un 10 y un 20%, la basofilia supera el 20%, hay signos clínicos de progresión como la trombocitosis, un aumento de la leucocitosis o de la esplenomegalia (Organización Mundial de la Salud (OMS) 2008). Los criterios de la European LeukemiaNet (ELN) para la definición de FA o CB difieren de los de la World Health Organization (WHO) fundamentalmente en el número de blastos ya que la ELN requiere un 30% de blastos en SP para la definición de CB y entre 15-30% para la de FA⁸⁶.

La prueba diagnóstica inequívoca de la enfermedad es, en la mayoría de los casos, la detección de su alteración patognomónica, el cromosoma Ph, junto a la identificación del tipo de transcrito BCR-ABL, en SP o MO, por PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) cualitativa. En menos del 5% de los casos, el cromosoma Ph no puede ser detectado en el cariotipo y el diagnóstico se confirma mediante métodos de genética molecular como las técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) o mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR). En caso de que no se detecten los transcritos “convencionales” mencionados arriba hay que proceder a técnicas de secuenciación^{86,87}.

Hasta la fecha se han descrito tres sistemas de estratificación del riesgo de los pacientes: Sokal, EURO y el más reciente EUTOS⁸⁸⁻⁹⁰, todos ellos basados en sencillos datos clínicos y de laboratorio. El primero de ellos se diseñó en 1984 para pacientes tratados con hidroxiurea o busulfán, el segundo a finales de los noventa cuando el tratamiento de elección era el IFN-alfa y, finalmente, el EUTOS ya en el seno de los ITC como fármacos de primera línea. Los dos primeros clasifican a los pacientes en tres grupos de riesgo: bajo, intermedio y alto y el EUTOS en alto y bajo riesgo. Estos índices pronóstico diferencian grupos con distintas posibilidades de respuestas óptimas al tratamiento y de supervivencia global (SG), tanto es así que se tienen muy en cuenta para la elección del tratamiento de primera línea. El tratamiento de esta patología ha evolucionado desde que se inició a principios del siglo XX con arsénico y posteriormente radioterapia y fármacos como el busulfán y la hidroxiurea, que actualmente se siguen usando para tratar a pacientes con hiperleucocitosis y trombocitosis importantes. A mediados de los años 70 la LMC comenzó a tratarse con trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos que constituía el único tratamiento curativo de la enfermedad. A principio de los años 80 se introdujo el IFN-alfa que fue el tratamiento estándar, como agente único o en combinación con citarabina, hasta la llegada

de los ITC⁹¹. El mecanismo de acción del IFN-alfa no está del todo claro pero probablemente esté relacionado con sus efectos inmunomoduladores.

Cada una de estas aproximaciones terapéuticas ha supuesto un claro aumento en la supervivencia a largo plazo de estos pacientes, aunque sin duda la auténtica revolución terapéutica ha venido de la mano de los inhibidores de la actividad tirosina cinasa de la proteína BCR-ABL, como veremos en el próximo apartado⁹².

La monitorización y el seguimiento del paciente de LMC tratado con ITC mediante la evaluación de la respuesta alcanzada es de vital importancia para la optimización de la terapia en cada caso. Así se establecen diferentes tipos de respuesta: se define respuesta hematológica (RH) cuando se produce una reducción del recuento leucocitario junto con una disminución del tamaño del bazo, y RH completa (RHC) cuando se alcanzan cifras normales de leucocitos y plaquetas y el bazo no es detectable a la palpación; la respuesta citogenética (RCy) hace referencia a la progresiva reducción o desaparición, en el caso de RCy completa (RCyC), del cromosoma Ph en el cariotipo del paciente o en el análisis de FISH sobre núcleos interfásicos. La respuesta molecular (RM) se clasifica en función de los niveles de transcritos (ARNm) de BCR-ABL detectados en el suero del paciente por RQ-PCR (tabla 2), siendo esta técnica la más sensible para la evaluación de la enfermedad mínima residual.

Tabla 2. Definición de respuesta molecular.

Respuesta molecular mayor (RMM): Ratio BCR-ABL menor de 0.1% medida en escala internacional (EI)
Respuesta molecular grado 4: Ratio BCR-ABL menor de 0.01% (EI). Incluye enfermedad indetectable en una muestra con $\geq 10\ 000$ copias de ABL.
Respuesta molecular grado 4.5: Ratio BCR-ABL menor de 0.0032% (EI). Incluye enfermedad indetectable en una muestra con ≥ 32000 copias de ABL.
Respuesta molecular grado 5: Ratio BCR-ABL menor de 0.001% (EI). Incluye enfermedad indetectable en una muestra con $\geq 100\ 000$ copias de ABL.

4. Inhibidores de las tirosina cinasas

La demostración de que la proteína BCR-ABL1 es responsable de la patogénesis de la LMC, la convirtió en una óptima diana terapéutica y favoreció el desarrollo de los inhibidores de la actividad tirosina cinasa o ITC⁹³. Los ITC constituyen actualmente la primera línea de tratamiento de esta enfermedad ya que son fármacos de administración por vía oral, con escasos efectos secundarios, que han mejorado notablemente el manejo de estos pacientes ^{94,95} y que, sobre todo, han modificado radicalmente su pronóstico, con un incremento de la esperanza de vida de un 85%. De hecho, se considera que la esperanza de vida actual de estos pacientes se acerca a la de la población sana en menores de 60 años.

4.1. Tratamiento con los ITC de primera generación: Imatinib

El imatinib es el primer inhibidor selectivo de la proteína tirosina cinasa BCR-ABL aprobado para el tratamiento de la LMC. Imatinib es una fenilaminopirimidina que bloquea el sitio de unión del ATP en la región catalítica de las cinasas de ABL, del receptor de PDGF y del receptor c-Kit, inhibiendo la fosforilación del sustrato y la activación de las vías de señalización que este último desencadena⁹³ (Figura 7).

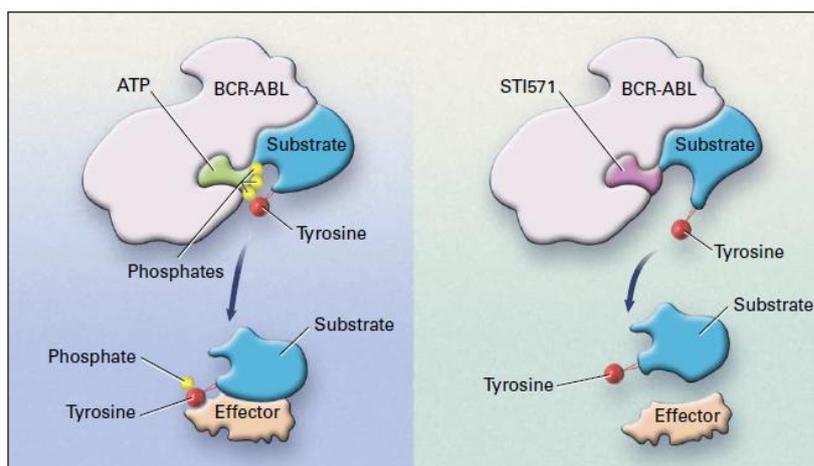


Figura 7. Mecanismo de acción de imatinib.

Extraída de Goldman et al (2001)⁷⁶.

Imatinib fue el primero de los ITC que se comercializó y pronto se convirtió en el tratamiento de elección en la LMC Ph+ ⁹³, en base a los resultados de estudios clínicos como el IRIS (*International Randomized Study of Interferon and STI571*), que demostró las ventajas significativas de la terapia con imatinib sobre el IFN- α -ARA-C (citarabina o arabinósido de citosina), entre las que se incluía, además de la respuesta al tratamiento, una mayor SG. La última actualización de los datos de seguimiento de dicho estudio durante diez años, confirman a largo plazo los éxitos precoces de los pacientes tratados con imatinib. No ha habido nuevas alertas de seguridad o efectos adversos (EA) serios relacionados con la medicación. La tasa estimada de SG a los 10 años en los pacientes tratados con imatinib fue del 83,3%. El éxito terapéutico del imatinib unido a la aparición de casos de resistencia e intolerancia a este fármaco^{96,97}, que afectan al 50% de los pacientes, llevaron al desarrollo de los ITC de segunda generación, como dasatinib, nilotinib y bosutinib.

4.2. Tratamiento con los ITC de segunda generación: Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib.

Dasatinib. Dasatinib (BMS-354825, Bristol-Myers Squibb) es una tiazol-5-carboxamida (Figura 8), no relacionada estructuralmente con imatinib, que inhibe BCR-ABL con independencia de su conformación activa o inactiva⁹⁸, pero también a la familia de las SRC cinasas (SRC, LCK, HCK, YES,

FYN, FGR, BLK, LYN, FRK), a receptores de tirosina cinasa (c-kit, PDGFR, DDR1 y 2, c-FMS, receptor de efrina), y la familia de TEC cinasa (TEC y BTK).

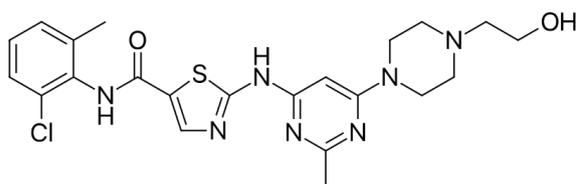


Figura 8. Estructura química de dasatinib.

Extraída de PubChem.

La característica más importante de dasatinib es su potencia, 300 veces superior a la de imatinib, y su actividad frente a muchas de las mutaciones de BCR-ABL que confieren resistencia a imatinib^{99,100}. Inicialmente, dasatinib fue aprobado como tratamiento de segunda línea para aquellos pacientes resistentes o intolerantes a imatinib y ese es el contexto temporal en el que se enmarca esta tesis. Actualmente, dasatinib está indicado en el tratamiento de pacientes adultos con LMC Ph+ en cualquiera de las fases de la enfermedad y en las leucemias linfoblásticas agudas Ph+ con resistencia o intolerancia a otros tratamientos, incluido imatinib^{101,102}.

Además, como hemos mencionado arriba, dasatinib también inhibe el receptor de tirosina cinasa c-KIT, que participa en las vías de proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Mutaciones activadoras de c-KIT están asociadas con diferentes patologías, como neoplasias hematológicas tipo leucemia mieloblástica aguda, mastocitosis o tumores gastrointestinales, que son por tanto susceptibles de tratamiento con dasatinib¹⁰³.

La familia de las SRC cinasas participa en la transducción de señales celulares implicadas en división, migración e invasión celular. A través de su inhibición, dasatinib promueve la apoptosis en determinados tumores, controla su expansión metastásica y actúa sobre el microambiente tumoral¹⁰⁴. Además, dasatinib aumenta la sensibilidad de las células tumorales a distintas terapias por lo que este ITC se propone como terapia en combinación para otras neoplasias, incluyendo tumores sólidos (mama, próstata, melanoma¹⁰⁵).

Para comparar la eficacia terapéutica y la seguridad de dasatinib versus imatinib, se diseñó el estudio DASISION¹⁰⁶ que comparó los resultados del tratamiento en primera línea de pacientes con LMC en FC con dichos fármacos. La tasa de RCyC confirmadas a los 12 meses, que representaba el objetivo primario del estudio, fue significativamente mayor en la rama de dasatinib 100mg QD (83% frente 72%, respectivamente; $p=0.001$), al igual que la tasa de RMM tanto a los 12 meses (46% frente a 28%, $p=0.0001$) como en cualquier momento de la evaluación. Los tiempos en alcanzar RCyC y RMM fueron significativamente menores en la rama de pacientes tratados con dasatinib, aunque no se encontraron diferencias significativas entre las tasas estimadas de supervivencia libre de progresión (SLP) y SG a los 12 meses entre ambos fármacos. Los resultados del estudio DASISION a los cinco años confirmaron que

la tasa de RMM es superior en los pacientes tratados con dasatinib y que no existen diferencias en SLP y SG entre los dos brazos de tratamiento¹⁰⁷.

Nilotinib. Nilotinib es una fenilaminopiridina de segunda generación que inhibe BCR-ABL. Al igual que imatinib, nilotinib se une a la conformación inactiva del dominio tirosina cinasa de ABL1, pero a diferencia de aquel, lo hace con mayor afinidad y especificidad¹⁰⁸. El resultado es que, *in vitro*, nilotinib es un inhibidor de BCR-ABL de entre 10 a 50 veces más potente que imatinib. Además de BCR-ABL, nilotinib también tiene actividad frente a otras kinasas como c-KIT y PDGFRa/b, con una potencia similar a imatinib¹⁰⁸. A diferencia de los otros ITC de segunda generación (dasatinib y bosutinib), nilotinib ejerce mínimos efectos sobre la familia SRC cinasa¹⁰¹. En la actualidad, nilotinib está aprobado como fármaco en primera línea para pacientes con LMC Ph+ en FC así como para aquellos en FC o FA con resistencia o intolerancia a un fármaco previo, incluyendo imatinib.

Bosutinib. Bosutinib, una molécula estructuralmente diferente de dasatinib y nilotinib, es un inhibidor dual de las tirosina kinasas de SRC y ABL, mientras que su actividad sobre el receptor c-KIT y PDGF es mínima. Está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con LMC Ph+ en FC, FA o FB, tratados previamente con uno o más ITC y para quienes imatinib, nilotinib y dasatinib no se consideran opciones adecuadas de tratamiento. Además, bosutinib ha sido aprobado recientemente como tratamiento de primera línea.

4.3. ITC de tercera generación: Ponatinib

Ponatinib es un potente inhibidor de BCR-ABL que por sus características estructurales inhibe también SRC, c-KIT y PDGFR, entre otros. Fue desarrollado con el fin de tratar a los pacientes con la mutación T315I que confiere una gran resistencia al tratamiento con los ITC de primera y segunda generación¹⁰⁹. De hecho, es el único ITC aprobado con actividad en los pacientes con dicha mutación. En la actualidad, ponatinib se consolida como tratamiento de rescate para pacientes con LMC o LAL Ph+ que sean resistentes o intolerantes a dasatinib o nilotinib, o en los que no esté indicado el tratamiento con otros ITC, o que presenten la mutación T315I.

4.4. Efectos adversos del tratamiento con los ITC

En general, la tolerancia al tratamiento con los ITC en los pacientes de LMC es buena, si bien la mayoría de los pacientes desarrollará algún EA leve o moderado, que habitualmente son reversibles, incluso de forma espontánea, y habitualmente no obligan a interrumpir el tratamiento¹¹⁰. Estos EA son debidos en general a la falta de especificidad de los ITC y, dada la duración de estos tratamientos, es importante tener en cuenta las comorbilidades y las interacciones con otros fármacos que esté tomando el paciente, así como la posibilidad de desarrollar EA a largo plazo.

Los EA se clasifican en hematológicos y no hematológicos y, en función de la gravedad según criterios del NCI (*National Cancer Institute*), en grados 1 (leve), 2 (moderado), 3 y 4 (severo). Las citopenias son muy frecuentes durante el tratamiento con ITC, sobre todo al principio, y se deben tanto a la reducción o desaparición del clon leucémico como a la supresión ejercida por este último sobre la

hematopoyesis normal, que tarda semanas o meses en recuperarse. Por lo tanto, las citopenias se pueden considerar más una expresión de eficacia que de toxicidad, como lo demuestra la asociación entre la aparición de aquéllas durante los primeros meses de tratamiento con imatinib y el pronóstico a largo plazo^{111,112}. Por otra parte, los ITC son capaces de comprometer las funciones normales de las células madre hematopoyéticas de una manera directa. En particular, en el espectro de inhibición de varios ITC se encuentra la familia de las SRC cinasas, que incluye Lyn o Fyn, implicadas en funciones como la agregación plaquetaria o la megacariocitopoyesis^{113,114}. La mayoría de los efectos hematológicos ocurren en los primeros meses y constituyen la causa principal de la reducción de la dosis o la interrupción del tratamiento. Por este motivo, al comenzar un tratamiento con ITC, los controles hematológicos deben realizarse con frecuencia.

Entre los EA no hematológicos de los ITC destacan los eventos cardiovasculares como la patología isquémica, la trombosis arterial y venosa, y la enfermedad oclusiva de arterias periféricas, que se dan sobre todo con nilotinib y ponatinib¹¹⁵. Los eventos cardiacos no son frecuentes pero sí potencialmente graves, y por tanto es necesaria la monitorización de la función cardiaca en el tratamiento con el ponatinib. Son frecuentes, sin embargo, los efectos secundarios gastrointestinales entre los que destacan las náuseas y la diarrea, el dolor abdominal y los vómitos, así como la toxicidad hepática. Los EA endocrinológicos incluyen la hiperglucemia y la hipofosfatemia. En cuanto a los EA cutáneos destacan los edemas periféricos y la fragilidad cutánea, frecuentes con imatinib pero no con otros, y diferentes tipos de erupciones que se pueden dar con cualquier ITC.

Dasatinib es en general un fármaco bien tolerado en los pacientes con LMC de nuevo diagnóstico. Estudios clínicos como el DASISION donde se evalúan y comparan seguridad y eficacia de imatinib y dasatinib demuestran que la mayoría de los EA no hematológicos de cualquier grado, incluidos la retención hídrica, náusea, vómitos, mialgia y erupción cutánea, fueron menos frecuentes con dasatinib que imatinib. La frecuencia de diarrea y fatiga fueron similares en ambos grupos, mientras que el derrame pleural, la cefalea y las citopenias fueron más frecuentes en los pacientes tratados con dasatinib^{106,116}. La mayoría de estos EA son reversibles una vez se suspende el tratamiento.

Los resultados presentados en esta tesis pueden contribuir al conocimiento de la patogénesis de algunos de los EA más característicos o específicos de dasatinib. Por ello, nos detendremos en dichos EA y no en otros. En concreto, la incidencia de derrame pleural en los pacientes tratados con dasatinib se ha relacionado directamente con la edad y la dosis del fármaco, es más frecuente en fases avanzadas de la enfermedad (FA y CB), y la hipertensión pulmonar y el fallo cardíaco preexistentes también son factores de riesgo para su desarrollo. Otras variables asociadas a mayor riesgo de derrame pleural son episodios previos de alteraciones autoinmunes y erupción cutánea durante la terapia con imatinib^{117,118}. Los mecanismos por los cuales se produce el derrame pleural no están bien caracterizados y su patogenia parece ser multifactorial; podría estar relacionado con la inhibición de cinasas por dasatinib como PDGFR-beta, que se expresa en los pericitos y es importante en la regulación de la angiogénesis. Otro factor patogénico importante sería la inhibición de las SRC cinasas Yes y Src, que participan en la

regulación de la permeabilidad vascular mediada por VEGF y de la estabilidad del epitelio pleural a través de la regulación de la adhesión celular^{118,119}. Otros autores sostienen que el derrame pleural tiene base inmunitaria por la asociación observada entre la linfocitosis inducida por dasatinib en SP y la acumulación de linfocitos en el líquido pleura¹²⁰.

Además, el tratamiento con dasatinib se ha asociado a eventos de sangrado, fundamentalmente a nivel del tracto gastrointestinal¹¹³. Los mecanismos subyacentes no han sido completamente caracterizados, pero al igual que sucede con el derrame pleural se supone que la acción de dasatinib sobre cinasas *off-target* en las células que componen la barrera vascular o que regulan la megacariocitopoyesis y la agregación plaquetaria^{114,121}, favorecen los fenómenos hemorrágicos. Así, el incremento del riesgo de sangrado puede deberse a una disminución de la agregación plaquetaria inducida por dasatinib, como se ha demostrado en un 80% aproximadamente de los pacientes¹²². Por su parte, Mazharian et al. han demostrado en un modelo *in vivo* que la trombocitopenia observada con dasatinib es debida a una inhibición de la formación plaquetaria¹²³. Este grupo demostró además que el efecto de dasatinib sobre la familia de las SRC cinasas afectaba de una manera importante a la biología de los megacariocitos tanto *in vivo* como *in vitro*¹²⁴.

Por su parte, en el momento de iniciar esta tesis, no había ninguna evidencia experimental del efecto de dasatinib sobre la integridad y la permeabilidad del endotelio vascular.

4.5. Efectos inmunomoduladores de los ITC

Distintos estudios preclínicos y clínicos han demostrado que los ITC, a través de sus efectos *off target*, pueden afectar al número y las funciones de las diferentes células del SI, si bien los efectos inmunomoduladores descritos *in vitro* en la caracterización de los ITC parecían contradictorios con los efectos posteriormente observados en los pacientes.

En cuanto a la inmunidad humoral, algunos pacientes con LMC tratados con imatinib desarrollan hipogammabulinemia que generalmente no tiene repercusión clínica¹²⁵. En el caso de dasatinib, algunos sujetos experimentan una disminución de las inmunoglobulinas similar a la descrita para imatinib, y algunos estudios *in vitro* y en modelos animales sugieren que este ITC inhibe la proliferación y la función de los ILT (incluyendo los LT reguladores) y de las células NK; pero sin duda, su efecto inmunomodulador más característico en los pacientes es el desarrollo de una linfocitosis absoluta en SP, a expensas de un aumento del número de linfocitos grandes granulares (LGL) que incluyen células NK, NKT y LT citotóxicos CD8+ ¹²⁶⁻¹²⁸. En un estudio que incluía los principales ensayos clínicos con dasatinib, Schiffer et al. concluyen que este fenómeno, experimentado fundamentalmente en el tratamiento con dasatinib y no con imatinib, se produce en alrededor del 32% de los pacientes, persiste como mínimo 1 año en el 50% de los pacientes y se da en igual proporción en las diferentes fases clínicas; la linfocitosis aparece relativamente rápido, en la mayoría de los casos entre los 3 y los 5 meses tras iniciar el tratamiento con dasatinib, si bien no se especifica en qué momento tras la toma de dasatinib¹²⁹ se realizó el recuento de los linfocitos en los diferentes estudios. Este dato es muy relevante

ya que dasatinib produce un aumento transitorio de linfocitos en la mayoría de los pacientes, cuya magnitud se correlaciona con los niveles de dasatinib en el plasma de los pacientes y que alcanza su máximo pico entre 1 y 2 horas después de la toma del fármaco, para decaer rápidamente después de 3-4 horas. En este caso, el aumento de linfocitos es sobre todo a expensas del incremento de la proporción de células NK y LB, aunque aumenta el valor absoluto de todas las subpoblaciones linfocitarias de SP¹³⁰.

La presencia de linfocitosis ($>3.6 \times 10^9/L$) y el predominio de LGL en SP se han asociado a mayores tasas de RCC y RMM así como a una respuesta prolongada en pacientes tratados con dasatinib. Además, los pacientes con LMC en FC que son resistentes o intolerantes a imatinib (pero no los pacientes tratados con dasatinib en primera línea) que desarrollan linfocitosis tienen una mayor SLP y SG¹²⁹. Como posible explicación a este hallazgo, Mutsjoki et al. proponían que la linfocitosis observada en los pacientes durante el tratamiento con dasatinib podría asociarse a un estado reversible de reactividad autoinmune con efecto anti-leucemia inducido por dasatinib¹²⁷. Además, el mismo grupo publicó que el tratamiento con dasatinib se asocia con un aumento de LT CD4+ Th1 y T CD8+ productores de IFN-gamma así como a un aumento de la citotoxicidad de las células NK¹³¹, que podrían explicar el control de la enfermedad.

Las causas de la linfocitosis no han sido claramente dilucidadas y el único experimento funcional que ha intentado explicarla asocia la linfocitosis a una mayor transmigración endotelial leucocitaria de los linfocitos de los pacientes¹³⁰, que no se pudo confirmar en experimentos *in vitro* en los que se trataba linfocitos con dasatinib. En los pacientes, la linfocitosis no se relaciona con la edad ni con el sexo; se ha asociado a la reactivación de LT específicos de CMV aunque hay estudios contradictorios al respecto. El estudio de los efectos inmunomodulares de los ITC, y en nuestro caso en concreto de dasatinib, es de especial relevancia en la LMC ya que es uno de los cánceres hematológicos en el que el potencial curativo del SI es más evidente. Así, la remisión completa que sigue al trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos en esta enfermedad se atribuye al efecto injerto contra leucemia mediado por los LT y NK procedentes del donante que reconocen ag menores de histocompatibilidad y ag específicos de las células de la LMC¹³². Además, en los casos de recaída postrasplante, el éxito del tratamiento de los pacientes con una infusión de linfocitos del donante¹³³ demostró el importante papel del SI en el control de esta enfermedad comparado con otras hemopatías malignas.

En el momento de iniciar esta tesis los datos sobre los efectos inmunomoduladores de los ITC eran contradictorios¹³⁴, pero ya se sospechaba que estos fármacos, además del control directo de la célula tumoral a través del bloqueo de su diana terapéutica, muy posiblemente estuviesen contribuyendo a la recuperación numérica y funcional del SI y con ello al control de la enfermedad.

La profundización de estos aspectos, así como de la patogénesis de algunos de los EA más graves del tratamiento con dasatinib, fueron las principales motivaciones de la presente tesis.

Objetivos

Dasatinib es un inhibidor de tirosina cinasa de segunda generación que se emplea como fármaco de primera línea en el tratamiento de la LMC y que induce respuestas moleculares más profundas que los de primera generación. Esta mayor eficacia se ha atribuido a efectos terapéuticos poco caracterizados de dasatinib sobre un sistema inmunitario con competencias reducidas por la acción crónica de la neoplasia. Se trata, sin embargo, de un fármaco que produce efectos adversos graves como el derrame pleural y la hemorragia intestinal, que conllevan la interrupción del tratamiento y cuya patogénesis se desconoce.

Proponemos por tanto la hipótesis de que el conocimiento de los efectos de la LMC y del tratamiento crónico con dasatinib sobre el sistema inmunitario, así como la investigación de la patogénesis de sus principales efectos adversos pueden mejorar notablemente el manejo terapéutico de los pacientes de LMC.

Para confirmar esta hipótesis proponemos los siguientes objetivos:

1. Estudiar los efectos de la LMC y del tratamiento crónico con dasatinib sobre el fenotipo de los linfocitos de sangre periférica de los pacientes.
2. Caracterizar la linfocitosis "aguda" y "crónica" inducida por dasatinib a través del estudio del fenotipo y la capacidad migratoria de los linfocitos de los pacientes de LMC.
3. Investigar la posible asociación de la respuesta clínica al tratamiento con dasatinib con alguno de los parámetros inmunológicos estudiados.
4. Evaluar el efecto de dasatinib sobre la función de barrera del endotelio vascular y explorar el mecanismo molecular implicado en el aumento de permeabilidad vascular producido por el fármaco.

Material y Métodos

1. Pacientes

En este estudio se han incluido sesenta y un pacientes diagnosticados de LMC Ph+. De ellos, veintidós se estudiaron en el momento del diagnóstico y antes de iniciar tratamiento, veintiuno estaban en tratamiento crónico (al menos seis meses) con dasatinib y dieciocho pertenecían al Estudio Dasapost “Ensayo clínico Fase II multicéntrico, abierto, no aleatorizado de dasatinib en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica en Fase Crónica (LMC-FC) con criterios de respuesta subóptima tardía tras tratamiento con imatinib; N° EudraCT: 2012-004259-36”. El ensayo está registrado como NCT01802450. Los principales criterios de inclusión de este último fueron la edad mínima de 18 años, padecer una LMC Ph+ en primera FC, haber estado en tratamiento con 400-600 mg/día de imatinib durante al menos 18 meses y que cumplieran criterios de respuesta subóptima tardía (RCyC sin RMM) o que hayan perdido la RMM tras al menos 18 meses de tratamiento con imatinib. La media desde el diagnóstico hasta el cambio a dasatinib fue de 2,6 años (1,6-23). Las medias desde el inicio de tratamiento con imatinib hasta CCyR y la media de exposición a Imatinib fue de 1,4 años (0,2-12) y 2,4 años(1,6-14), respectivamente. Las principales características clínicas se especifican en la tabla 3.

Las muestras procedentes de otros centros se recibieron en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario La Princesa dentro de las 24h después de su extracción.

En el caso del ensayo clínico las muestras se obtuvieron tras un periodo mínimo de lavado de 7 días tras la última toma de imatinib, en coincidencia con la primera toma de dasatinib (tiempo 0), y a los 3 y 6 meses de iniciar esta segunda línea de tratamiento, y en todos los casos se extrajeron muestras antes de la toma de dasatinib (muestras “pre”) y una hora después (muestras “post”).

Tabla 3. Principales características clínicas de los 18 pacientes del ensayo clínico Dasapost.

Características	
Edad (media)	59 (34-77)
Sexo (M/F)	13/85 (72%/28%)
Riesgo (Sokal) (B//A)	22.5%/50%/22.5%
Media de la duración del tratamiento previo con imatinib (años)	2,4 (1,4-14,2)
Tiempo en Respuesta Citogenética completa (años)	1,4 (0,2-12)
Comorbilidades:	
Accidentes Cardiovasculares previos	5 (22%)
Cáncer previo	4 (22%)

Los pacientes en tratamiento crónico con dasatinib eran veintiuno. El único criterio de inclusión era estar en tratamiento con dasatinib desde hacía al menos seis meses y la media de duración del

tratamiento fue de 17 de meses. De estos veintidós pacientes en tratamiento con dasatinib, diez eran pacientes que recibieron el fármaco en primera línea y once lo recibieron en segunda línea. Las muestras se obtuvieron en cualquier momento del tratamiento, en coincidencia con uno de sus análisis rutinarios en el hospital, y también se extrajeron muestras pre y post. La edad media de este grupo de pacientes fue cuarenta y nueve años (26-76). Este estudio fue aprobado por el Comité ético de investigación clínica del Hospital Universitario de La Princesa en su reunión del 27 de octubre de 2011 (número de registro NCT01802450). Todos los pacientes fueron debidamente informados y firmaron el consentimiento informado correspondiente. Como grupo control se analizaron 16 sujetos sanos.

Las muestras de SP se recogieron en 2 tubos de 5 mL con anticoagulante EDTA. De estas muestras de SP, se obtuvo plasma por decantación que se congeló para algunas determinaciones que requería el ensayo clínico Dasapost. A todas las muestras se les realizó un hemograma así como una extensión y tinción Giemsa. Para algunos experimentos, se utilizó la fracción celular mononuclear de SP (PBMC) aislada mediante gradiente de densidad en ficol. Las PBMC posteriormente se lavaron y se mantuvieron con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 50ug/ml penicilina/estreptomicina/glutamina 2mM y con 10% de suero bovino fetal hasta el momento de la realización del experimento en cuestión.

2. Hemograma

En las muestras de 5 mL de SP con EDTA enviadas al laboratorio de Hematología y durante las 24 horas siguientes a la extracción, se realizó el hemograma con el contador automático Sysmex XT 1800i (Roche, Basilea, Suiza). El estudio incluía el análisis de la serie eritroide (hemoglobina (gr/dL), número de hematíes (millones/mm³) y volumen corpuscular medio (fl), el análisis de la serie leucocitaria (miles/mm³, con su correspondiente fórmula leucocitaria) y el análisis de la serie plaquetar (miles/mm³).

3. Citometría de flujo

La caracterización inmunofenotípica de las subpoblaciones linfocitarias de los pacientes se llevó a cabo mediante CMF multiparamétrica de ocho colores. Antes de realizar la caracterización definitiva en las muestras de los pacientes, los anticuerpos monoclonales (AcMo) se titularon y se verificó la idoneidad de los paneles para discriminar las distintas subpoblaciones positivas y negativas en las diferentes subpoblaciones linfocitarias hasta su configuración definitiva, tal y como se describe en la Tabla 4):

Tabla 4. Panel de AcMo que se usaron en citometría de flujo.

Tubos inmunofenotipo SP								
TUBO	FITC	PE	PERCP	PECY7	APC	APC-H7	PB	PO
1	TCR $\gamma\delta$	CD56	CD3		CD4	CD8	CD16	CD45
2	CD45RA	CCR7	CD3	CD45RO	CD62L	CD8	CD56	CD45
3	HLA-DR	CD11c	CD3	CD38	CD11B	CD8	CD56	CD45
4	CD57	CXCR3	CD3	CD25	CD7	CD8	CD56	CD45
5	PD1	CD27	CD3	CXCR4	CD28	CD8	CD56	CD45
6	NKG2C	NKp46	CD3	NKG2D	NKp30	CD8	CD56	CD45
7	KIR2DL1/S1	2DS4	KIR2DL1	CD3	KIR2DL4	CD8	CD56	CD45
8	NKG2C	2DL2/L3/S2	KIR2DL1	CD3	NKG2A	CD8	CD56	CD45
9	DNAM	3DL1	CD3		CD161	CD8	CD56	CD45
Tubo Transwell								
TUBO	FITC	PE	PERCP	PECY7	APC	APC-H7	PB	PO
1	CD3	CD19	CD8		CD4	CD45	CD56	

La calibración del equipo se realizó empleando distintos tipos de microesferas y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la compensación del equipo se utilizaron muestras de SP marcadas con los paneles de AcMo indicados en la tabla, y se ajustaron las señales de fluorescencia y voltajes de cada detector con el fin de asegurar una discriminación adecuada entre las señales positivas y negativas.

Para la inmunofluorescencia previa al análisis de citometría, se utilizaron 100ul de SP por muestra que se incubaron con los AcMo correspondientes durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los eritrocitos fueron lisados mediante incubación durante 10 minutos con la solución lisante Pharm Lyse. Tras dos lavados con PBS, se adquirieron al menos 100000 eventos CD45+ en un citómetro FACSCanto II, previamente calibrado y compensado, usando el software de adquisición FACSDiva.

Debido a la combinación de fluorocromos de nuestro panel, los linfocitos T CD4+ fueron seleccionados como aquellos que presentan el fenotipo CD3+CD8- en los tubos 2-9, tras verificar que su porcentaje coincide con el porcentaje de LT CD3+CD4+ del tubo 1 (Tabla 4). La estrategia de análisis para la identificación de las subpoblaciones correspondientes a los distintos estadios de diferenciación de los LT (Figura 9) así como de las subpoblaciones NK (Figura 10), realizada también con el software FACSDiva, se muestra a continuación:

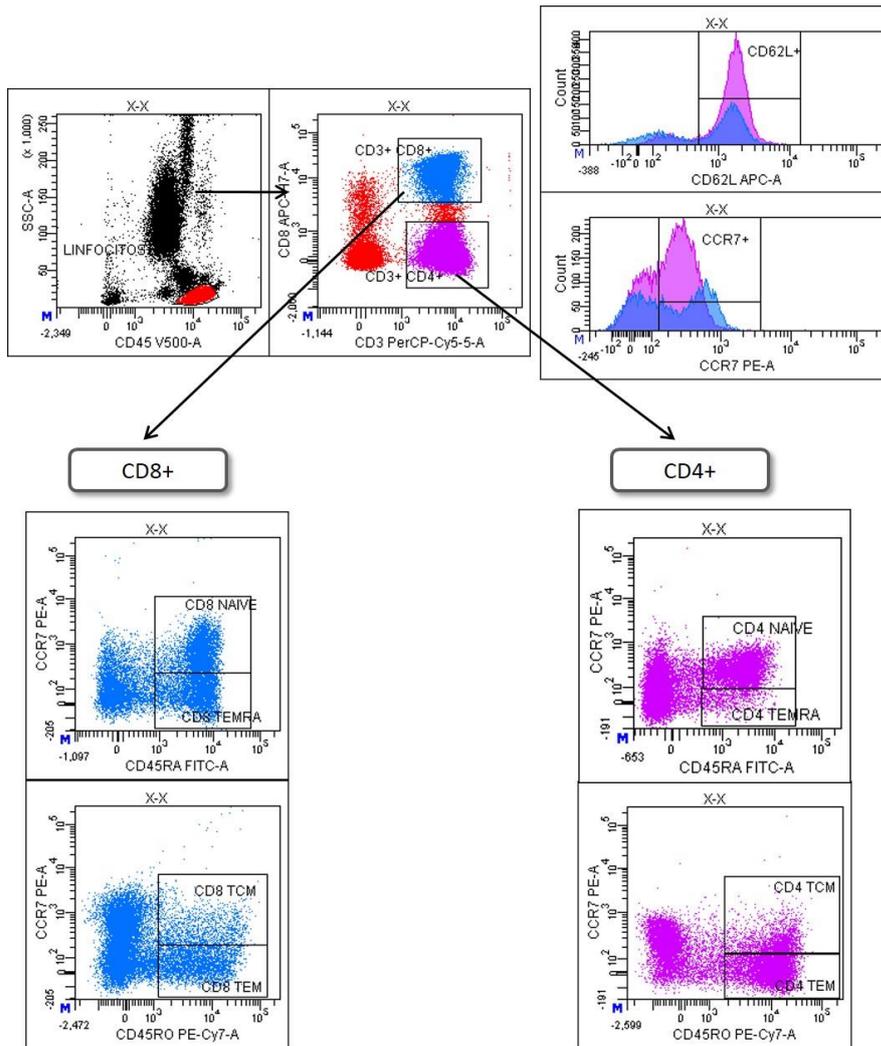


Figura 9. Estrategia de análisis multiparamétrico por citometría de flujo para la identificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T. En un primer paso se seleccionan los linfocitos en el dot plot que enfrenta el marcador pan leucocitario CD45 y la complejidad (color rojo); a continuación, seleccionamos los linfocitos T con los marcadores CD3 y CD8 (color morado y azul, respectivamente). Las diferentes subpoblaciones de linfocitos, tanto T CD4+ como CD8+, se identifican mediante las moléculas CD45RO, CD45RA y CCR7+.

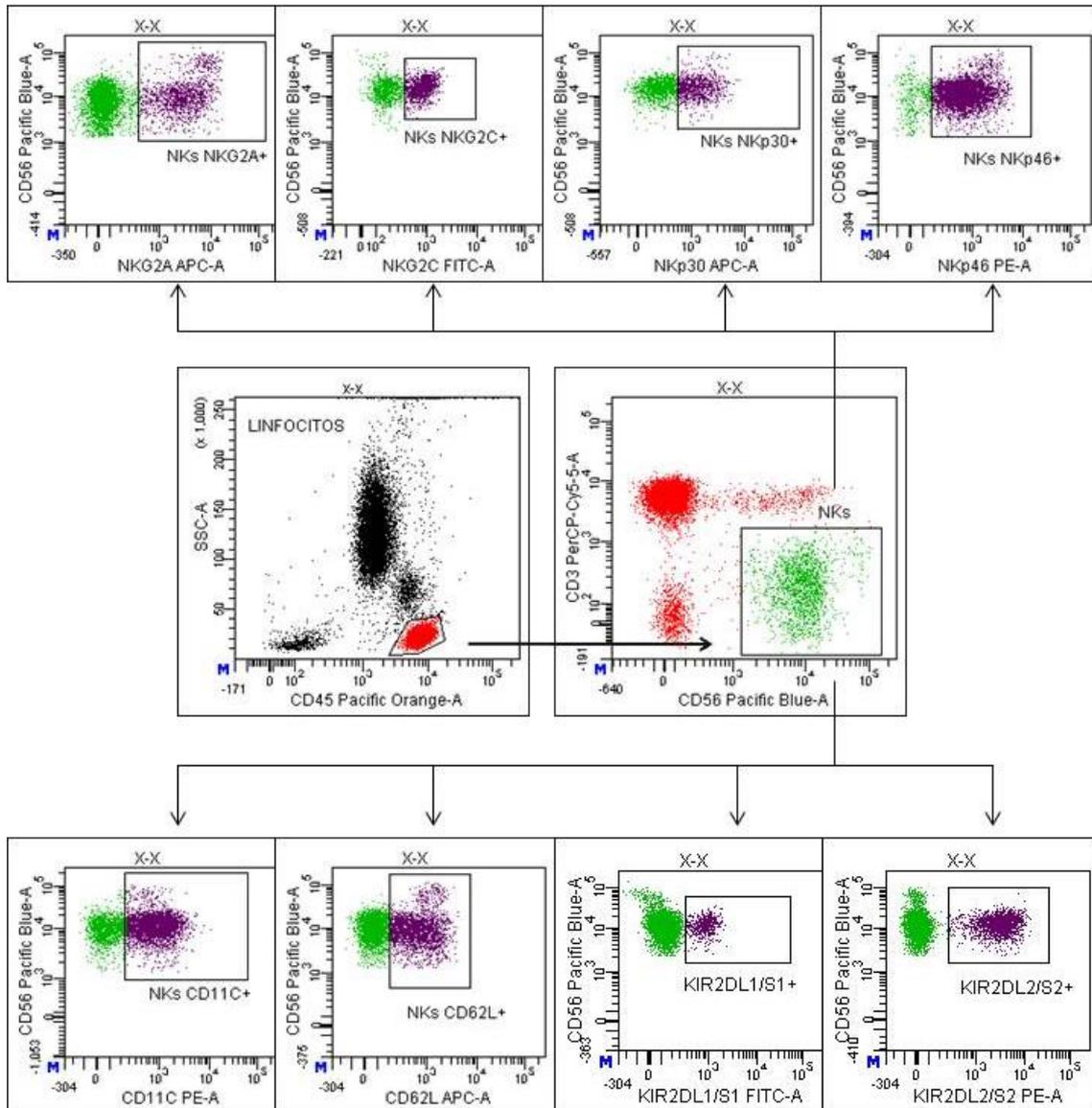


Figura 10. Estrategia de análisis multiparamétrico por citometría de flujo para la identificación de la expresión de los diferentes receptores de células NK. En un primer paso se seleccionan los linfocitos en el dot plot que enfrenta el marcador pan leucocitario CD45 y la complejidad (color rojo); a continuación, seleccionamos los linfocitos NK con los marcadores CD3 y CD56 (color verde).

Las subpoblaciones linfocitarias se expresan como porcentaje sobre los linfocitos totales y/o como porcentaje sobre las subpoblaciones de LT, LB y NK, y/o como valores absolutos.

4. Ensayos de migración *in vitro*.

Para el estudio de la quimiotaxis de linfocitos se usaron cámaras "Transwell" con diámetro de 6.5mm, un grosor de 10um y un tamaño de poro de 5um de diámetro (Costar, Cambridge, MA, USA), que se dispusieron sobre placas de 24 pocillos. Los PBMC de los pacientes se incubaron durante 30min con medio incompleto suplementado con 0,5% BSA (albúmina de suero bovino). En cada cámara superior se

dispuso un total de 5×10^5 PBMC suspendidas en 100ul de medio RPMI-1640 +0,1% FBS. Las quimiocinas humanas recombinantes CCL19 y CCL21 se añadieron conjuntamente en la parte inferior del pocillo, en 600ul del mismo medio a la concentración óptima de 1ug/ml (PeproTech, Rocky Hills, NJ, USA). Para el control de migración basal se añadieron 600ul de medio incompleto sin quimiocinas. La migración tuvo lugar durante 3 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Las células que migraron fueron recogidas en la cámara inferior y se marcaron con los anticuerpos monoclonales que se especifican en la tabla 4. Tras el marcaje, las células se contaron por citometría de flujo durante 250 segundos.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de células que migran en respuesta a CCL19 y CCL21 con respecto a las células añadidas en la suspensión inicial o mediante el índice de migración, definido como el número de células que migran en respuesta a CCL19 y CCL21 con respecto a las células que han migrado en el control basal.

5. Cultivo de células endoteliales

Las células endoteliales de la vena umbilical humana o HUVEC fueron aisladas de donantes altruistas de cordón umbilical, según un protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio. Brevemente, se introduce una cánula en la vena del cordón umbilical, se lava con suero salino fisiológico y se incuba con colagenasa 0,03% a 37° durante 30 minutos minutos, tras pinzar los dos extremos de la vena. Transcurrido ese tiempo se acopla una jeringa con suero fisiológico a la cánula, se arrastra el contenido celular de la vena, se lava dos veces con suero salino y la suspensión celular se cultiva con medio de cultivo 199 suplementado con 20%FBS, 0.4%heparina-extracto de cerebro (ECGS/H PromoCell Cat N°: C-30120), en placas p60 tapizadas con previamente con gelatina 0.02%. Las HUVEC se utilizan hasta un cuarto pase.

6. Estudio de impedancia

La impedancia eléctrica es una medida indirecta de la adhesión celular y por tanto de la integridad de la monocapa de las células endoteliales. Para estudiarla, se utilizó el equipo iCELLigence real-time cell analyzer (RTCA) que mide la adhesión celular en tiempo real usando unas placas especiales llamadas *E-plates* proporcionadas por el equipo (ACEA Biosciences Inc.). Estas placas están tapizadas con microelectrodos de oro que presentan alta densidad y permiten medir la impedancia eléctrica. (ACEA Biosciences Inc.). El biosensor iCELLigence mide adhesión celular que es convertida en un índice celular, con unidades arbitrarias, por el software version 1.1.1501.

Se cultivaron 10^4 células HUVEC por pocillo en *E-plates* de 8 pocillos hasta confluencia. Una vez que alcanzaron confluencia se midió la impedancia en las placas cada minuto durante 24h. Al día siguiente de alcanzar confluencia, se añadieron los siguientes ITC a las siguientes concentraciones y por duplicado: dasatinib 5 nmol/L, 10 nmol/L, 25nmol/L, 50nmol/L, 100nmol/L; imatinib 2 μ mol/L y 10 μ mol/L; nilotinib 1 μ mol/L y 5 μ mol/L; bosutinib 100nmol/L y 500nmol/L; ponatinib 20nmol/L y 100nmol/L. Las placas se colocaron en el RTCA y se realizaron las medidas de impedancia cada minuto durante 24h. La señal basal o *background* se considera la señal de un pocillo con 400ul de medio de cultivo. Los resultados se

normalizaron en función de la última medición antes de añadir el tratamiento, según indicaciones del manual del software del iCelligence.

7. ITC

Los ITC, dasatinib, imatinib, bosutinib, nilotinib, ponatinib, utilizados para los experimentos in vitro se obtuvieron de LC laboratories (Woburn, MA, USA) o Selleckchem (Houston, TX, USA), a las concentraciones que se alcanzan en el plasma de los pacientes. Los tiempos de tratamiento in vitro se ajustaron a los tiempos en los que dasatinib alcanza su pico máximo de concentración plasmática.

8. Microscopía de fluorescencia. Análisis de las uniones endoteliales célula-célula y célula-matriz.

Las HUVEC se cultivaron sobre cubreobjetos de 12mm recubiertos con gelatina 0,2% hasta alcanzar confluencia. Las células fueron tratadas con dasatinib (5, 10, 25, 50 y 100 nmol/L) o imatinib 10 μ mol/L o vehículo (DMSO) durante 2 horas. En los experimentos que incluían lavado, tras las 2 horas de tratamiento con dasatinib, las células fueron lavadas dos veces con HBSS, se añadió nuevo medio de cultivo sin inhibidores y se incubaron durante 1-2 horas más para estudiar la reversibilidad del efecto de los ITC. Una vez finalizados los tratamientos, las células se fijaron con paraformaldehído diluido en PBS al 4% atemperado previamente, durante 10min. Para estudiar las uniones célula-célula, las células fueron teñidas con un anticuerpo contra VE-cadherina diluido en TBS+BSA 1%. Para analizar la F-actina y la vinculina, las células fueron permeabilizadas durante 10 minutos con una solución de permeabilización a base de 0,2% Triton X-100 en TBS. Para la tinción de la F-actina las células fueron posteriormente incubadas con Faloidina-Alexa 647; para la de vinculina con una dilución 1:500 del mAb hVin-1 seguida de otra incubación con un anticuerpo secundario conjugado Alexa 568 (Invitrogen). Para adquirir las imágenes de las células se utilizó un microscopio Confocal (SP5, Leica) utilizando un objetivo Plan Aplanachromat 63 \times (NA 1.40) por iluminación con luz de la longitud de onda apropiada de láseres Argón de 488 nm (los fluorocromos utilizados con este láser son GFP y Alexa Fluor 488), diodo-61 nm (los fluorocromos utilizados con este láser son mCherry, Alexa Fluor 568 y RhodaminaX) o un láser He/Ne de 633 nm (el fluorocromo usado con este láser es Alexa Fluor 647) usando un filtro espectral e híbrido (HyD; Leica) (Tabla 5). Las imágenes fueron recogidas con el software TCS (Leica) y posteriormente analizadas con el software de análisis ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Tabla 5. Anticuerpos y reactivos usados por inmunofluorescencia (IF) y Western blot (WB).

Nombre	Casa comercial	Referencia	Especificidad	Marcaje	Uso
CD144 (VE-Cadherina)	Biologend	348501	Humano	VE-cadherina	IF
Faloidina	Invitrogen	A22287	-	Faloidina	IF
Fosfomiosina cadena ligera 2 (pMLC 2)	Cell Signaling Technology	3674S	Humano, ratón	pMLC (Tre18/Ser19)	WB
pMLC 2	Cell Signaling Technology	3671S	Humano, ratón, rata, <i>D.melanogaster</i>	pMLC (Ser19)	WB
Fosfofosfatasa específica de miosina (pMYPT1)	Cell Signaling Technology	5163T	Humano, ratón, rata, mono	MYPT1 (Tre696)	WB
pMYPT1	Cell Signaling Technology	4563T	Humano, ratón, rata, mono, perro	MYPT1 (Tre853)	WB
MYPT1 total	Cell Signaling Technology	2634T	Humano, ratón, rata, mono	MYPT1 total	WB
Miosina IIB	Biologend	909901	Humano, ratón, rata	Miosina IIB	WB
α -Tubulina (DM1A)	Sigma	T9026	Humano, ratón, rata, pollo, anfibio, hongos	α -Tubulina	WB
Y-27632	Calbiochem	688000		Inhibidor de ROCK	WB

9. Microscopía in vivo

Las HUVECs se cultivaron sobre cubreobjetos recubiertos con gelatina 0,2% durante 24h, hasta alcanzar confluencia. Para la adquisición de las imágenes DIC (del inglés, *Differential interference contrast*) *in vivo*, se utilizó un microscopio invertido automatizado (IX83, Olympus) equipado con una incubadora para generar una atmósfera a 37° y 5% de CO₂. Se añadió dasatinib 100nmol/L e imatinib 10um/L *in situ*. Las imágenes de reflexión se obtuvieron con un objetivo de inmersión 20× NA 0,75 y fueron capturadas utilizando una cámara CCD de multiplicación de electrones (ImagEM X2, Hamamatsu Photonics) y el software Xcellence (Olympus). Se capturaron imágenes cada minuto durante 1 hora. Después de 1h, las células fueron lavadas 3 veces, se añadió medio fresco sin inhibidores y se

capturaron imágenes durante 1h más. En todos los casos, las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ.

10. Ensayos de cierre de brecha o wound healing

Se cultivaron las HUVEC en microplacas de 4 pocillos glass bottom (ref: 80427, IBIDI) previamente recubiertas con fibronectina (3 µg/mL) hasta alcanzar confluencia. Se realizó una brecha vertical arrastrando una punta de pipeta estéril de 10 µl por la monocapa con ángulo de inclinación de 30 grados, sin dañar la fibronectina. Se lavó dos veces la placa con medio para eliminar los restos celulares desprendidos de la brecha. Se agregó a cada pocillo medio de cultivo con dasatinib (100 nmol/L), nilotinib (5 µmol/L), imatinib (10 µmol/L), bosutinib (500nmol/L), y sin ITC durante 12 horas. Se tomaron fotos cada 15 minutos usando el microscopio Olympus IX83 con las condiciones descritas en el apartado anterior. Las imágenes fueron procesadas y analizadas usando el software ImageJ 1.47t del NIH (Instituto Nacional de Salud, del inglés, *National Institutes of Health*).

11. Cuantificación de la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina (RLC) por densitometría.

La fosforilación en el residuo de Ser19 de la cadena ligera reguladora de la miosina se cuantificó mediante análisis densitométrico en imágenes de microscopía confocal.

Brevemente, se tomaron imágenes con las mismas condiciones de iluminación y exposición y se proyectaron en Z usando ImageJ, calculándose posteriormente la intensidad integrada de las imágenes (1024x1024). Después, se calculó la superficie total cubierta por las células utilizando una máscara umbral para delimitar los contornos celulares. Las medias obtenidas fueron: >95% para DMSO, dasatinib+Y-27632 y bosutinib; 85% para Y-27632; y 60-75% para dasatinib. La intensidad integrada se normalizó con respecto al porcentaje de cobertura de cada condición y los valores se refirieron al 100% normalizado asignado a la condición tratada con DMSO. Los datos corresponden a >10 campos (40x) de dos experimentos independientes, para un total de más de 200 célula por condición. El valor de p (diferencia estadística) de los datos se determinó de acuerdo al test Mann-Whitney tras demostrar que todas las condiciones biológicas no cumplían las condiciones de normalidad del test Shapiro-Wilk.

12. Western blot

Para llevar a cabo los experimentos de western blot las células HUVECs fueron cultivadas en placas de 24 pocillos hasta confluencia y tratadas durante 1h en las siguientes condiciones: DMSO, dasatinib 100nmol/L, dasatinib 100nmol/L+lavado, Y27632 20 µmol/L, Y27632 20 µmol/L lavado, Y27632 20 µmol/L+Dasatinib 100 nmol/L, Y27632 20 µmol/L+Dasatinib 100 nmol/L lavado, Imatinib 10 µmol/L, Nilotinib 5 mmol/L, Bosutinib 1 mmol/L. En las condiciones que incluían lavado, las células fueron tratadas

durante 1h con los compuestos indicados arriba y a continuación se retiró el medio de cultivo, se lavaron con HBSS a 37°C, se añadió medio de cultivo fresco y se incubaron durante una hora adicional.

Las células se lisaron en buffer RIPA (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Deoxicolato sódico, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) complementado con inhibidores de proteasas (Nº Cat. P8340) y fosfatasas (Nº Cat. P2745 y P5726) de Sigma-Aldrich. Las muestras se disolvieron en el buffer RIPA y se pasaron diez veces a través de una aguja de diámetro 25G. Se centrifugaron los lisados a 14,000 rpm (4 °C, 10 min) para eliminar restos insolubles en el detergente, incluyendo los núcleos. Los sobrenadantes se mezclaron con buffer Laemmli y se calentaron a 95° grados durante 5 minutos en un baño seco. Los lisados se resolvieron en geles SDS–PAGE, con una concentración del 7% de acrilamida-bisacrilamida de Applichem y trasferidas a membranas de nitrocelulosa de BioRad. Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con BSA de la empresa NZYtech al 4% en TBS y 0.1% Tween-20 (TBS-T). A continuación se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios anti pThr18/pSer19 MLC, pSer19 MLC, pThr696 MYPT1, pThr853 MYPT1, MYPT1 total, MHCIIb y tubulina (tabla 5). Tras dos lavados de 15min con TBS-T, se usaron anticuerpos secundarios conjugados a HRP de Pierce–ThermoFisher Scientific (anti-conejo Nº Cat.31460, anti-ratón, Nº Cat. 31430, USA) para detección por quimioluminiscencia. Para eliminar el exceso de anticuerpo, las membranas se lavaron cuatro veces con TBS-T y se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia Luminata Forte de Merck-Millipore (Nº Cat. WBLUF0100), en un sistema de foto-documentación LAS-4000 de Fuji-film.

13. Ensayos *in vivo* de permeabilidad endotelial.

Para los experimentos *in vivo* de permeabilidad endotelial se usaron ratones hembra C57BL/6J (The Jackson Laboratory and Envigo). Los animales fueron tratados durante tres días con dasatinib (50mg/kg), imatinib (100mg/kg), bosutinib (50 mg/kg) ó vehículo (ácido cítrico pH 3.0) por vía intraperitoneal una vez al día. Al tercer día, 30 minutos después de la administración de la droga, se inyectó Evans Blue (5 mg/mL en PBS, Sigma-Aldrich) por vía intravenosa en la vena de la cola. Los ratones fueron sacrificados a los 30 minutos y en la necropsia se recogieron y pesaron bazo, pulmones, cerebro e intestino delgado. Estos órganos fueron incubados durante 24h con 0.5mL de formamida (Sigma-Aldrich) a 55°C. La intensidad de Evans Blue en los órganos se midió mediante absorbancia a una longitud de onda de 610nm.

Los experimentos en animales fueron aprobados por el *Animal Experiment Board of the State Provincial Office of Southern Finland*. Todos los estudios se realizaron según lo estipulado en la Declaración de Helsinki y sus posteriores enmiendas

14. Análisis estadísticos

Se ha realizado un análisis descriptivo tomando medidas de tendencia central: media y/o mediana para aquellas variables cuantitativas y de dispersión: desviación típica y/o rango

intercuartílico/percentiles. Frecuencias y proporciones se muestran para variables cualitativas. Se ha analizado el supuesto de homocedasticidad, para ello se ha utilizado el test de Levene. Para la comparación de medias entre dos grupos independientes se utilizó el test de Student. Cuando se compararon 3 o más grupos se realizaron análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y consecutivamente un test a posteriori. En el caso de heterocedasticidad, se realizaron técnicas no paramétricas (U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis test). La comparación de las muestras Pre- con las muestra post- , en los diferentes tiempo de estudio, se realizó mediante el test de Student pareado. Para el análisis de tendencias se realizó un test de tendencia lineal o no lineal según fuera necesario (p-trend). Se considerarán valores estadísticamente significativos $p \leq 0.05$. Los resultados estadísticos fueron analizados mediante el programa estadístico PRISM 5.0 de GraphPad (La Jolla, CA, USA) o Stata v.13

Resultados

1. Estudio de los efectos de la enfermedad y del tratamiento crónico con Dasatinib sobre el fenotipo de los linfocitos.

En el momento de comenzar esta tesis había pocos estudios sobre los efectos de la LMC en el número y fenotipo de las distintas subpoblaciones linfocitarias; tampoco se sabía si los ITC, en nuestro caso dasatinib, eran capaces de normalizar las posibles alteraciones fenotípicas inducidas por la enfermedad y/o si tenían algún efecto *per se* sobre los linfocitos de SP. Por ello, realizamos un estudio inmunofenotípico específica en materiales y métodos en un grupo de donantes sanos (n=16), un grupo de pacientes recién diagnosticados que no han recibido todavía tratamiento (n=22), un grupo heterogéneo de pacientes en tratamiento crónico con dasatinib (n=21) y un grupo de pacientes del ensayo Dasapost que llevaba 6 meses de tratamiento con dasatinib en segunda línea (n=18). Los principales hallazgos se muestran en la figura xx y se resumen a continuación:

Los pacientes al diagnóstico presentan un importante descenso en la expresión de la selectina L o CD62L, tanto en las poblaciones de linfocitos T CD4+, T CD8+ como en las células NK (Figura 11 A, B, C). El tratamiento crónico con dasatinib logra la recuperación de expresión de la selectina hasta casi alcanzar valores normales en los linfocitos NK, mientras que no es el caso para los linfocitos T CD4+ y T CD8+.

En el caso de la expresión del marcador de activación HLA-DR, nuestro estudio muestra como el tratamiento detallado de las distintas subpoblaciones de linfocitos T, B y NK, tal y como se crónico con dasatinib produce un aumento de expresión en los linfocitos T CD8+, T CD4 y NK que no se observa en el grupo de Dasapost (Figura 11 F, G, H).

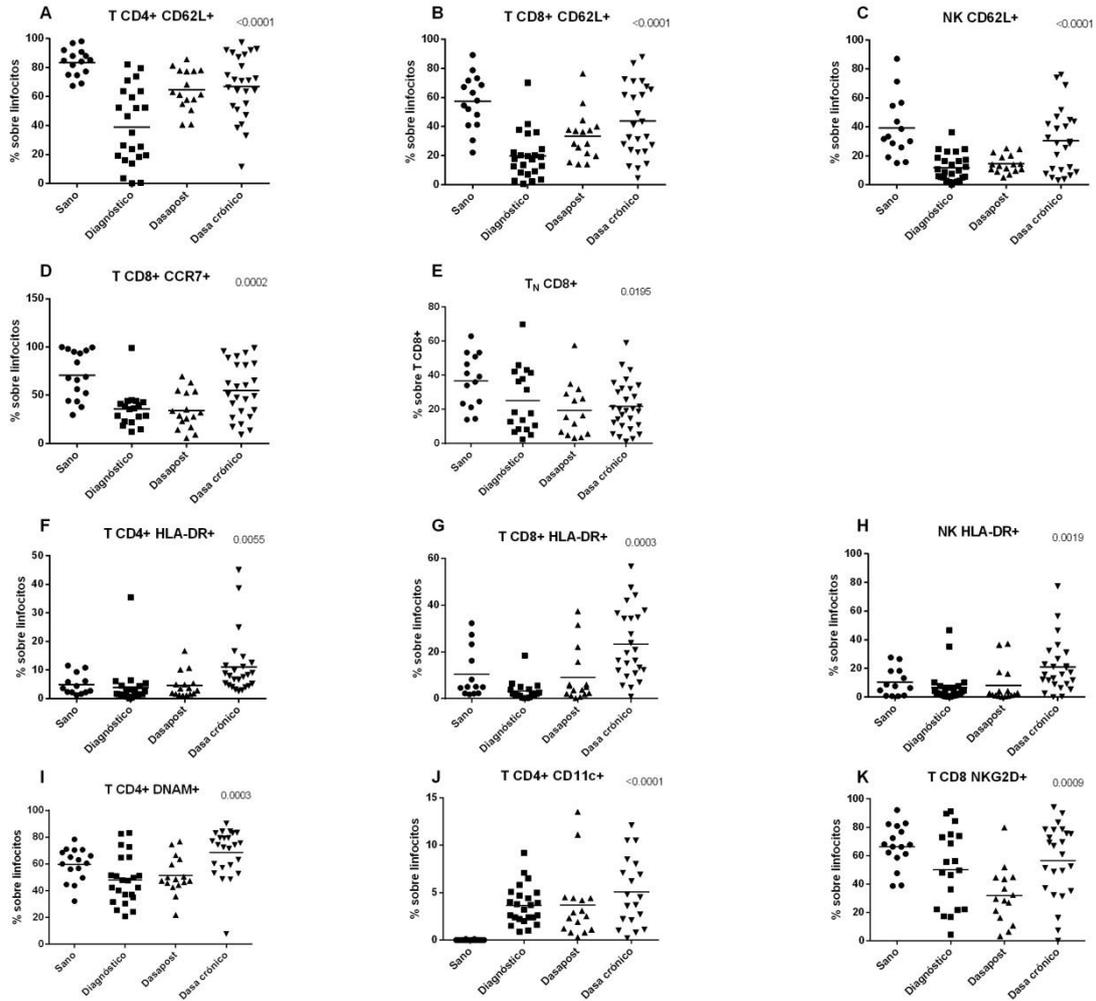


Figura 11. Porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias que sufren modificaciones ya sea por la enfermedad o por el tratamiento con dasatinib en los distintos grupos de estudio. Cada punto de la gráfica representa un paciente o sujeto sano y la línea indica la media del porcentaje la subpoblación en cuestión en cada grupo. Los porcentajes se expresan sobre el total de los linfocitos. (Sanos n=; pacientes al diagnóstico n=; dasapost n=; dasa crónico n=). El valor numérico de la p se obtuvo mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y consecutivamente un test a posteriori fdr

Cuando estudiamos la expresión de la molécula CCR7, observamos que los pacientes presentaban una importante disminución de la expresión de CCR7 en los linfocitos T CD8+ que el tratamiento con dasatinib no recupera. La subpoblación de linfocitos T_N CD8+ definida como CD45RA+CCR7+ sobre los T CD8+ así como sobre el total de linfocitos está reducida en los pacientes al diagnóstico respecto a los sujetos sanos y dasatinib no recupera sus cifras (Figura 11 D, E).

La expresión de DNAM sobre los linfocitos T CD4+ estaba significativamente disminuida en los pacientes en el momento del diagnóstico y su expresión vuelve a cifras normales en el grupo de pacientes dasatinib crónico, mientras que en el grupo Dasapost todavía no logra esta recuperación (Figura 11 J).

Por su parte, la expresión de NKG2D en los linfocitos T CD8+ presenta una distribución heterogénea en los diferentes grupos de pacientes, aunque nuestros resultados muestran como el grupo de dasatinib crónico se asemeja al de los sujetos sanos (Figura 11 F, K).

En el caso concreto de los linfocitos NK se observaron varios cambios en el inmunofenotipo de dichas células. En primer lugar, la subpoblación CD56+CD16+, considerada como de alto potencial citotóxico, estaba aumentada en los pacientes al diagnóstico, hallazgo que aún se mantenía en el grupo dasapost y que el tratamiento crónico con el fármaco comenzaba a normalizar (Figura 12 A). La expresión del receptor CD11c en las células NK se ve potenciado por el tratamiento crónico con Dasatinib,.

Los receptores activadores como la molécula tipo lectina CD161 así como el receptor de citotoxicidad natural Nkp30 están disminuidos en el momento del diagnóstico, mientras que en aquellos pacientes con tratamiento crónico con dasatinib el patrón de expresión se hace heterogéneo (Figura 12 B, C).

Finalmente el receptor KIR2DL1/S1 estaba aumentado en las células NK de los pacientes recién diagnosticados y su expresión se normalizaba tras el tratamiento crónico con dasatinib.

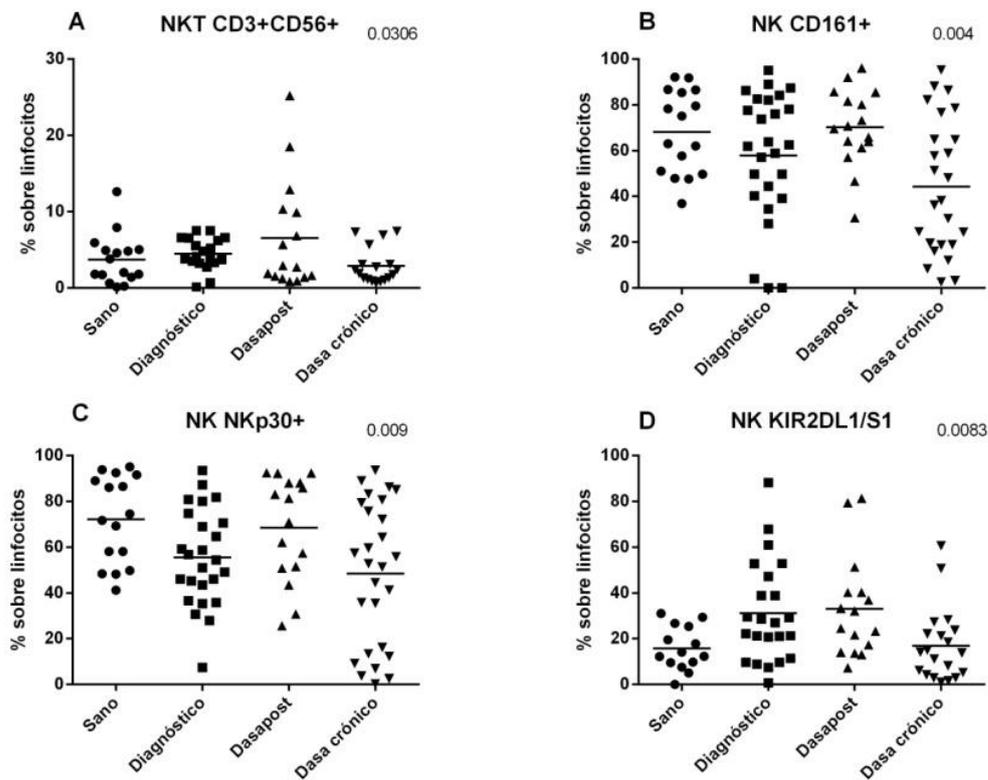


Figura 12. Porcentaje de la expresión de receptores NK que sufren modificaciones ya sea por la enfermedad o por el tratamiento con dasatinib en los distintos grupos de estudio. Cada punto de la gráfica representa un paciente o sujeto sano y la línea indica la media del porcentaje la subpoblación en cuestión en cada grupo. Los porcentajes se expresan sobre el total de

los linfocitos. El valor numérico de la p se obtuvo mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y consecutivamente un test a posteriori fdr.

2. Caracterización de la linfocitosis inducida por Dasatinib

2.1. Cambios en los valores absolutos y relativos de las principales subpoblaciones linfocitarias producidos por Dasatinib: pacientes movilizadores y no movilizadores.

Como hemos mencionado en la introducción, dasatinib produce una linfocitosis inmediatamente después de la toma del fármaco en la mayoría de los pacientes. Con el fin de caracterizar mejor este efecto inmunomodulador del fármaco, se realizó un hemograma previo a la administración de dasatinib y dos horas después de la misma, en los tres momentos de estudio del ensayo clínico Dasapost (Tabla X).

Tabla 6. Valores absolutos de los linfocitos totales de sangre periférica en las muestras pre y post de los pacientes del grupo Dasapost y valor del cambio entre la muestra pre y post (indicado como FC, del inglés fold change) en los 3 momentos del estudio: tiempo 0 y 3 y 6 meses tras el inicio del tratamiento. En amarillo: valores absolutos aumentados en la muestra post; en azul: linfocitosis absoluta con independencia de si la muestra es pre o post). En las columnas pre y post se señala con negrita cursiva los valores de linfocitosis absoluta y en la columna FC post/pre los valores mayores de 1 (paciente movilizador).

Muestras	Valor linfocitos *10 ³ /ul a: tiempo 0			Valor linfocitos *10 ³ /ul a: tiempo 3 meses			Valor linfocitos *10 ³ /ul a: tiempo 6 meses		
	PRE	POST	FC POST/ PRE	PRE	POST	FC POST/ PRE	PRE	POST	FC POST/ PRE
13-004	2,46	4,71	1,915	2,8	7,34	2,62	4,35	8,01	1,84
13-001	1,2	3,8	3,167	0,83	1,14	1,37	1,33	1,55	1,17
14-001	2,21	4,01	1,814	4,07	4,52	1,11	2,75	6,19	2,25
14-002	3,24	4,23	1,306	2,67	2,96	1,11	2,83	3,88	1,37
13-002	0,83	1,89	2,277	1,06	2,46	2,32	1,16	2,39	2,06
07-001	2,22	2,19	0,986	1,99	4,7	2,36	2,54	2,98	1,17
10-002	1,54	1,99	1,292	2,29	4,48	1,96			
12-001				2,78	2,83	1,02	2,04	4,67	2,29
10-001	1,61	3,13	1,944						
04-001	1,26	1,18	0,937	1,05	2,46	2,34	1,49	1,22	0,82
14-003	1,78	2,82	1,584	1,99	1,91	0,96	1,35	1,74	1,29
01-002	2,08	3,8	1,827				2,29	4,75	2,07
12-002	1,77	3,16	1,785	1,36	3,15	2,32	1,49	2,54	1,7
12-003	1,96	4,29	2,189	2,61	3,23	1,24	2,94	2,73	0,93
11-001	1,11	1,02	0,919	1,81	1,78	0,98	1,94	2,07	1,07
01-001	2,9	4,32	1,49	2,84	5,99	2,11	3,31	6,69	2,02
15-003	2,2	3,44	1,564	2,01	1,84	0,92	1,85	1,74	0,94
03-002	1,57	4,01	2,554	2,26	7,16	3,17	2,49	8,13	3,27

La linfocitosis, tanto absoluta como relativa, experimentada 2h tras la toma de dasatinib tiene lugar desde la primera dosis del fármaco (t0) y se repite a los 3 y 6 meses después de iniciar el tratamiento (Figura 13). No existen diferencias significativas entre las cifras basales de linfocitos antes de cada toma de dasatinib en los tres momentos de estudio durante el tratamiento, lo que indica que no hay un efecto acumulativo de dasatinib en las cifras de linfocitos, al menos durante los seis primeros meses. A continuación, realizamos una caracterización por citometría de flujo multiparamétrica de los linfocitos de sangre periférica de nuestros pacientes del ensayo Dasapost, para comprobar si la linfocitosis se asocia a cambios en la composición de las principales subpoblaciones linfocitarias desde la primera toma del fármaco. Así, a tiempo cero, en las muestras post, se detecta un aumento significativo del recuento absoluto de linfocitos B, NK y T, tanto T-CD4+ como T-CD8+. La proporción de linfocitos T CD3+ y linfocitos T CD4+ sobre el total de linfocitos disminuye significativamente en las muestras post, mientras que las proporciones de células T CD8+, NK y B se incrementan (Figura 13).

Al igual que sucedía con los linfocitos totales, no encontramos diferencias significativas entre los valores relativos y absolutos de las distintas subpoblaciones linfocitarias en las tres muestras pre, si exceptuamos el moderado descenso de la proporción de los linfocitos NK a lo largo del tiempo.

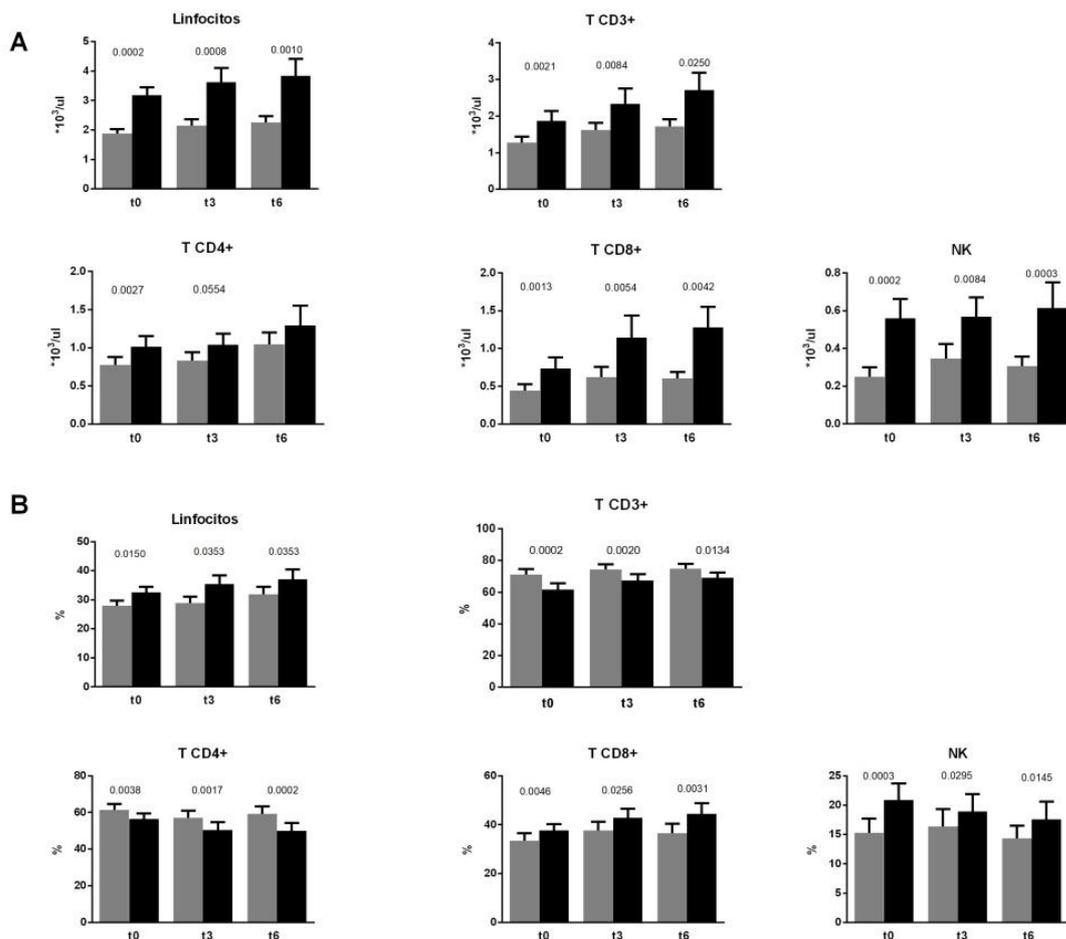


Figura 13. Valores absolutos y relativos de los linfocitos totales y de principales subpoblaciones linfocitarias en las muestras pre- y post-, en los 3 tiempos de estudio de los pacientes del ensayo Dasapost. Los valores relativos de las

subpoblaciones linfocitarias son sobre los linfocitos totales. En aras de la claridad no se señala el p valor cuando las diferencias no son significativas. (Gris: muestras de pacientes pre-toma; negro: muestras de pacientes post-toma) (t=0: tiempo 0, t=3: tiempo 3 meses, t=6: tiempo 6 meses). La comparación de las muestras pre- con las muestra post-, en los diferentes tiempo de estudio, se realizó mediante el test de Student pareado.

Cuando analizamos los pacientes de forma individual, pudimos comprobar que tres de los diecisiete pacientes no experimentaban linfocitosis a tiempo 0. Según esto, clasificamos a los pacientes en “movilizadores” (n=14) y “no-movilizadores” (n=3) (Figura 14 A). Estos últimos se caracterizaban por no presentar diferencias significativas ni en los valores absolutos ni relativos de las distintas subpoblaciones linfocitarias entre las muestras pre y post, mientras que en los movilizados se confirman los hallazgos descritos en la figura 14. En la tabla 6 podemos observar el comportamiento de los pacientes en los tres tiempos de estudio. Así, comprobamos como en algunos casos, pacientes no-movilizadores a tiempo 0, continuaron sin movilizar en los tiempos de estudio posteriores, y por el contrario, otros pacientes se comportaron de forma más irregular movilizándose a tiempo 3 y/o 6.

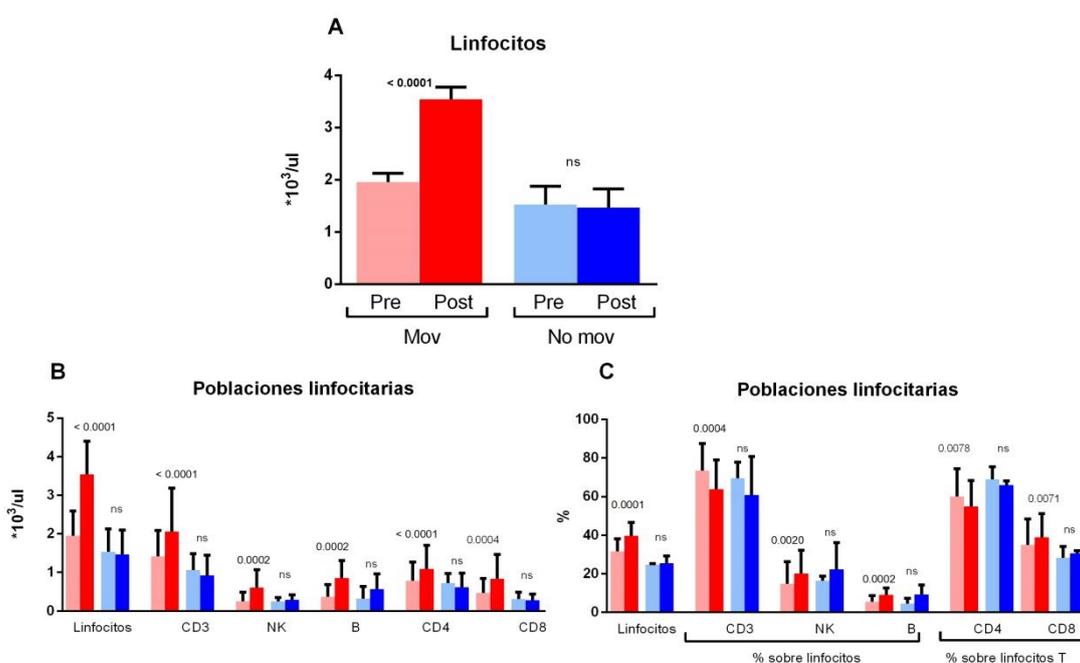


Figura 14. Valores absolutos y relativos de los linfocitos y sus principales poblaciones linfocitarias en pacientes movilizados y no movilizados. (Rosa:muestras pre de los pacientes movilizados; Rojo: muestras post de pacientes movilizados; Azul:muestras pre de los pacientes no movilizados; Azul oscuro muestras pre de los pacientes no movilizados). (ns: diferencias no significativas). La comparación de las muestras pre- con las muestra post-, en los diferentes tiempo de estudio, se realizó mediante el test de Student pareado.

Después de estudiar los cambios en la distribución de las principales subpoblaciones linfocitarias, quisimos estudiar en profundidad si también se redistribuían las poblaciones linfocitarias clasificadas en función de su historia de exposición antigénica inmediatamente después de la toma de dasatinib (Figura xx). Así, desde la primera toma del fármaco (t=0) observamos que las muestras post

presentan un mayor porcentaje de linfocitos T CD8+ T_{EMRA} sobre los linfocitos T CD8+ y sobre los linfocitos totales y lo mismo para los T CD4+ T_{EMRA} sobre los linfocitos T CD4+ (Figura 15 B, F, H, K). En correspondencia con dichos hallazgos, la proporción de linfocitos T_N CD8+ y T_N CD4+ era menor en las muestras post expresada tanto sobre los linfocitos T CD8+ y T CD4+, respectivamente, como sobre el total de linfocitos (Figura A, D, G, J). Lo mismo ocurría con los linfocitos T_{CM} ya que estaban disminuidos en las muestras post- tanto en el caso de los linfocitos T CD8+ sobre linfocitos totales como de los linfocitos T CD4+, también sobre linfocitos totales.

La misma tendencia de aumento inmediato de linfocitos efectores T_{EMRA} en detrimento de linfocitos T_N y T_{CM} en ambas poblaciones T CD4+ y T CD8+ se observó a t=3 así como a t=6. En este caso sí parece haber un efecto acumulativo a lo largo del tiempo en el caso de los linfocitos T CD8+ ya que a tiempo 6 hay más linfocitos T_{EMRA} y menos T_N y T_{CM} que a tiempo 0 (Figura 15).

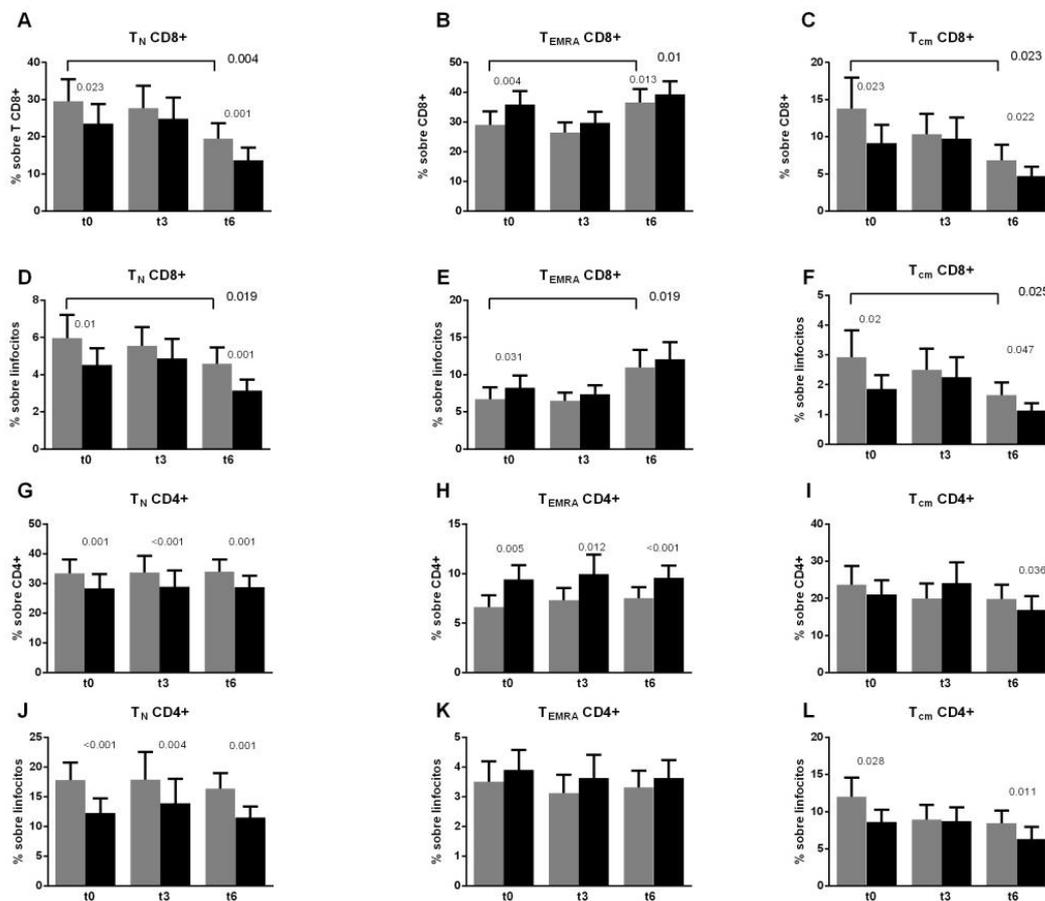


Figura 15. Proporción de las distintas subpoblaciones T CD4+ y T CD8+ en función de su historia de exposición antigénica. Se expresa tanto sobre la población "madre" (linfocitos T CD4+ o T CD8+) como sobre los linfocitos totales. En aras de la claridad no se señala el p valor cuando las diferencias no son significativas.

(Gris: muestras de pacientes pre-toma; negro: muestras de pacientes post-toma) (t=0: tiempo 0, t=3: tiempo 3 meses, t=6: tiempo 6 meses). La comparación de las muestras pre- con las muestra post-, en los diferentes tiempo de estudio, se realizó mediante el test de Student pareado. Para el análisis de tendencias se realizó un test de tendencia (p-trend).

A continuación, quisimos diseccionar cuáles eran las moléculas que condicionaban los hallazgos del párrafo anterior así como estudiar la expresión de forma individual de otras moléculas asociadas a estados de activación o maduración (Figura 16).

Las moléculas CD62L, CCR7 y CD45RA se asocian a los distintos estadios madurativos de los linfocitos T y de hecho se usan para identificarlos, como hemos visto en la sección de materiales y métodos. Cuando estudiamos la expresión de la selectina CD62L y del receptor CCR7 de forma individual, observamos que tras cada toma se produce una disminución significativa de la expresión de la misma ya desde el tiempo 0 y en los 3 tiempos del estudio, tanto en los T CD4+ como en los T CD8+ (Figura 16 A, B, G, H). La misma tendencia encontramos cuando estudiamos la expresión de CD45RA (Figura 16 C, I). Hallazgos similares se obtuvieron cuando se analizaron de forma individual moléculas que disminuyen a medida que los linfocitos T CD4+ y T CD8+ se van diferenciando como CD27, la molécula coestimuladora CD28 y la molécula de linaje T CD7 (Figura 16 D, E, F, J, K, L).

De nuevo también cuando analizamos las moléculas por separado se producen cambios acumulativos y en la muestra pre del tiempo 6 hay una menor proporción de células positivas para CCR7, CD27, CD28 o CD7 que en la muestra pre del tiempo 0.

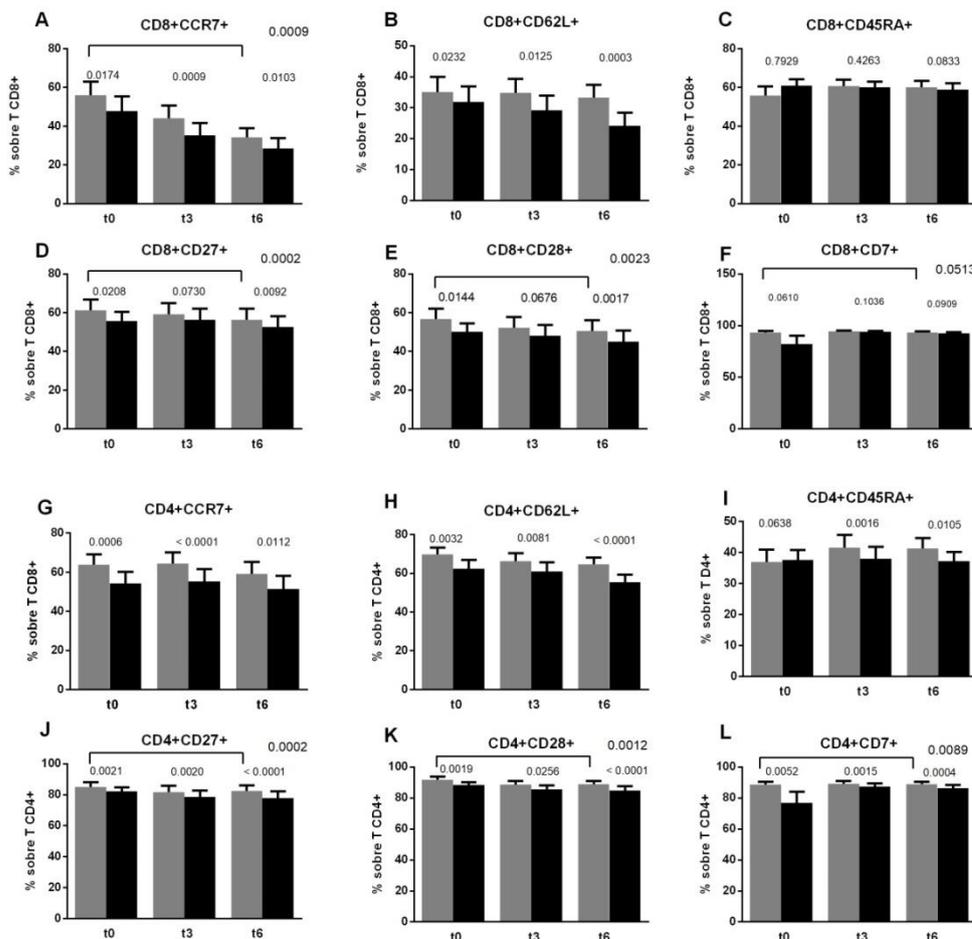


Figura 16. Porcentaje de expresión sobre los linfocitos T CD4+ y T CD8+ de distintas moléculas asociadas a la maduración de los linfocitos T. En aras de la claridad no se señala el p valor cuando las diferencias no son significativas. La

comparación de las muestras pre- con las muestra post- , en los diferentes tiempo de estudio, se realizó mediante el test de Student pareado. Para el análisis de tendencias se realizó un test de tendencia (p-trend). (Gris: muestras de pacientes pre-toma; negro: muestras de pacientes post-toma) (t=0: tiempo 0, t=3: tiempo 3 meses, t=6: tiempo 6 meses).

Dado que la linfocitosis podía deberse a una reconfiguración de los distintos receptores de quimiocinas que contribuyen a un determinado patrón de recirculación linfocitaria, estudiamos la expresión de CXCR3 y CXCR4. Observamos que la expresión de CXCR3 en los linfocitos T CD4+ aumentaba significativamente en los tres tiempos estudiados (Figura 17 A, C). Curiosamente, en los linfocitos T CD8+, las muestras post- presentaban menor expresión de este receptor, también en los 3 tiempos. En el caso de la expresión de CXCR4 nuestros resultados reflejan una disminución de la expresión en las muestras post- en los linfocitos T CD4+ que se hace significativa a t=3y a t=6 y que también es observada en este tiempo en los linfocitos T CD8+ (Figura 17 B, D).

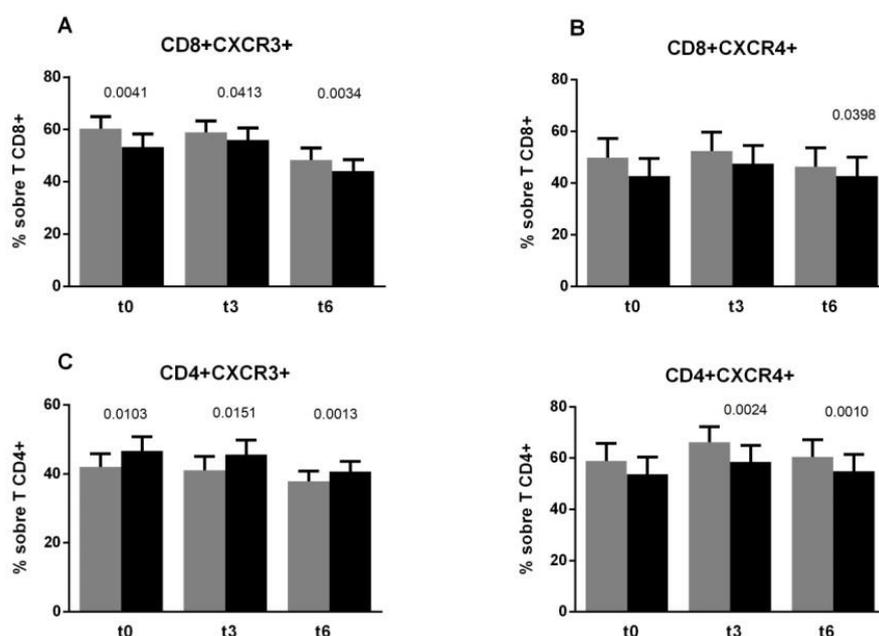


Figura 17. Porcentaje de expresión sobre los linfocitos T CD4+ y T CD8+ de distintas moléculas asociadas a la migración de los linfocitos T. En aras de la claridad no se señala el p valor cuando las diferencias no son significativas. (Gris: muestras de pacientes pre-toma; negro: muestras de pacientes post-toma) (t=0: tiempo 0, t=3: tiempo 3 meses, t=6: tiempo 6 meses). La comparación de las muestras pre- con las muestra post- , en los diferentes tiempo de estudio, se realizó mediante el test de Student pareado.

En cuanto a los marcadores de activación HLA-DR y CD11c, en cada toma y en los 3 tiempos de estudio (Figura 18 A, B, E, F), se producía un aumento de la expresión de los mismos tanto en los T CD4+ como en los T CD8+. Lo mismo ocurría en los linfocitos T CD8+ para la expresión de CD38, otra molécula asociada a la activación linfocitaria (Figura 18 D).

Curiosamente, en nuestros resultados también encontramos diferencias en la expresión de moléculas asociadas característicamente a las células NK, pero no restringidas a esta población, como el

CD161 y DNAM. Comprobamos que la expresión del receptor CD161 aumentaba de manera significativa en los linfocitos T CD4+ y T CD8+ en los 3 tiempos tras la toma del fármaco (Figura 18 C, G). Por su parte, la expresión de DNAM es mayor en las muestras post- en los linfocitos T CD4+ a t=3 meses y a t=6 meses (datos no mostrados).

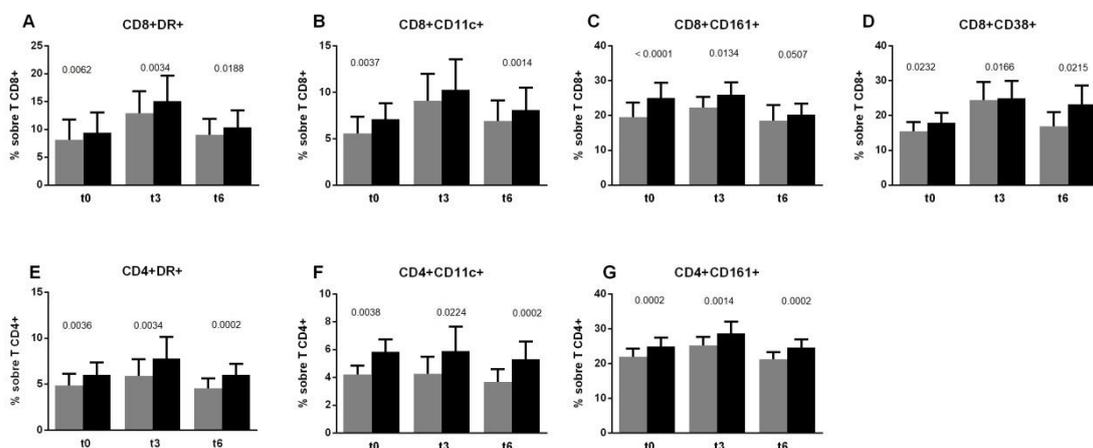


Figura 18. Porcentaje de expresión sobre los linfocitos T CD4+ y T CD8+ de distintas moléculas asociadas a la activación de los linfocitos T. En aras de la claridad no se señala el p valor cuando las diferencias no son significativas. (Gris: muestras de pacientes pre-toma; negro: muestras de pacientes post-toma) (t=0: tiempo 0, t=3: tiempo 3 meses, t=6: tiempo 6 meses). La comparación de las muestras pre- con las muestra post-, en los diferentes tiempo de estudio, se realizó mediante el test de Student pareado.

Para la población de células NK, realizamos la misma comparación ente las muestras pre y post a los 3 tiempos de estudio. Al igual que en los linfocitos T, las células NK presentaban una disminución de la expresión de CD62L tras cada toma del fármaco y, en consonancia con el efecto acumulativo del fármaco sobre dicha molécula en los linfocitos T_N (que la expresan de forma característica), se producía también una disminución de CD62L en los linfocitos NK en la muestra pre tras 6 meses de tratamiento comparado con la muestra pre del tiempo 0 (Figura 19).

En cuanto a los receptores tipo lectina, observamos una tendencia al aumento en la expresión del receptor de activación NKG2C en las muestras post- que solo fue significativa a los 3 meses ($p=0,0297$) (datos no mostrados). Por el contrario, el receptor inhibidor NKG2A siempre disminuía tras la toma del fármaco (Figura 19 B). Por otra parte, el estudio de la expresión de los receptores tipo KIR tanto activadores como inhibidores reveló un aumento significativo de la expresión de los receptores inhibidores KIR2DL2/L3/S2 y KIR2DL1 tras cada toma (Figura 19 C, D). La misma tendencia se observó para el receptor inhibidor KIR3DL1 (Figura 19 E). Ni los receptores de activación natural NKp30 y NKp46 ni otras moléculas activadoras como CD161 sufrieron modificaciones inmediatas tras la toma del fármaco.

En cuanto a la activación, la pérdida de CD11b se asocia con una activación temprana de las células NK y pudo observarse en las muestras post de los 3 tiempos del estudio (Figura 19 F). Por el

contrario, marcadores de activación más tardía como HLA-DR no cambiaron a las dos horas de haber tomado el fármaco (datos no mostrados).

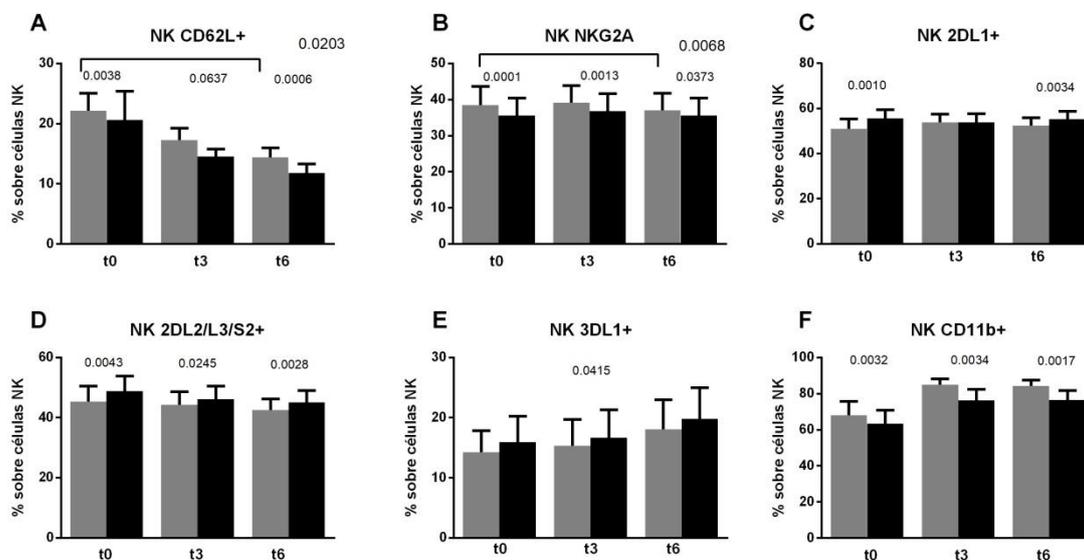


Figura 19. Porcentaje de expresión de diversas moléculas asociadas a células NK. En aras de la claridad no se señala el p valor cuando las diferencias no son significativas. (Gris: muestras de pacientes pre-toma; negro: muestras de pacientes post-toma) (t=0: tiempo 0, t=3: tiempo 3 meses, t=6: tiempo 6 meses). La comparación de las muestras pre- con las muestra post- , en los diferentes tiempo de estudio, se realizó mediante el test de Student pareado. Para el análisis de tendencias se realizó un test de tendencia (p-trend).

3. Evaluación del efecto del dasatinib en la capacidad de migración de los linfocitos.

3.1. La toma de Dasatinib inhibe la capacidad migratoria de los linfocitos

Una de las posibles explicaciones a la linfocitosis inducida por dasatinib es que este fármaco modifique la capacidad migratoria de los linfocitos y, en concreto, la migración hacia órganos linfoides secundarios con el resultado final de una acumulación de dichas células en SP. Por ello, en paralelo a los estudios del fenotipo linfocitario, realizamos experimentos de migración in vitro hacia los ligandos de CCR7, las quimiocinas homeostáticas CCL19 y CCL21, con las PBMC de las muestras pre y post de 17 pacientes del estudio Dasapost en el día que comenzaban el tratamiento con dasatinib.

Como se observa en la figura 20 A, B, el porcentaje de migración de los PBMC a CCL19+CCL21 fue menor en la muestra post, tanto en el caso de los linfocitos T CD4+ como de los T CD8+. Estos resultados se confirmaron con los índices de migración para los CD4+ y para los CD8+ (Figura 20 D, E). Sin embargo, la migración de las células NK hacia CCL19+CCL21 no se vio afectada (Figura 20 C, F). Por su parte, la toma de dasatinib no modificó la quimiotaxis de las distintas subpoblaciones linfocitarias hacia CXCL12.

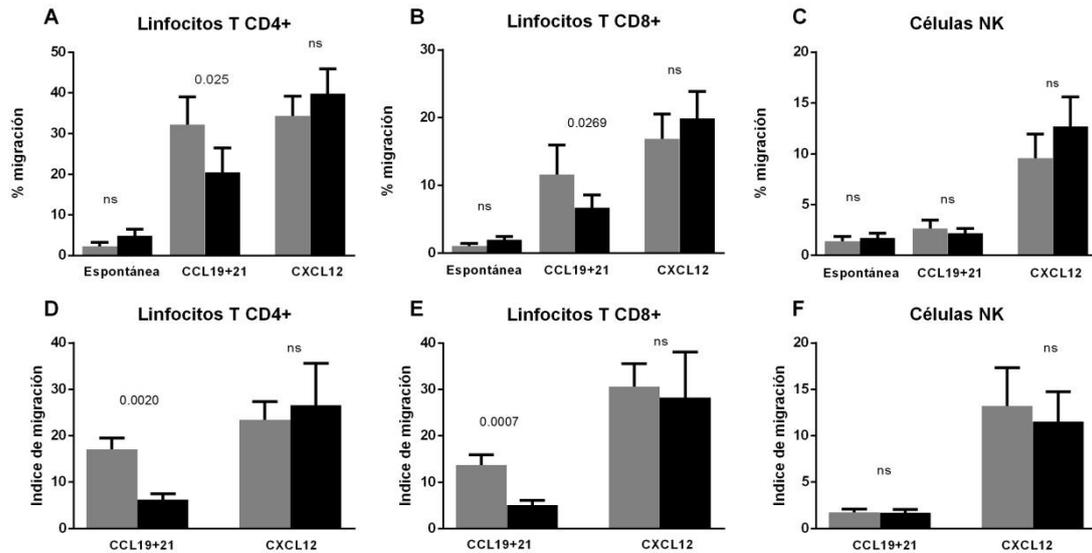


Figura 20. Comparación de la capacidad migratoria *in vitro* de las PBMC entre las muestras pre y post a tiempo 0 de los pacientes del ensayo Dasapost. El estímulo quimiotáctico empleado fue un cóctel con CCL19 y CCL21, las quimiocinas ligando de CCR7. Los datos se expresan como porcentaje de migración y como índice de migración, cuyos cálculos se especifican en materiales y métodos. (Gris: muestras de pacientes pre-toma; negro: muestras de pacientes post-toma). La comparación de las muestras pre- con las muestra post-, se realizó mediante el test de Student pareado.

Además, quisimos estudiar si estos cambios ocurrían en cada toma de dasatinib, para lo cual recogimos muestras de pacientes (tanto del ensayo Dasapost como del grupo de dasatinib crónico) que llevaban en tratamiento con dasatinib como mínimo 3 meses. Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores de forma que la quimiotaxis hacia CCL19 y CCL21 disminuye significativamente en las muestra post (Figura 21).

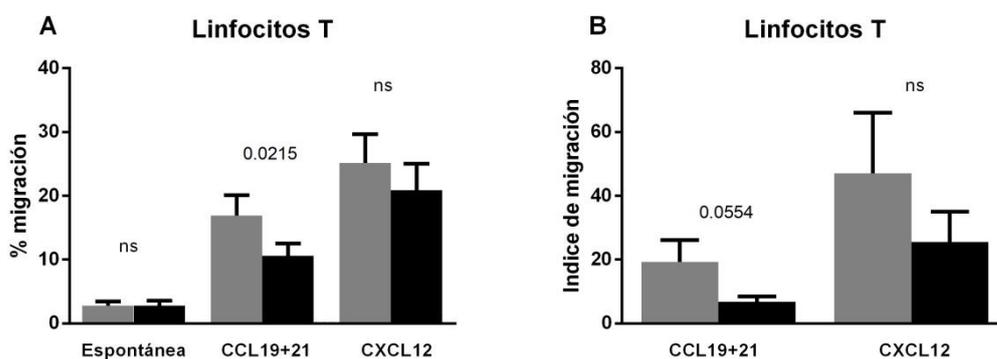


Figura 21. Comparación de la capacidad migratoria *in vitro* de las PBMC entre las muestras pre y post de los pacientes del ensayo Dasapost y de pacientes del grupo dasatinib crónico que llevasen 3 o más meses de tratamiento. El estímulo quimiotáctico empleado fue un cóctel con CCL19 y CCL21, las quimiocinas ligando de CCR7. Los datos se expresan como porcentaje de migración y como índice de migración, cuyos cálculos se especifican en materiales y métodos. (Gris: muestras de pacientes pre-toma; negro: muestras de pacientes post-toma). La comparación de las muestras pre- con las muestra post-, se realizó mediante el test de Student pareado.

En vista de estos resultados, quisimos comprobar si la inhibición observada en la figura 22 se debía a un efecto directo del dasatinib sobre la capacidad de migración linfocitaria. Para ello, realizamos los mismos experimentos de migración *in vitro* con muestras de sujetos sanos (n=11) cuyas PBMC fueron tratadas previamente *in vitro* durante 1h con dasatinib. El fármaco se mantuvo durante todo el tiempo que duró el experimento y comprobamos que dasatinib inhibe la migración espontánea de las células ($p=0.0071$) pero no la quimiotaxis a CCL19 o CCL21 (Figura 22).

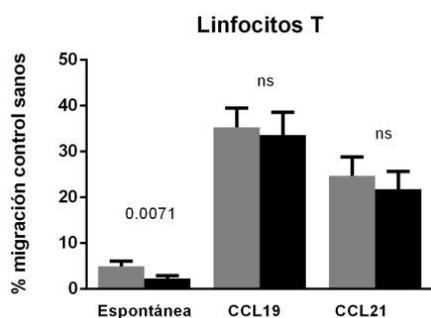


Figura 22. Efecto *in vitro* de dasatinib sobre la capacidad migratoria de PBMC de sujetos sanos. Las PBMC de sujetos sanos fueron pretratadas o no *in vitro* con dasatinib durante una hora. Posteriormente se dejaron migrar hacia un estímulo quimiotáctico consistente en un cóctel con CCL19 y CCL21, las quimiocinas ligando de CCR7. Los datos se expresan como porcentaje de migración cuyo cálculo se especifica en materiales y métodos. (Gris: PBMC sin tratar; negro: PBMC tratadas *in vitro* con dasatinib). La comparación de las muestras sin tratar con las tratadas, se realizó mediante el test de Student.

Otra posible causa de la disminución de la migración en respuesta a dasatinib era un efecto directo del fármaco sobre la expresión de moléculas que median la migración como CCR7 y CD62L. Para descartarlo, estudiamos la intensidad media de fluorescencia de dichas moléculas sobre linfocitos no tratados o incubados *in vitro* con dasatinib durante 15min y 120min. No encontramos diferencias significativas en los parámetros de expresión evaluados en ninguna de las dos moléculas, ni sobre los linfocitos totales ni en ninguna de sus subpoblaciones de linfocitos T CD4+, T CD8+ o células NK (Figura 23).

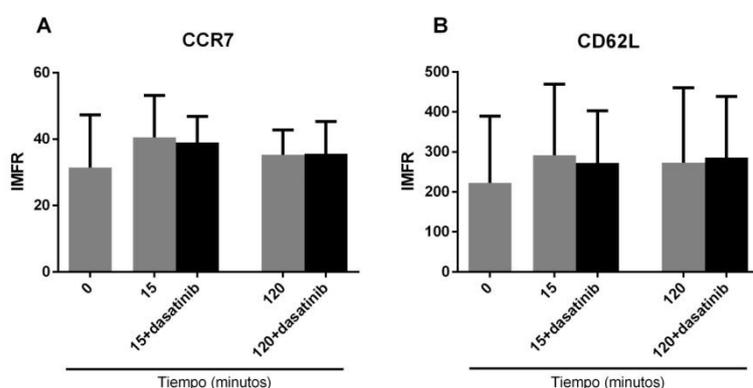


Figura 23. Estudio de la expresión de CCR7 y CD62L sobre linfocitos no tratados o incubados *in vitro* con dasatinib. Se representa la expresión como intensidad mediana de fluorescencia relativa (IMFR), Se representa la media de 5 experimentos independientes, medidos a 0, 15 minutos y 120 minutos. (Gris: sin tratar; negro: tratadas *in vitro* con dasatinib).

Parecía por tanto que la disminución de la capacidad de migración de los PBMC en las muestras post estaba asociada a la disminución en la proporción de células CCR7+ en dicha muestra. Para intentar asociar estos hallazgos con la linfocitosis quisimos estudiar cómo era la capacidad de migración de los linfocitos T en los pacientes movilizados ó no movilizados. Observamos que los pacientes movilizados presentaban un menor índice de migración hacia CCL19+CCL21 tanto en los T CD4+ como en los T CD8+, mientras que no encontramos diferencias significativas en el índice de migración hacia CXCL12 en las muestras pre y post. En el caso de los pacientes no movilizados, no se encontraron diferencias significativas en la migración hacia ninguna de las quimiocinas estudiadas ni en los CD4+ ni en los CD8+ (Figura 24 A, B).

En paralelo, analizamos la expresión de los receptores de quimiocinas en estos dos grupos de pacientes. De nuevo, se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de expresión del receptor de quimiocinas CCR7 en los linfocitos de los pacientes movilizados que disminuye en las muestras post, ya sea en los T CD4+ como en los T CD8+, a diferencia de lo que sucede en los pacientes no movilizados (Figura 24C).

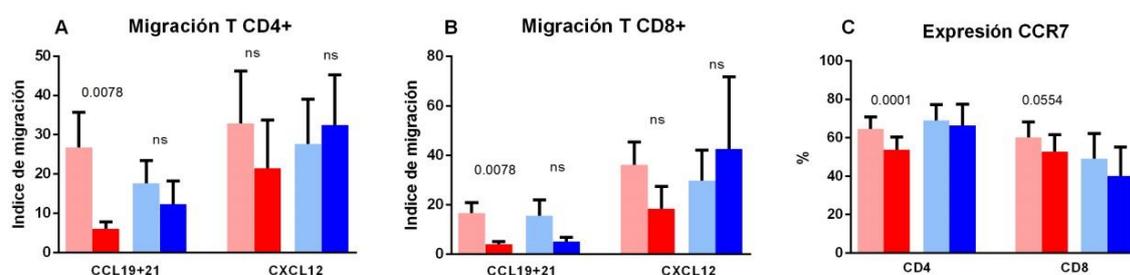


Figura 24. Comparación de la capacidad migratoria *in vitro* de las PBMC entre las muestras pre y post de los pacientes movilizados y no movilizados del ensayo Dasapost a tiempo 0. El estímulo quimiotáctico empleado fue un cóctel con CCL19 y CCL21, las quimiocinas ligando de CCR7. Los datos se expresan como porcentaje de migración y como índice de migración, cuyos cálculos se especifican en materiales y métodos. En C se muestra el porcentaje de expresión de CCR7 en las mismas PBMC empleadas en el ensayo de migración. (Rosa:muestras pre de los pacientes movilizados; Rojo: muestras post de pacientes movilizados; Azul:muestras pre de los pacientes no movilizados; Azul oscuro muestras pre de los pacientes no movilizados). (ns: diferencias no significativas). La comparación de las muestras pre- con las muestra post- , en los diferentes tiempo de estudio, se realizó mediante el test de Student pareado.

4. Evaluación de la respuesta clínica a tratamiento con Dasatinib

Otro de los objetivos de la presente tesis era investigar la posible asociación de la respuesta clínica con alguno de los parámetros inmunológicos. Para ello se evaluó la respuesta de los pacientes a dasatinib tras 3, 6 y 12 meses de tratamiento en el contexto del estudio Dasapost.

De los 18 pacientes del estudio, 3 pacientes (16%) abandonaron el tratamiento por toxicidad, (ver tabla en la sección de pacientes, materiales y métodos. Las tasas de RM en los distintos tiempos del estudio se especifican en la tabla 7.

Tabla 7. Respuestas moleculares de los pacientes del ensayo Dasapost evaluadas a 3, 6 y 12 meses.

	3 meses	6 meses	12 meses
RMM	8/18 (44%)	12/18 (66%)	12/18 (66%)
RM4.5	2/18 (11%)	3/13 (16%)	2/18 (11%)

Tras el correspondiente análisis estadístico comprobamos que los pacientes que obtuvieron RMM a los 3 meses presentaban a tiempo cero valores absolutos más altos de plaquetas, neutrófilos, linfocitos totales y linfocitos T CD8 que aquellos no obtuvieron RMM (Tabla 8). Resultados similares se obtuvieron a tiempo 6 meses, donde los pacientes que habían alcanzado RMM presentaban a tiempo cero valores relativos de linfocitos más altos así como mayores valores absolutos de linfocitos T CD8+ y una tendencia a tener un número más alto de linfocitos T CD4+. Finalmente, cuando estudiamos los pacientes que alcanzaban RMM a los 12 meses, éstos presentaban porcentaje de linfocitos totales más alto a tiempo cero. También tenían más linfocitos T CD8+ totales a 6 meses. Por su parte, para las células NK, se observó una asociación significativa entre la magnitud de la movilización de esta población a t=6 meses, tanto en valores absolutos como en porcentaje, y los pacientes que alcanzaban RMM a los 12 meses (Tabla 8). ±

Tabla 8. Diferencias en las variables clínicas entre los pacientes que alcanzan o no RMM del ensayo Dasapost evaluadas a 3, 6 y 12 meses

	3 meses				6 meses			12 meses			
	PLQ (*10 ³ /ul) t0	N (*10 ³ /ul) t0	L (*10 ³ /ul) t0	CD8+ (*10 ³ /ul) t0	L (%) t0	CD8+ (*10 ³ /ul) t0	CD4+ (*10 ³ /ul) t0	L (%) t0	CD8+ (*10 ³ /ul) t6	FC NK (%) t6	FC NK (*10 ³ /ul) t6
No RMM	182±51,3	2,93±1,17	1,63±0,37	0,34±0,33	22,8±6,57	0,29±0,11	0,67±0,31	23,33±6,42	0,4±0,13	0,98±0,10	1,3±0,38
RMM	249,1±30,9	4,09±0,97	2,23±0,78	0,76±0,15	30,76±6,39	0,62±0,36	0,98±0,37	30,45±6,82	0,70±0,35	1,14±0,36	2,52±1,22
p	0,005	0,039	0,0507	0,0092	0,0288	0,0227	0,09	0,0533	0,0308	0,0091	0,0522

Abreviaturas: PLQ: plaquetas; N: neutrófilos; L: linfocitos; FC: Fold change; RMM: respuesta molecular mayor; t0: tiempo 0; t6: tiempo 6

5. Efectos del dasatinib sobre el endotelio vascular

5.1. Las concentraciones terapéuticas de dasatinib no son tóxicas para las células endoteliales.

Antes de estudiar si dasatinib producía alguna alteración funcional sobre el endotelio y estudiar los mecanismos asociados, quisimos comprobar si el fármaco tenía algún tóxico sobre el mismo. Para ello, tratamos las HUVEC a diferentes concentraciones de dasatinib que incluían aquellas que se alcanzan en el plasma de los pacientes y la viabilidad de 4 monocapas de células endoteliales de diferente origen fue evaluada mediante el marcaje con 7AAD (Figura 25 A). Además, se cuantificó el número de células despegadas del sobrenadante de los pocillos con dasatinib y se comparó con el control. No se observó un aumento en el número de células del sobrenadante con respecto al del control (Figura 25 B). Estos resultados confirmaban la baja toxicidad sobre las células endoteliales de dasatinib a las dosis que pretendíamos utilizar en los experimentos.

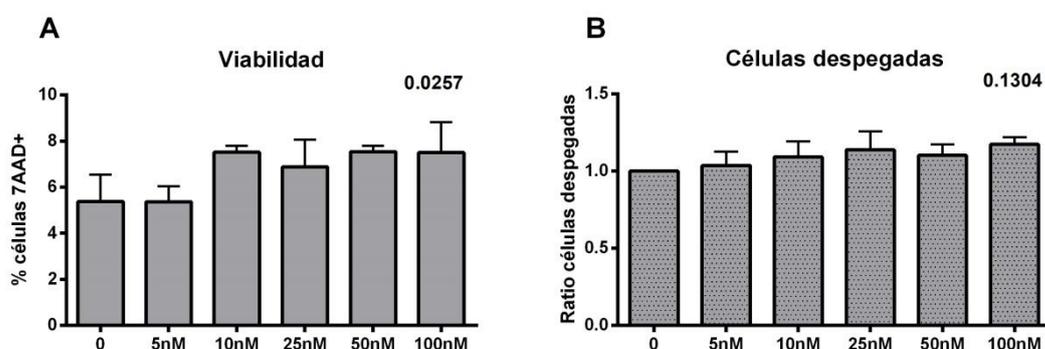


Figura 25. Estudio de la toxicidad de Dasatinib sobre las células HUVEC A) Viabilidad de las células HUVEC tras el tratamiento con dasatinib a diferentes concentraciones, medida a través del porcentaje de 7AAD+. B) Ratio de células despegadas calculado como el número de células despegadas del sobrenadante de los pocillos con dasatinib a diferentes concentraciones comparadas con aquellas que no recibieron tratamiento..

5.2. Dasatinib induce una desestructuración de la monocapa endotelial de manera dosis-dependiente.

Varios de los EA de dasatinib, como el derrame pleural, la hemorragia gastrointestinal o la propia linfocitosis se podrían explicar si este fármaco induce alteraciones de la integridad y/o la permeabilidad vascular. Por tanto, nos propusimos estudiar los efectos *in vitro* e *in vivo* de dasatinib sobre una monocapa de células HUVEC.

Uno de los métodos para evaluar la integridad de la monocapa endotelial es la medida de la impedancia¹³⁵. Así, realizamos el seguimiento, a tiempo real, de la impedancia de una monocapa de HUVEC tratada con los principales ITC que se usan en clínica: dasatinib, imatinib, nilotinib, bosutinib, y ponatinib y vehículo (DMSO), a las concentraciones que se encuentran en plasma tras la toma del fármaco (Figura 26). Observamos que dasatinib disminuye de forma inmediata la impedancia celular y lo hace de una manera dosis dependiente^{109,136,137}. Así, después de 2h de tratamiento con 5 y 10nmol/L de dasatinib, observamos una leve disminución de la impedancia, que se hace considerable con 25 y 50

nmol/L del fármaco, mientras que a 100nmol/L (dosis equivalente a los niveles del fármaco en plasma 1h después de la administración de 100mg de dasatinib por vía oral) dasatinib produce una dramática disminución de la impedancia. (Figura 26 A). Por el contrario, no observamos efecto sobre la impedancia cuando tratamos durante 2h con imatinib 2 μ mol/L, y el efecto con imatinib 10 μ mol/L fue mínimo (Figura 26 B). No observamos ningún efecto cuando realizamos el tratamiento con el resto de ITC a las dosis equivalentes a los niveles plasmáticos tras la toma, nilotinib (1 y 5 mmol/L), bosutinib (100 y 500 mmol/L), y ponatinib (20 y 100 nmol/L) (Figura 26 C). Los inhibidores se disolvieron en DMSO y se diluyeron hasta 1:5000 en medio de cultivo para evitar cualquier efecto sobre la impedancia. (Figura 26 D).

Para evaluar si el efecto de dasatinib sobre la monocapa endotelial es un efecto reversible, retiramos el tratamiento con el inhibidor, añadimos medio nuevo, y medimos la impedancia nuevamente durante una hora en ausencia de dasatinib. Los resultados revelaron que dasatinib altera la integridad de la monocapa de una manera reversible puesto que las medidas de impedancia se recuperaron rápidamente hasta valores iniciales.

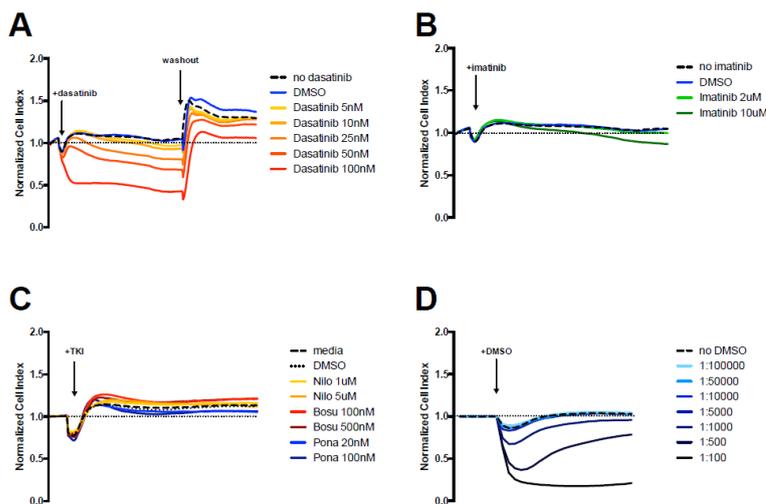


Figura 26. Seguimiento, a tiempo real, de la impedancia de una monocapa de HUVEC tratada con los principales ITC que se usan en clínica. De los ITC estudiados, dasatinib es el único que produce un descenso reversible y dosis-dependiente de la impedancia sobre las HUVEC. Las células se cultivaron sobre las placas *iCELLigence E8 plates* proporcionadas por el equipo, hasta alcanzar confluencia. En ese momento, diferentes concentraciones de (A) Dasatinib (B) Imatinib (C) Nilotinib, Bosutinib, Ponatinib, o (D) DMSO se añadieron a los pocillos durante 2 horas. Se retiró el medio con dasatinib añadiéndose medio nuevo sin inhibidores y se estudió la impedancia en los pocillos durante 1 hora mientras las células se recuperaban.

5.3. Dasatinib induce una desorganización de citoesqueleto de actina de forma rápida y reversible y produce una retracción de las uniones interendoteliales

Después de observar los efectos de dasatinib sobre la impedancia, decidimos estudiar cómo afectaba a la organización de la monocapa a través del análisis de la polimerización de F-actina mediante tinción con Faloidina (Figura 27). A concentración 10 a 25nmol/L, dasatinib produce una leve separación entre las células (Figura 27) y una modesta disminución de la F-actina "junctional", que encontramos en las uniones célula-célula, consistente con el leve efecto de esas dosis sobre la impedancia. Sin embargo, a 50nmol/L dasatinib tiene un efecto mucho más evidente: observamos un importante descenso de la actina "junctional" y la aparición de prolongaciones ricas en F-actina, tipo lamelipodios, en las zonas de separación entre las células. Por último, a 100 nmol/L dasatinib induce una pérdida completa de la integridad de la monocapa. Las células aparecen aisladas o en pequeñas islas con frecuentes prolongaciones tipo lamelipodio, tal y como revelan los rebordes de F-actina en sus frentes redondeados. (Figura 27, flechas). Sin embargo, imatinib a 10 μ mol/L no tiene efectos en la monocapa.

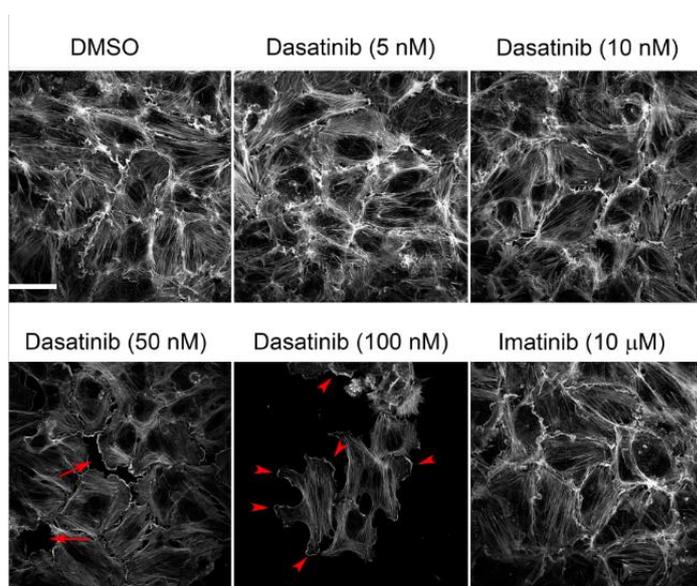


Figura 27. Dasatinib desorganiza el citoesqueleto de actina y rompe las uniones célula-célula de una forma reversible y dosis-dependiente. Las HUVEC se cultivaron sobre cubreobjetos recubiertos con gelatina hasta alcanzar confluencia. A, Estudio al microscopio de análisis dosis-respuesta del efecto de Dasatinib sobre el citoesqueleto de actina. Cuando las células alcanzaron confluencia se trataron con Dasatinib durante 2h a diferentes concentraciones (ó Imatinib 10 μ mol/L durante 2h). Las células fueron permeabilizadas e incubadas con Alexa 647-faloidina para detectar la F-actina.

Con el fin de caracterizar en profundidad el efecto de dasatinib en las uniones célula-célula, analizamos la expresión de VE-cadherina, que dejaba de detectarse en las uniones homotípicas de las HUVECs tratadas con dasatinib durante 2 horas (Figura 28). Sin embargo, cuando retirábamos el medio con dasatinib y añadíamos medio nuevo, comprobábamos que tras una hora las uniones célula-célula se restituían tal y como revelaba el marcaje con VE-cadherina. Estos datos indican que dasatinib

desestructura las uniones célula-célula de forma concomitante a la desaparición de la VE-cadherina en las uniones intercelulares.

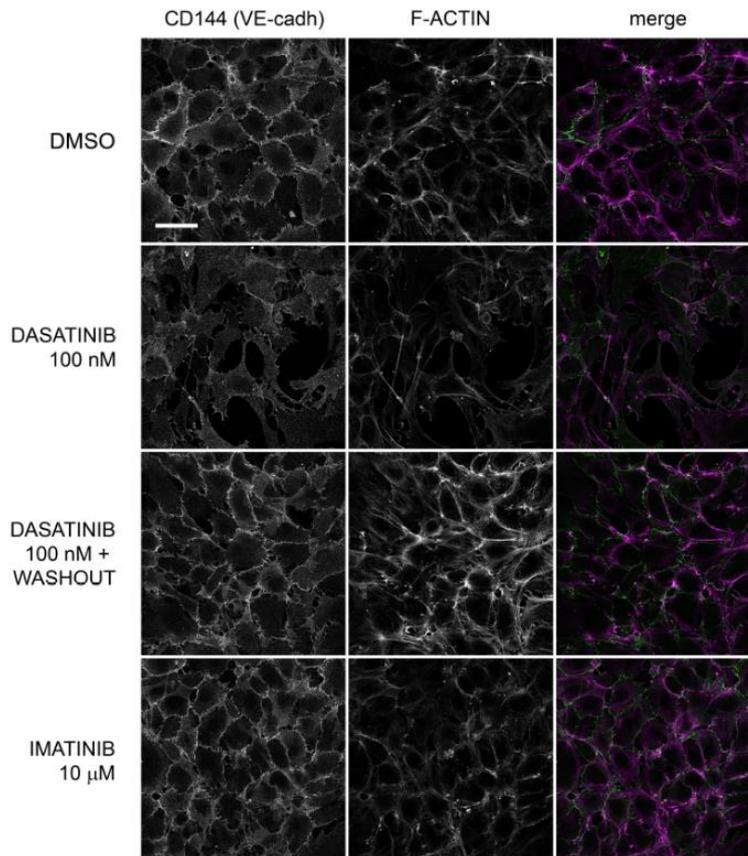


Figura 28. HUVECs en confluencia fueron tratadas con Dasatinib 100 nmol/L o Imatinib 10 μmol/L durante 2h; después del tratamiento, algunos pocillos se lavaron 3 veces con medio atemperado y se las células se cultivaron con medio fresco sin ITC durante 1 hora más. La tinción con VE-Cadherina y faloidina se realizó tal y como se especifica en materiales y métodos para poder analizar simultáneamente las uniones intercelulares y el citoesqueleto de actina. Todas las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de fluorescencia *Leica DMR* usando un objetivo de inmersión 20x y lámpara de Xenon. Se realizaron 3 experimentos independientes y se muestran imágenes representativas de los 20 campos adquiridos por condición. Escala/Barra de referencia 50 μm.

A continuación, analizamos la dinámica de la desestructuración y formación de las uniones, mediante microscopía “time-lapse” de células vivas. Añadimos dasatinib a la monocapa confluyente de HUVEC y tomamos fotos en un microscopio confocal cada minuto; observamos como, de una manera rápida, las uniones célula-célula se desorganizaban y se abrían espacios entre las células, apreciables ya desde los 6 minutos de añadir dasatinib. Tras una hora, la monocapa endotelial estaba desestructurada y solo se conservaban algunas uniones puntuales (Figura 29 A, arriba) (Video). Sin embargo, imatinib no tenía efecto significativo sobre la integridad de la monocapa (Figura 29 A, abajo). De nuevo, cuando retirábamos el medio con el fármaco y añadíamos medio nuevo, aproximadamente a los 10 min se comenzaba a recuperar la integridad de la monocapa, y a los 40 min la recuperación era total (Figura 29 A, video suplem2).

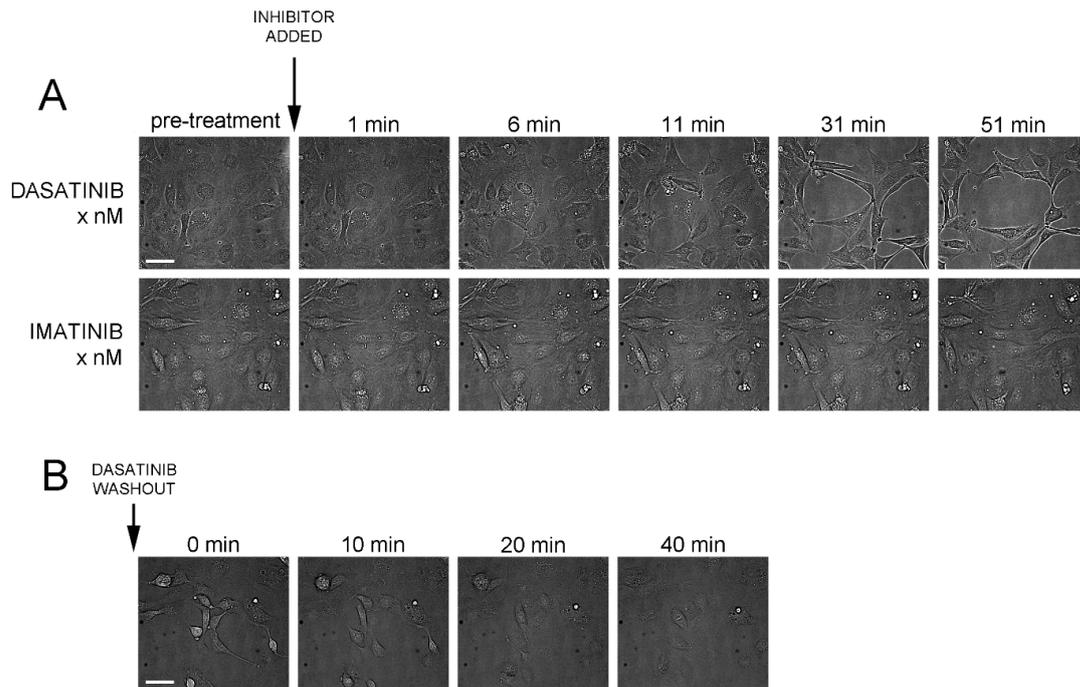


Figura 29. Imágenes *in vivo* del efecto del dasatinib sobre las uniones célula-célula. Las HUVECs fueron cultivadas en cubreobjetos recubiertos con gelatina. Cuando alcanzaron confluencia, se añadió dasatinib 100 nmol/L ó imatinib 10 μ mol/L y se adquirieron imágenes al microscopio cada minuto durante 1 hora. B) A continuación, se les retiró el medio de cultivo, se lavaron las células 3 veces y se añadió medio de cultivo fresco adquiriendo imágenes cada minuto durante 1 hora de incubación adicional. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido automatizado IX83, Olympus equipado con una incubadora para controlar temperatura y CO₂, y las fotos se realizaron con una cámara EM-CCD (512x512) Hamamatsu usando un objetivo de inmersión 20x NA 0,75.

5.4. Dasatinib retrasa el cierre de brecha al inhibir la formación de los contactos célula-célula.

El efecto de dasatinib sobre la integridad de la monocapa endotelial sugiere un papel crucial del fármaco sobre la organización de la actina en las uniones célula-célula. Esto nos llevó a estudiar el papel de dasatinib en circunstancias en las que la integridad de la monocapa se ve afectada por otros factores externos como puede ser un daño mecánico sobre la monocapa. Para ello, realizamos experimentos de cierre de brecha o herida (*wound healing*) en ausencia o presencia de diferentes ITC (Figura 30). En este tipo de ensayo, la recuperación de la integridad de la monocapa requiere una migración celular inicial seguida de la formación de uniones estables. El área de la brecha, en ausencia de ITC, fue disminuyendo de manera similar que en presencia de nilotinib, bosutinib e imatinib y se cerró completamente a los 420 min (Figura 30 A). Sin embargo, cuando las células se cultivaron con dasatinib, el cierre de la brecha fue significativamente más lento, de forma que tras 12 h de realizar la brecha aún permanecía abierta un 30% de la herida.

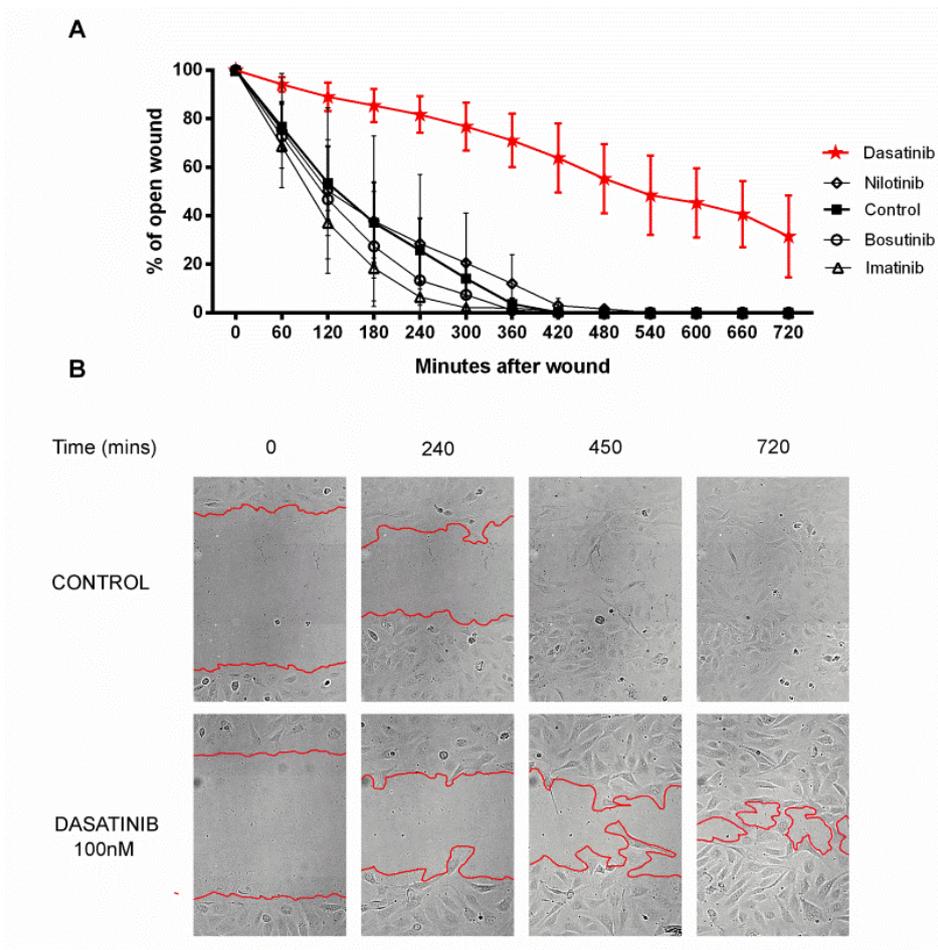


Figura 30. Experimentos de cierre de brecha o herida (*wound healing*) en ausencia o presencia de diferentes ITC. A) Porcentaje de área abierta de los diferentes ITC medida a diferentes tiempos medidos en minutos. **B)** Imágenes en las que se muestra una comparativa del progreso de cierre de brecha sobre una capa de células HUVEC control y las células HUVEC tratadas con dasatinib a diferentes tiempos medidos en minutos.

Con filmación “time-lapse” de este proceso observamos que dasatinib comprometía la integridad del avance de la monocapa endotelial, promoviendo la emergencia de células aisladas que migraban individualmente en el frente y que se despegaban perdiendo cualquier contacto con las células vecinas. Cuando examinamos exhaustivamente el avance de la monocapa tratada con dasatinib, observamos una pérdida de los contactos célula-célula y la aparición de rasgos mesenquimales como lamelipodios en las células del frente posterior (Figura 30 B). Estos resultados sugieren que dasatinib no previene la migración celular pero inhibe la formación del contacto entre células; de esta forma promueve una migración más individual, no-colectiva y por lo tanto retrasa el restablecimiento de la integridad de la monocapa.

5.5. Dasatinib aumenta la actividad de la miosina II/ROCK

El efecto de dasatinib sobre la organización del citoesqueleto de actina y la desaparición de la actina “junctional” sugieren una alteración en las vías de señalización involucradas en la remodelación de la actina. Uno de los principales reguladores de la remodelación de la actina es la NMII. Para estudiar su papel en la remodelación del citoesqueleto de actina inducida por dasatinib, tratamos la monocapa de HUVEC con dasatinib y otros ITC y medimos su efecto en la fosforilación de los residuos Ser19 y Thr18/Ser19 de la cadena ligera de la miosina (CLM), que son marcadores “bona-fide” de la activación de la NMII^{138,139}. Para ello realizamos experimentos de WB que demostraron que dasatinib inducía un modesto pero reproducible aumento de la fosforilación de CLM a nivel de los residuos de Ser19 y Thr18/Ser19, que se mantiene incluso tras el lavado de las células (Figura 31 A-C), lo que sugiere que dasatinib reorganiza la actina a través de una modulación de la actividad de NMII. Estos cambios además alteran la distribución de las uniones célula-matriz, que en las células tratadas con dasatinib, se vuelven más definidas y afiladas comparadas con las células no tratadas (Figura 31 D). Para caracterizar los efectos de dasatinib sobre la fosforilación de la CLM decidimos estudiar la implicación de ROCK, para lo que tratamos las HUVEC con el inhibidor de ROCK Y-27632, en presencia o en ausencia de dasatinib. Como era de esperar, Y-27632 inhibía la fosforilación de CLM en los residuos mencionados arriba (Figura 31 E) y cuando las células se pretrataban con Y-27632, dasatinib ya no era capaz de fosforilar la CLM (Y-27632+dasatinib 100nM). Sin embargo, cuando Y-27632 se retiraba del medio y las células se cultivaban durante 1-2 horas adicionales con medio fresco sin inhibidores, se volvía a recuperar la fosforilación de la CLM, tanto en las células que no habían sido tratadas con dasatinib (Y-27632 washout) como en las que sí (Y-27632+dasatinib 100 nm washout). Por su parte, ninguno de los demás ITC empleados en estos experimentos indujo la fosforilación de la CLM (Figura 31 A). Cuando la fosforilación del residuo Ser19 se estudió por inmunofluorescencia y microscopía observamos resultados similares: dasatinib produce un aumento modesto y reproducible de la fosforilación de Ser19; Y-27632 elimina todo rastro de dicha fosforilación y dasatinib la recupera solo en parte (Figura 31 B y C). Por otra parte, quisimos estudiar el efecto de dasatinib sobre la fosforilación de MYPT1 en los residuos de Thr696 y Thr853, que son dos sitios de regulación a través de los cuales ROCK previene la defosforilación de NMII y su inactivación. También en este caso dasatinib parece recuperar la fosforilación MYPT1 en Thr853, y especialmente en Thr696 (Figura 31 E).

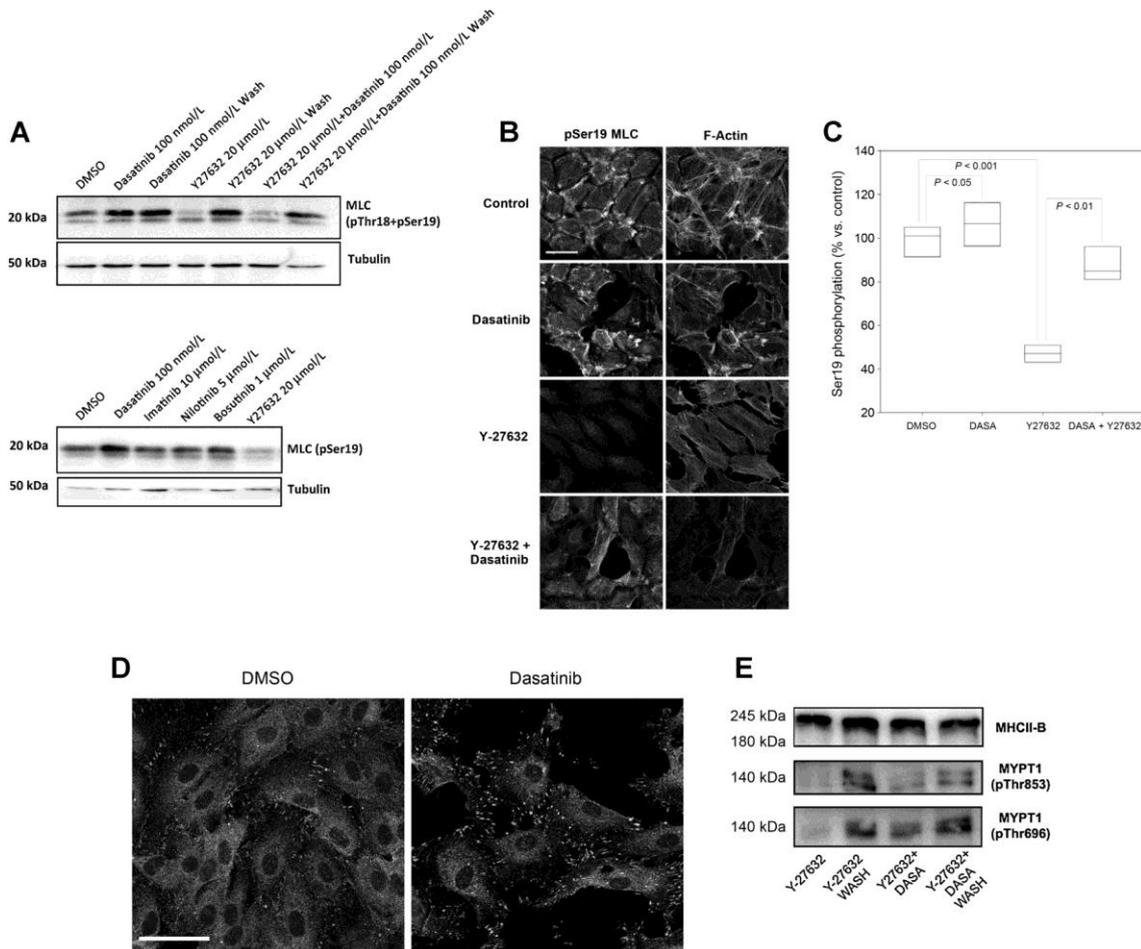


Figura 31. Dasatinib altera las uniones célula-célula a través de la fosforilación de la CLM y una activación de la NMII. A). Experimentos de western blot de los residuos pThr18 y pSer19 de la CLM. Las células se cultivaron hasta alcanzar confluencia en y se trataron con los inhibidores a las dosis indicadas durante 1 hora. En las condiciones que incluyen lavado, las células fueron tratadas con los inhibidores durante 1 hora, y a continuación se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco y se incubaron durante 1 hora adicional. Se muestra tubulina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3; B) Se muestran imágenes de microscopía confocal de HUVECs confluentes incubadas con los inhibidores indicados (100 nmol/L dasatinib, 20 μmol/L de Y-27632, solos o combinados) durante 1 hora. Las células fueron fijadas e incubadas para identificar MLC fosforilada en Ser19 y F-actina. Barra de referencia 50 μm. C) Cuantificación densitométrica de los campos mostrados en B (ver *Materiales y Métodos*): los datos recogen las medidas de más de 10 campos (40x) de dos experimentos independientes, que corresponden a un total de más de 200 células. Se analizó estadísticamente usando el test de Mann-Whitney. D) Imágenes de microscopía confocal de células HUVEC en cultivo confluyente incubadas con DMSO o Dasatinib 100 nmol/L durante 2 horas. Las células fueron fijadas e incubadas con vinculina para identificar las adhesiones focales. Se muestran imágenes representativas de los 20 campos por condición adquiridas en tres experimentos independientes. Barra de referencia 50 μm. E) Experimentos de western blot de los residuos residuos Thr696 y Thr853 de la MYPT1. Se cultivaron células HUVEC en confluencia y se trataron con Y-27632 (20 μmol/L), sólo o en combinación con Dasatinib durante 1 hora. En la condición de lavado, se retiró el medio con los inhibidores y se incubaron durante 1 hora adicional con medio fresco. Como control de carga se muestra MHCII-B (cadena pesada de miosina II). Se muestra un experimento representativo de 3.

Discusión

El papel del SI en la defensa contra tumores es cada vez más obvio, como lo demuestran las múltiples evidencias de la eficacia de la inmunoterapia en sus diversos abordajes. De hecho, en la enfermedad que nos ocupa, el tratamiento de elección durante muchos años fue el IFN-alfa, cuyo beneficio se suponía derivado de sus efectos inmunomoduladores; por su parte, la forma más clásica de inmunoterapia como es el trasplante de progenitores hematopoyéticos, era la única cura posible. A pesar de ello, hasta la fecha, se han hecho pocos esfuerzos por conocer cuál es la composición y funcionalidad del SI en el momento del diagnóstico en las distintas neoplasias hematológicas; tampoco está claramente definido si las diferencias entre los distintos cánceres hematológicos o incluso si las diferencias entre individuos que padecen el mismo tumor condicionan la capacidad de defensa del SI; finalmente, apenas existen estudios que asocien el estado basal del SI al diagnóstico y/o cómo responde el SI a los distintos tratamientos con el pronóstico y la supervivencia de los pacientes.

En los escasos estudios que hemos encontrado sobre el recuento de las principales subpoblaciones linfocitarias del SI, no se han detectado diferencias importantes entre sujetos sanos y pacientes con LMC al diagnóstico. Así, Rohon et al.¹⁴² solo detectan una disminución de LB y un aumento de linfocitos NKT antes de empezar el tratamiento, mientras que no observan diferencias en las proporciones y valores absolutos de los LT CD4+ y CD8+ o NK. Hace ya muchos años, Fuyimiya Y et al.¹⁴³ y describieron que los valores de las células NK en los pacientes con LMC eran normales mientras que Pierson BA et al.¹⁴⁴ observaban una disminución no muy llamativa del valor absoluto de las células NK, no así del valor relativo y una disminución de la proporción de la subpoblación linfocitos NK CD56bright. Finalmente, Chen CI et al.¹⁴⁵ tampoco ven una disminución de las subpoblaciones T CD4+ y T CD8+ pero sí de la proporción de células NK. Es posible que su estrategia de análisis que no incluye la molécula CD16 en el recuento de las células NK pueda explicar esta diferencia.

En líneas generales, estos datos coinciden con los nuestros ya que no detectamos diferencias significativas en las principales subpoblaciones linfocitarias entre sujetos sanos y pacientes de LMC al diagnóstico. Sin embargo, a diferencia de otros grupos, nosotros hemos analizado en detalle los distintos tipos de linfocitos y hemos podido detectar alteraciones importantes al diagnóstico. El hallazgo más significativo sin duda es la importante disminución de la selectina L, en todos los subtipos linfocitarios en el momento del diagnóstico. El hecho de que los linfocitos presenten menor expresión de esta selectina probablemente afecte negativamente a la RI antileucemia ya que se dificultará la migración y entrada de los LT en los OLS y por lo tanto la capacidad de montar una respuesta inmunitaria contra los ag expuestos por las células presentadoras de ag. Tanto es así que una publicación reciente¹⁴⁶ confirma la importante disminución de CD62L en las muestras de los pacientes con LMC al diagnóstico y asocia de forma muy clara la magnitud de dicha disminución con el pronóstico de los pacientes. Por otra parte, también hemos observado que dasatinib no es capaz de recuperar completamente la expresión de CD62L hasta los niveles de normalidad y sería, por tanto, interesante validar el valor pronóstico de CD62L al diagnóstico y también su valor como biomarcador de respuesta a los ITC y de remisión libre de tratamiento.

En consonancia con la disminución de CD62L también observamos la disminución de otras moléculas asociadas al fenotipo naive como CCR7 y un descenso significativo de los propios T_N CD8+. Estos datos hablan a favor del acúmulo de linfocitos T de memoria o incluso exhaustos que se observa o se supone que se da, de forma característica, en otros tumores. Hasta donde sabemos este es el primer estudio de LMC donde se confirma este descenso de T_N que dificultaría la RI frente a nuevos ag derivados de la progresión tumoral. En este sentido, parecería lógico esperar un aumento de los T_{EM} o T_{EMRA} CD8+ en los pacientes recién diagnosticados que sin embargo no hemos observado en nuestro estudio. Es posible que la estrategia de análisis (que no incluía CD62L y/o CD27), la propia heterogeneidad de la expresión de CD62L (que se mantiene en algunos LT efectores) o el reducido número de pacientes expliquen esta aparente contradicción.

Siempre en el contexto del estudio de los LT CD8+, observamos que los LT CD8+NKG2D+ también están disminuidos al diagnóstico. De nuevo estos datos hablan a favor de una pérdida de la capacidad de los LT citotóxicos para eliminar las células tumorales.

En cuanto a los LT CD4+ unos de los hallazgos más significativos e interesantes de esta tesis es la clara disminución de coexpresión de la molécula DNAM o CD226 en los LT CD4+. En el caso concreto de los LT CD4+, DNAM es una molécula de adhesión que media la señalización de la molécula coestimuladora LFA-1 en la sinapsis inmunitaria y facilita la polarización de los LT CD4+ hacia Th1¹⁴⁷; de forma que su ausencia o disminución en la superficie de los T CD4+ disminuye la síntesis de IL-2, la proliferación y la producción de IFN-gamma. Es curioso además que la función de coestimulación de DNAM en la sinapsis inmunitaria es más relevante (o al menos está mejor demostrada) en los LT CD4+ que en los LT CD8+. Parece por tanto que la LMC produce un descenso muy importante en esta molécula en los LT CD4+ y eso probablemente contribuye a la disminución de la polarización de los LT CD4+ naive hacia Th1, cuyo papel en el control de los tumores es bien conocido¹⁴⁸.

Por su parte, el tratamiento crónico con dasatinib recupera cifras de normalidad en casi todas las subpoblaciones mencionadas arriba, lo que puede deberse tanto a la eliminación del tumor en sí y por tanto del estímulo antigénico crónico, como al propio efecto inmunomodulador de este fármaco. En este sentido es interesante señalar cómo dasatinib induce de forma significativa, aunque solo en algunos pacientes, la expresión en superficie de la molécula HLA-DR que es índice de activación celular en los LT y las células NK. Este hallazgo ya fue reportado por Rohon et al. hace años. Además de este aumento de DR, dasatinib produce a lo largo del tiempo una acumulación de T_{CM} y T_{EMRA} y una disminución correspondiente de T_N y de moléculas coestimuladoras como CD27 o CD28 (Figura 16). Es por tanto plausible que dasatinib tenga un efecto inmunomodulador directo capaz de activar los linfocitos y de ese modo contribuir al control de la enfermedad. La alternativa es que los casos en los que se observa una mayor activación o diferenciación celular sean aquellos en los que no hemos sido capaces de erradicar la enfermedad mínima residual. Sería por tanto muy interesante investigar si aquellos pacientes que presentaban niveles altos de HLA-DR o un fenotipo más diferenciado son aquellos que han alcanzado una respuesta molecular profunda o, por el contrario, son aquellos que han necesitado un cambio de

tratamiento. Este tipo de estudios serían muy interesantes en la actualidad con el fin de identificar marcadores de remisión libre de tratamiento, en un momento en el que las interrupciones del tratamiento con ITC representan la tendencia en el manejo terapéutico de la LMC y en el que se cree que el buen control por parte del SI es el responsable de que los pacientes con enfermedad mínima residual no recaigan de forma franca.

En cuanto a las células NK, en el momento del diagnóstico observamos un fenotipo asociado a células NK sometidas a una estimulación crónica como la disminución de moléculas activadoras; entre ellas disminuye de forma significativa NKp30, mientras que la disminución de otras como NKp46, CD161, DNAM o NKG2D no alcanza significación estadística. También observamos una tendencia a que los pacientes recién diagnosticados tengan mayores proporciones de células NK CD56+CD16+. A excepción de este último hallazgo (probablemente por diferencias en la estrategia de análisis), nuestros datos son muy similares^{149,150} a los publicados recientemente, lo que apoya que las células NK al diagnóstico tienen un fenotipo de célula madura o incluso exhausta. Es interesante señalar que, en algunos casos como precisamente el del NKp30, el tratamiento crónico con dasatinib no es capaz de restaurar los valores de los sujetos sanos. De nuevo no sabemos si ello se debe a que dasatinib ejerce un efecto activador o de diferenciación per se, o a que no es capaz de revertir un estado de “exhaustion” condicionado por la duración de la enfermedad en sí, por su gravedad, o por la persistencia de la EMR. Por ello sería muy interesante realizar un estudio prospectivo en el que pudiésemos asociar estos fenotipos diferenciales con la respuesta al tratamiento. En este sentido, de momento, no hay datos claros sobre el perfil inmunitario que se asocia a una mejor y más duradera respuesta terapéutica, si exceptuamos los valores de las células NK totales que parecen asociarse a la recaída tras la interrupción de los ITC^{145,151}.

De hecho, la principal limitación para conocer la asociación entre la recuperación de la funcionalidad del SI en respuesta a los ITC es la falta de estudios longitudinales en la misma cohorte de pacientes donde se estudie la RI en el momento del diagnóstico, durante el tratamiento con los ITC y una vez que se alcanza la RM profunda. Tampoco hay estudios de este tipo en el que se comparen distintos ITC. Otra importante limitación en esta área de conocimiento es la escasez de estudios en los que se combinen estudios inmunofenotípicos y funcionales. Sabemos que el tratamiento con los ITC recupera la respuesta efectora del SI como el restablecimiento de las respuestas de los LT a ag de la leucemia, la recuperación de la funcionalidad de las células NK o disminución de poblaciones supresoras como los LT reguladores o las MDSC¹⁵². Los estudios de la capacidad funcional del SI son en general complejos y de difícil estandarización por lo que lo ideal sería que fuésemos capaces de asociar determinados fenotipos con capacidad funcional, con el fin de establecer biomarcadores robustos de pronóstico y/o respuesta al tratamiento y/o de remisión libre de tratamiento.

En este sentido uno de los objetivos iniciales del estudio Dasapost era la asociación de distintos parámetros inmunitarios fenotípicos y funcionales, ya fuese al diagnóstico como durante el seguimiento de los pacientes, con la respuesta al tratamiento con dasatinib. El identificar un potencial marcador inmunológico pronóstico que ayude a predecir cómo va a ser la respuesta al tratamiento por parte del

paciente sería de enorme ayuda para el manejo de los pacientes. Desafortunadamente, el reclutamiento de este ensayo no fue el esperado y contábamos con un número bajo de pacientes; por tanto se decidió no realizar un análisis estadístico amplio que incluyera todas las subpoblaciones linfocitarias analizadas sino aquellos parámetros de laboratorio e inmunológicos más fáciles de determinar en la práctica clínica diaria. A pesar del escaso número de pacientes pudimos comprobar una clara asociación entre la RMM y los valores de linfocitos, especialmente con los valores absolutos de los LT CD8+, cuyos valores a tiempo 0 son más altos en aquellos pacientes que alcanzarán RMM a 3 y 6 meses. Por otra parte, la magnitud del aumento de células NK que se produce entre las muestras pre y post en tiempo de 6 meses también se asocia con la consecución de RMM a los 12 meses de comenzar dasatinib. En este sentido, nuestro trabajo demuestra como el “estado inmunológico” a tiempo cero así como la magnitud de la linfocitosis experimentada en la primera toma del fármaco son variables asociadas a la respuesta al tratamiento¹⁵³. Sería interesante dar un paso más, y dado que disponemos del fenotipo detallado de los linfocitos de los pacientes Dasapost en las muestras pre y post de los 3 tiempos de estudio, así como de ensayos funcionales de citotoxicidad que también se realizaron (aunque no se muestran en la presente tesis) comprobar si otros parámetros inmunológicos también se asocian a respuesta molecular temprana. Dicho de otra manera, profundizar más en el estado inmunológico basal e identificar y caracterizar fenotípica y funcionalmente las poblaciones linfocitarias que puedan jugar un papel en la respuesta al tratamiento. De momento, nuestros resultados subrayan la importancia como factor pronóstico del estado inmunológico previo al inicio del tratamiento, y el probable papel antileucémico de los linfocitos T CD8+ cuyo valor proponemos estudiar cuantificar e incluir como una variable muy simple en estudios futuros con dasatinib. Nuestros datos también apoyan el valor pronóstico del estado de “supresión inmunológica” de los pacientes al diagnóstico y de su progresiva recuperación numérica y funcional durante la terapia con los ITC, en la consecución de objetivos terapéuticos tales como el tiempo en alcanzar respuesta terapéutica, la profundidad de dicha respuesta así como el tiempo de remisión sin tratamiento.

Otro de los objetivos de la presente tesis era la posible asociación de la respuesta clínica con alguno de los parámetros inmunológicos. Algunos grupos han publicado la existencia de una asociación significativa entre respuesta y linfocitosis. El identificar un potencial marcador inmunológico pronóstico que ayude predecir cómo va a ser la respuesta al tratamiento por parte del paciente sería de enorme ayuda a nivel terapéutico. En nuestro trabajo, la trombocitosis, neutrofilia y linfocitosis basal, previa al tratamiento, así como un mayor número de linfocitos T CD8+ se relacionaban con una RMM temprana a los 3 meses.

Otro de los objetivos de esta tesis ha sido indagar las causas de la linfocitosis que se produce durante el tratamiento con dasatinib, en primer lugar por su asociación con una mejor respuesta terapéutica y en segundo lugar porque la dilucidación de sus causas podría contribuir a un mejor uso en la LMC o a un uso alternativo del fármaco en otras patologías. La linfocitosis es un efecto que se produce con el uso prolongado del fármaco en un cierto porcentaje de pacientes pero que se produce en una inmensa mayoría de pacientes en las primeras horas tras la toma del fármaco, tal y como describieron por

primera vez Mustjoki S et al.¹³⁰. Por tanto, el estudio detallado de las poblaciones responsables de esa rápida linfocitosis podía contribuir a la identificación de las causas. En primer lugar confirmamos los hallazgos del trabajo mencionado y observamos que se produce un aumento del número absoluto de todas las subpoblaciones linfocitarias y un aumento de la proporción de las poblaciones citotóxicas CD8+ y NK. Este aumento de las poblaciones citotóxicas durante el tratamiento crónico con dasatinib había sido descrito hacía años y por tanto parece establecido que este ITC favorece la movilización de células citotóxicas. Sin embargo, el estudio detallado que nosotros hemos llevado a cabo desvela que en realidad lo que se produce es un aumento de células efectoras tanto en los LT CD4+ como en los LT CD8+. Así, hemos observado, que desde la primera administración de dasatinib, de una manera rápida tras la toma y con cada una de ellas, el porcentaje de linfocitos T_N y T_{CM} en SP disminuye y aumenta significativamente la proporción de linfocitos efectores de memoria. Además, estos efectos se hacen crónicos de forma que tras 6 meses de tratamiento, en la SP de los pacientes se tienden a acumular más linfocitos T_{EMRA}.

Esta rápida movilización de células T efectoras va acompañada de una disminución en SP de células que coexpresan moléculas asociadas a T_N y T_{CM} tales como CD62L, CCR7 o CD27. Por otra parte, en las muestras post también aumentan moléculas asociadas a activación como HLA-DR, CD11c o CD161, tanto en los LT CD4+ como en los LT CD8+. Sin embargo, no se producen cambios muy significativos en la molécula CD45RA, clásicamente considerada como un marcador de T_N, porque también se expresa en los T_{EMRA}. De ahí la importancia en incidir en que la identificación de los distintos estadios madurativos de los linfocitos no se debe realizar exclusivamente con las isoformas de CD45.

En cuanto a las células NK, lo que observamos de forma inmediata tras la toma del fármaco es una disminución en las moléculas de adhesión CD62L y CD11b, disminución del receptor inhibidor tipo lectina NKG2A y aumento de la expresión de receptores tipo KIR, también inhibidores. Este perfil fenotípico es el característico de células NK más diferenciadas y/o activadas (la activación reciente de las células NK produce una disminución de CD11b) y probablemente con más capacidad citotóxica. Es muy interesante destacar que, junto con la disminución de CD62L, la molécula NKG2A es la única que además de disminuir en cada toma, disminuye a largo plazo de forma significativa (Figura 19). De nuevo estos datos coinciden con un trabajo muy reciente en el que observan que el tratamiento crónico con dasatinib, pero no con otros ITC solo modifica (disminuye) NKG2A y KIR3DL1. Al igual que ellos, nosotros observamos una disminución de NKG2A entre el grupo de pacientes al diagnóstico y el de los tratados con dasatinib de forma crónica (36,73% vs 31,74%) que sin embargo en nuestro caso no es significativa, muy probablemente debido a la heterogeneidad de los pacientes de dicho grupo comparado con los suyos. Este efecto de disminución de la expresión de NKG2A se ha asociado a un aumento de la citotoxicidad global NK y por tanto contribuiría a la mayor eficacia de este fármaco en tratamiento de LMC, por lo que se ha propuesto como un nuevo mecanismo antitumoral de dasatinib¹⁴⁹. La inmunoterapia con un ac dirigido contra NKG2A en leucemia linfocítica crónica mejora la actividad citotóxica de las células NK en esta patología¹⁵⁴ y por tanto se podría extrapolar a la LMC.

En conjunto, en cuanto a la repercusión funcional de esta rápida movilización de linfocitos T y NK efectores y/o activados a SP y, verosíblemente, a MO podemos plantear la hipótesis de que la llegada de este tipo de LT a los nichos donde se desarrolla la LMC puede contribuir a la eficacia terapéutica de dasatinib. Hay que tener también en cuenta que nuestros datos demuestran que esta movilización tiene lugar cada vez que se toma el fármaco y por tanto se produce, verosíblemente, a diario. En este sentido, quisimos asociar la movilización de estas subpoblaciones con el pronóstico. Para ello estudiamos si aquellos pacientes con linfocitosis y, por tanto, en teoría con mejor pronóstico también movilizaban estas subpoblaciones¹²⁷. El estudio de los tres pacientes clasificados como “no-movilizadores” y por lo tanto que no experimentaban la linfocitosis causada por dasatinib nos permitió confirmar que tampoco experimentaban cambios en la distribución de las distintas subpoblaciones linfocitarias; es posible por tanto que la movilización diaria de LT efectores a sangre y a médula contribuya a que dasatinib induzca remisiones moleculares más profundas que otros ITC.

Volviendo a las posibles explicaciones de la linfocitosis, dado que dicha linfocitosis tiene lugar de forma muy rápida, los mecanismos responsables más plausibles tenían que ver con la capacidad migratoria o de reclutamiento de los linfocitos.

En cuanto al patrón de expresión de receptor de quimiocina CXCR3 vemos que en los linfocitos T CD8+ aumenta tras la toma mientras que en los T CD4+ disminuye. Esto puede explicarse porque estos receptores permiten distinguir entre las subpoblaciones de linfocitos T en función de su perfil de secreción de quimiocinas Th. En el caso de CXCR3 es expresado tanto por los linfocitos T_{CM} CD4+ CCR7+ (Pre-Th1) como por los linfocitos T_{EM} CD4+ CCR7- (Th1). En nuestros resultados, lo que observamos es un aumento de los linfocitos T_{EM} y una disminución de los linfocitos T_N.⁵

Así en primer lugar nos planteamos si dasatinib afectaba a la capacidad migratoria de los linfocitos, evitando la extravasación y recirculación linfocitaria de los mismos, permaneciendo en el torrente circulatorio tras la toma, y provocando así esa linfocitosis transitoria que se refleja en el hemograma. La hipótesis concreta era que dasatinib inhibe la migración de los linfocitos hacia órganos linfoides secundarios lo que produce un acúmulo de dichas células en SP. Para confirmar o descartar la hipótesis, realizamos en paralelo los estudios inmunofenotípicos que hemos discutido arriba y experimentos de migración in vitro. Comprobamos que se producía una menor migración de los linfocitos de SP hacia las quimiocinas CCL19 y CCL21, que median la entrada y posicionamiento de las células CCR7+ en OLS. Este hallazgo se debería sin embargo haber acompañado de un acúmulo de T_N y T_{CM} en SP y nuestros datos apuntaban en la dirección opuesta, ya que como mencionábamos antes, lo que se produce es un acúmulo de linfocitos efectores CCR7-. La migración hacia CXCL12, el ligando de CXCR4 (otro de los receptores de quimiocinas implicados en la entrada en OLS) no se veía afectada. La explicación más plausible a estos hechos es que la propia disminución de la proporción de células CCR7+ en las muestras post cause la menor migración hacia CCL19+21 en dichas muestras. Además, en experimentos ex vivo, con PBMC de donantes sanos, dasatinib no parece afectar a la expresión de CCR7

ni a la quimiotaxis hacia las quimiocinas ligando de CCR7. Sin embargo, sí que detectamos un descenso significativo en la migración espontánea de los linfocitos.

Tras estas observaciones, podemos concluir que la linfocitosis mediada por dasatinib puede explicarse en parte por una redistribución y acumulación de linfocitos T CD4+ y T CD8+ terminales/diferenciadas CCR7- en circulación. En este sentido, nos planteamos dos posibilidades: la primera que dasatinib esté reclutando o movilizándolo linfocitos CCR7- procedentes de OLS o tejidos periféricos, y la segunda que esté afectando a la salida de linfocitos de memoria efectores o diferenciados hacia tejidos periféricos, provocando un bloqueo temporal (o acumulativo en algunos pacientes) en el torrente circulatorio que se traduciría en un aumento del recuento absoluto de linfocitos. La inhibición de la migración espontánea observada en los experimentos *in vitro* apoya esta última posibilidad en un escenario donde las células CCR7+ abandonarían el torrente circulatorio a favor de un gradiente quimiotáctico y los linfocitos CCR7- quedarían temporalmente bloqueados/retenidos en SP debido a los efectos, aún por esclarecer, de dasatinib sobre la motilidad, adhesión y/o deformabilidad sobre los linfocitos CCR7-. Sin embargo, no podemos excluir que esos mismos efectos estén afectando a las células CCR7+ aunque no seamos capaces de detectarlo porque el estímulo quimiotáctico de CCL19/CCL21 esté prevaleciendo sobre el efecto de dasatinib, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En cuanto a los mecanismos que podrían propiciar “suelta” de linfocitos de tejidos y OLS hacia SP apuntamos a que dasatinib esté afectando a la integridad del endotelio, a las uniones celulares, a la permeabilidad y por tanto a la capacidad de adhesión y retención de los linfocitos sobre el endotelio u otras células estromales de los OLS.

Por ello, y porque dos de los principales efectos secundarios de dasatinib, como son el derrame pleural y la hemorragia intestinal, pudieran estar causados por efectos del fármaco sobre la integridad de la barrera vascular, decidimos estudiar si dasatinib tenía efectos sobre las células endoteliales.

En este estudio, observamos como dasatinib, a diferencia de los otros ITC estudiados, compromete la función de barrera del endotelio vascular, hecho que puede ayudar a explicar algunos de los efectos adversos específicos observados en este fármaco.

El derrame pleural es el EA más característico de los pacientes con leucemia Ph+ tratados con dasatinib puesto que su incidencia durante el tratamiento con imatinib, nilotinib, y ponatinib es extremadamente rara¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Se calcula que en torno a un 10-35% de los pacientes tratados con dasatinib desarrollarán derrame pleural en algún momento a lo largo del tratamiento. Estudios recientes han demostrado que un pequeño porcentaje de pacientes tratados con bosutinib también presentan derrames pleurales, pero estos pacientes ya presentaban una historia clínica previa con estos episodios durante tratamiento con Dasatinib¹⁵⁹, mientras que en los pacientes tratados con bosutinib en primera línea, la incidencia de derrame pleural es escasa¹⁶⁰. Una de las posibles explicaciones del derrame pleural es el aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos y linfáticos que están en contacto con la pleura visceral. Nuestros datos *in vitro* e *in vivo* apoyan esta hipótesis, aunque con matices. En primer lugar, la reversibilidad que observamos en nuestra experimentación *in vitro* iría en contra de la aparición del derrame *in vivo*. Sin

embargo, sabemos que los derrames pleurales observados en los pacientes son considerados efectos acumulativos del tratamiento ya que tienen lugar a medio, largo plazo, después de varias semanas de tratamiento, son dosis-dependiente y se producen sobre todo en los pacientes con daño vascular previo¹²⁰. Es posible, por tanto, que se produzca un efecto acumulativo del fármaco sobre la arquitectura del endotelio que poco a poco vaya generando un “goteo” a través de la monocapa endotelial y la acumulación de líquido en la pleura.

Por otro lado, en nuestro estudio no hemos podido demostrar un aumento en la permeabilidad de los vasos que irrigan el pulmón ya que los ratones no tratados también presentan azul de Evans en los pulmones. Las explicaciones posibles incluyen la contaminación de dichos órganos con sangre desde los grandes vasos en el momento de la necropsia o que la propia técnica no sea la idónea ya que, precisamente en los pulmones, la función de barrera del endotelio vascular es menos eficiente que en otros órganos. En el pulmón confluyen la circulación sistémica (circulación bronquial, contráctil) y la circulación pulmonar que presenta microvasculatura no contráctil, donde las proteínas de la familia de la conexina, permiten el paso de moléculas cercanas a 1kDa; el azul de Evans tiene un peso molecular cercano a 1kDa y, por lo tanto, este método no parece ser el más eficiente para evaluar la permeabilidad vascular. Para solucionar esto podríamos haber utilizado moléculas de mayor tamaño o haber intentado detectar el azul de Evans en la propia pleura visceral o incluso en la parietal, aunque ello entraña una dificultad técnica mayor.

El otro efecto adverso característico en el tratamiento con Dasatinib son los cuadros hemorrágicos en diferentes localizaciones y de diversa gravedad, siendo la diátesis hemorrágica cutánea y mucosa, una forma de presentación característica. Este tipo de eventos raramente se han descrito en pacientes tratados con otros ITC^{102,161}. mientras que se han observado en hasta el 23% de los pacientes tratados con dasatinib en segunda línea tras tratamiento previo con imatinib, localizándose gran parte de ellos en el tracto gastrointestinal¹¹³. El desarrollo de sangrados gastrointestinales probablemente esté relacionado con la administración vía oral de dasatinib, que favorece el contacto directo del fármaco con el endotelio gastrointestinal. Nuestros resultados en modelo animal reproducen los hallazgos descritos en los pacientes.

La fisiopatología de la diátesis hemorrágica asociada al tratamiento con dasatinib no está del todo caracterizada y clásicamente se ha atribuido a una trombocitopenia y/o una inhibición reversible de la agregación plaquetaria causada por el fármaco^{122,162}. Alternativamente, la exposición de la matriz subendotelial causada por los efectos de dasatinib sobre las uniones homotípicas del endotelio provocaría una inmovilización plaquetaria transitoria y, por consiguiente, un descenso del número de plaquetas circulantes. Curiosamente, el recuento absoluto de plaquetas en sangre periférica desciende de manera importante rápidamente después de la toma del fármaco, recuperándose hasta alcanzar valores basales varias horas después¹³⁰. En este contexto, la trombocitopenia inducida por dasatinib podría ser causada no solamente por un efecto a nivel central y crónico sobre la megacariocitopoyesis y la producción plaquetaria¹²³, sino por un efecto agudo y transitorio, a nivel periférico, sobre el endotelio.

Pero sin lugar a dudas, si algo ha resultado complicado en esta tesis, ha sido la caracterización molecular de los efectos de dasatinib sobre las uniones homotípicas del endotelio. En un principio, dado el papel relevante de la familia de las Src cinasas en el mantenimiento de dichas uniones y de la integridad del citoesqueleto de actina en general, y dado que dasatinib es un inhibidor dual de BCR-ABL y Src, pensamos que la inhibición de Src por dasatinib daría cuenta de la mayoría, si no de todos los efectos de este ITC sobre el endotelio. Sin embargo, pronto nos dimos cuenta de que éste no era el caso ya que otros ITC, que también inhiben Src eficazmente como bosutinib, no tenían ningún efecto sobre la integridad de la monocapa endotelial mientras que inhibían claramente la fosforilación de Src en experimentos de western blot.

Otro de los mecanismos que podían explicar los efectos de dasatinib era la modulación de las adhesiones focales, tal y como sugerían los ensayos de microscopía. Para valorarlo se emplearon inhibidores específicos de FAK en los experimentos de microscopía e impedancia (confirmar) y de nuevo comprobamos que varias moléculas inhibitoras de FAK no reproducían los efectos observados con dasatinib en ninguna de las aproximaciones experimentales realizadas (datos no mostrados). Por su parte, los experimentos de western blot para estudiar el estado de fosforilación de FAK en las distintas condiciones experimentales no fueron concluyentes a pesar de los múltiples esfuerzos realizados (datos no mostrados).

Finalmente decidimos comprobar si dasatinib tenía algún efecto sobre la contractilidad celular que pudiera explicar sus efectos ya que, como mencionábamos en la introducción, un aumento de la contracción celular puede llevar a la pérdida de las uniones intercelulares. Comprobamos efectivamente que este ITC induce una fosforilación modesta pero reproducible de la CLM, tanto en experimentos de microscopía como en western blot, que no observamos con otros ITC, y que llevaría a la activación de la NMII y por consiguiente a un aumento de la contractilidad de las células endoteliales de los vasos. El mecanismo a través del cuál dasatinib activa la CLM tampoco está completamente caracterizado aunque estaría mediado, al menos en parte, por la fosforilación de la fosfatasa MYPT1 en los residuos Thr696 y Thr853, su inhibición, y el consiguiente aumento de la fosforilación y activación de NMII. Es posible que dasatinib inhiba una cinasa que fosforile e inactive ROCK tal y como se ha descrito en las células en fase de migración, en las que SRC fosforila a ROCK en el residuo Y722, separándose de RhoA, y por lo tanto previene la fosforilación de NMII. Este mecanismo está involucrado en la dinámica de la adhesión celular en el frente de avance¹⁶³. Por lo tanto, proponemos un modelo en el que dasatinib inhibe una determinada cinasa que promueve la activación de ROCK, la consiguiente fosforilación de los residuos Thr696 y Thr853 de MYPT1, la inhibición de dicha fosfatasa y el aumento de fosforilación de NMII¹⁶⁴.

La falta de inhibición de ROCK mediada por dasatinib también favorecería la estabilización de los filamentos de actina a través de la vía LIMK y cofilina. Curiosamente, dasatinib revierte el efecto inhibitor de Y-27632. Esto podría ser debido a un efecto alostérico por el que la defosforilación de ROCK causada por dasatinib disminuiría la afinidad de Y-27632 por ROCK. Una alternativa sería que una cinasa adicional

que estuviese mediando la fosforilación de MYPT1 en los residuos Thr696 y Thr853 fuese inhibida por dasatinib, aunque esta teoría es menos probable ya que ROCK fosforila directamente estos residuos¹⁶⁴.

Sea como fuere, nuestros hallazgos han sido recientemente confirmados por sendos artículos en los que describen que describen que dasatinib aumenta la permeabilidad vascular y desestructura el citoesqueleto de actina muy probablemente a través de la activación de ROCK^{165,166}.

No obstante, estos hallazgos no descartan otros mecanismos alternativos o la participación de otras cinasas. Así, dasatinib podría inhibir de forma aditiva, sinérgica o en cascada dos o más cinasas. Otra posibilidad, no excluyente con las anteriores, es que dasatinib tenga más de un mecanismo de inhibición de una determinada cinasa, como la inhibición del dominio cinasa o de su actividad como molécula de andamiaje en una plataforma de señalización celular.

En otro orden de cosas, el conocimiento y la profundización de los efectos off target de los fármacos abre nuevas indicaciones terapéuticas. Así, tras la experimentación in vitro e in vivo realizada en esta tesis parece claro que dasatinib aumenta la permeabilidad vascular actuando sobre las células endoteliales de forma transitoria y dosis-dependiente. Por esto proponemos, aprovechando este mecanismo de acción, un nuevo uso del fármaco. En concreto, dasatinib podría favorecer que otros fármacos alcancen localizaciones anatómicas inaccesibles gracias a su efecto sobre las uniones celulares del endotelio vascular. De este modo, dasatinib sería un candidato como terapia coadyuvante para aumentar de manera transitoria la permeabilidad de la barrera endotelial y favorecer la llegada de determinados tratamientos dirigidos específicamente a ciertos órganos, como por ejemplo, tumores sólidos. Además, nuestros experimentos de “cierre de brecha” sugieren que este fármaco interfiere en el restablecimiento/reestructuración de la monocapa endotelial y esto dificultaría la neoangiogénesis característica de los tumores y por consiguiente la liberación de nutrientes y oxígeno en el tumor.

En conclusión, en esta tesis hemos intentado explicar el mecanismo por el cual dasatinib produce sus efectos adversos más frecuentes o más graves como son el derrame pleural, la diátesis hemorrágica y la linfocitosis. Esperamos que los hallazgos presentados contribuyan al conocimiento de la patogénesis de la leucemia mieloide crónica, de los mecanismos de acción de los fármacos de elección de esta patología, de las causas de sus efectos adversos y, en último término, contribuyan a un manejo terapéutico más racional en la leucemia mieloide crónica.

Conclusiones

1. Los pacientes de LMC al diagnóstico presentan una importante disminución de la expresión de CD62L en las distintas subpoblaciones linfocitarias con respecto a los sujetos sanos, que va acompañada de la disminución de otras moléculas que caracterizan a los T_N y T_{CM} como CCR7 y de la proporción de los propios T_N CD8+. En el caso de las células NK, destaca la disminución de la molécula NKp30.
2. El tratamiento crónico con dasatinib recupera, total o parcialmente, los déficits mencionados arriba, e induce cambios fenotípicos *per se*, como el aumento de la molécula de activación HLA-DR en la superficie de los LT.
3. Desde la primera administración de dasatinib, de una manera rápida tras la toma y con cada una de ellas, el porcentaje de T_N y T_{CM} en SP disminuye y aumenta la proporción de T_{EMRA} . En cuanto a las células NK destaca el aumento en cada toma de la proporción de una subpoblación con un fenotipo más maduro, con disminución de la molécula NKG2A y aumento de los KIR.
4. El tratamiento con dasatinib produce, a largo plazo, una disminución de T_N CD8+ y una acumulación de linfocitos T_{EMRA} CD8+ en sangre periférica.
5. Los linfocitos de las muestras extraídas tras dos horas de la toma de dasatinib presentan una menor migración hacia las quimiocinas CCL19 y CCL21, que no es debida a un efecto directo del fármaco ni sobre la expresión de CCR7 ni sobre la capacidad migratoria in vitro de los linfocitos en respuesta a los ligandos de CCR7.
6. La linfocitosis inmediata que produce dasatinib con cada toma se asocia a los cambios descritos en las conclusiones 3 y 5, y por tanto no se observan en los pacientes que no presentan linfocitosis (no movilizadores).
7. El valor absoluto de LT CD8+ en el momento de iniciar el tratamiento con dasatinib es un factor pronóstico de respuesta molecular temprana.
8. Dasatinib, a concentraciones terapéuticas, produce una alteración transitoria e irreversible de la integridad de la monocapa endotelial, consistente en la pérdida de los contactos homotípicos y una desorganización del citoesqueleto de actina.
9. El mecanismo molecular responsable de las alteraciones descritas en la conclusión anterior incluye la fosforilación de la cadena ligera de la miosina que provocará verosimilmente un aumento de la contractilidad de la NMII.

10. Dasatinib aumenta la permeabilidad vascular *in vivo*.

Bibliografía

1. Abbas A, Lichtman A, Pillai S, Baker D. No Title. In: *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier; 2015.
2. Janeway CA, Medzhitov R. Innate Immune Recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
3. Lanier LL. NK CELL RECOGNITION. *Annu Rev Immunol*. 2004. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526
4. Man S, Salter RD, Engelhard VH. Role of endogenous peptide in human alloreactive cytotoxic T cell responses. *Int Immunol*. 1992. doi:10.1093/intimm/4.3.367
5. D. MY, M. BT, Federica S, Mario R, Enrico L. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol*. 2013. doi:10.1002/eji.201343751
6. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. 2009. doi:10.1002/eji.200939722
7. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702
8. Fritsch R, Shen X, Sims G, et al. Stepwise Differentiation of CD4 Memory T Cells Defined by Expression of CCR7 and CD27. *J Immunol*. 2005. doi:10.4049/jimmunol.175.10.6489
9. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *J Immunol*. 2014. doi:10.1126/science.1058867
10. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol*. 1993.
11. Brodie T, Brenna E, Sallusto F. Corrigendum for OMIP-018: Chemokine receptor expression on human T helper cells. *Cytom Part A*. 2013. doi:10.1002/cyto.a.22346
12. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med*. 2000.
13. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, et al. Regulatory T cells: Recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. 2013. doi:10.1038/ni.2554
14. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science (80-)*. 1994. doi:10.1126/science.7518614
15. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010. doi:10.1038/nri2744
16. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001. doi:10.1016/S1471-4906(01)02060-9
17. Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*. 2001. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.291
18. Bajénoff M, Egen JG, Qi H, Huang AYC, Castellino F, Germain RN. Highways, byways and breadcrumbs: directing lymphocyte traffic in the lymph node. *Trends Immunol*. 2007. doi:10.1016/j.it.2007.06.005
19. Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med*. 2002;196(8):1079-1090. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391019>. Accessed February 4, 2019.
20. MARCHESI VT, GOWANS JL. THE MIGRATION OF LYMPHOCYTES THROUGH THE ENDOTHELIUM OF VENULES IN LYMPH NODES: AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY. *Proc R Soc London Ser B, Biol Sci*. 1964.
21. Pachynski RK, Wu SW, Gunn MD, et al. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) stimulates integrin alpha 4 beta 7-mediated adhesion of lymphocytes to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) under flow. *J Immunol*. 1998. doi:10.4049/jimmunol.168.10.5268
22. VESTWEBER D, BLANKS JE. Mechanisms That Regulate the Function of the Selectins and Their Ligands. *Physiol Rev*. 2017. doi:10.1152/physrev.1999.79.1.181
23. Hogg N. T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci*. 2003. doi:10.1242/jcs.00876

24. Siflinger-Birnboim A, del Vecchio PJ, Cooper JA, Blumenstock FA, Shepard JM, Malik AB. Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer. *J Cell Physiol.* 1987. doi:10.1002/jcp.1041320115
25. Heng Y-W, Koh C-G. Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(10):1622-1633. doi:10.1016/j.biocel.2010.04.007
26. Komarova YA, Kruse K, Mehta D, Malik AB. Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circ Res.* 2017. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306534
27. Balda MS, Matter K. Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Curr Opin Cell Biol.* 2016. doi:10.1016/j.ceb.2016.05.006
28. de Pereda JM, Lillo MP, Sonnenberg A. Structural basis of the interaction between integrin $\alpha 6 \beta 4$ and plectin at the hemidesmosomes. *EMBO J.* 2009;28(8):1180-1190. doi:10.1038/emboj.2009.48
29. Seltmann K, Fritsch AW, Kas JA, Magin TM. Keratins significantly contribute to cell stiffness and impact invasive behavior. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(46):18507-18512. doi:10.1073/pnas.1310493110
30. Dudek SM, Jacobson JR, Chiang ET, et al. Pulmonary Endothelial Cell Barrier Enhancement by Sphingosine 1-Phosphate. *J Biol Chem.* 2004;279(23):24692-24700. doi:10.1074/jbc.M313969200
31. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. FOCAL ADHESIONS, CONTRACTILITY, AND SIGNALING. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.463
32. Romer LH, Birukov KG, Garcia JGN. Focal adhesions: Paradigm for a signaling nexus. *Circ Res.* 2006. doi:10.1161/01.RES.0000207408.31270.db
33. Ciobanasiu C, Faivre B, Le Clainche C. Reconstituting actomyosin-dependent mechanosensitive protein complexes in vitro. *Nat Protoc.* 2015;10(1):75-89. doi:10.1038/nprot.2014.200
34. Dumbauld DW, Lee TT, Singh A, et al. How vinculin regulates force transmission. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(24):9788-9793. doi:10.1073/pnas.1216209110
35. Schaller MD. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci.* 2010. doi:10.1242/jcs.045112
36. Huveneers S, Danen EHJ. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci.* 2009. doi:10.1242/jcs.039446
37. Allingham JS, Klenchin VA, Rayment I. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(18):2119-2134. doi:10.1007/s00018-006-6157-9
38. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol.* 2006;8(11):1223-1234. doi:10.1038/ncb1486
39. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiol Rev.* 2004;84(3):869-901. doi:10.1152/physrev.00035.2003
40. Pavón N, Gallardo JC, Hernández-Esquivel LM, et al. On the properties of calcium-induced permeability transition in neonatal heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 2011;43(6):757-764. doi:10.1007/s10863-011-9401-4
41. Allingham MJ, van Buul JD, Burridge K. ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J Immunol.* 2007;179(6):4053-4064. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785844>. Accessed February 4, 2019.
42. Turowski P, Martinelli R, Crawford R, et al. Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *J Cell Sci.* 2008;121(1):29-37. doi:10.1242/jcs.022681
43. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.* 2008;121(13):2115-2122. doi:10.1242/jcs.017897
44. Amano M, Ito M, Kimura K, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 1996. doi:10.1074/jbc.271.34.20246
45. Kimura K, Ito M, Amano M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science (80-).* 1996. doi:10.1126/science.273.5272.245
46. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009. doi:10.1038/nrm2786
47. Lee T-YJ, Gotlieb AI. Microfilaments and microtubules maintain endothelial integrity. *Microsc Res Tech.* 2003;60(1):115-127. doi:10.1002/jemt.10250
48. Mehta D, Malik AB. Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiol Rev.*

- 2006;86(1):279-367. doi:10.1152/physrev.00012.2005
49. Jacobson JR, Garcia JGN. Novel therapies for microvascular permeability in sepsis. *Curr Drug Targets*. 2007;8(4):509-514. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430121>. Accessed February 4, 2019.
 50. Lessey-Morillon EC, Osborne LD, Monaghan-Benson E, et al. The RhoA GEF, LARG, mediates ICAM-1-dependent mechanotransduction in endothelial cells to stimulate transendothelial migration. *J Immunol*. 2014. doi:10.3851/IMP2701.Changes
 51. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*. 2002;39(4-5):187-199. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12747959>. Accessed February 4, 2019.
 52. Braga VMM. Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol*. 2002;14(5):546-556. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231348>. Accessed February 4, 2019.
 53. Gavard J, Gutkind JS. Protein Kinase C-related Kinase and ROCK Are Required for Thrombin-induced Endothelial Cell Permeability Downstream from Gα_{12/13} and Gα_{11/q}. *J Biol Chem*. 2008;283(44):29888-29896. doi:10.1074/jbc.M803880200
 54. Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik AB. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and β-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2003;285(2):L434-L442. doi:10.1152/ajplung.00075.2003
 55. Dudek SM, Garcia JGN. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*. 2001;91(4):1487-1500. doi:10.1152/jappl.2001.91.4.1487
 56. Patterson CE, Lum H. Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. *Endothelium*. 2001;8(2):75-105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572478>. Accessed February 5, 2019.
 57. Rizwan Siddiqui M, Komarova YA, Vogel SM, et al. Caveolin-1-eNOS signaling promotes p190RhoGAP-A nitration and endothelial permeability. *J Cell Biol*. 2011. doi:10.1083/jcb.201012129
 58. Holinstat M, Knezevic N, Broman M, Samarel AM, Malik AB, Mehta D. Suppression of RhoA activity by focal adhesion kinase-induced activation of p190RhoGAP: Role in regulation of endothelial permeability. *J Biol Chem*. 2006. doi:10.1074/jbc.M511248200
 59. Murakami M, Nguyen LT, Zhang ZW, et al. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest*. 2008. doi:10.1172/JCI35298
 60. Arnold KM, Goekeler ZM, Wysolmerski RB. Loss of Focal Adhesion Kinase Enhances Endothelial Barrier Function and Increases Focal Adhesions. *Microcirculation*. 2013;20(7):637-649. doi:10.1111/micc.12063
 61. Li Y, Uruno T, Haudenschild C, Dudek SM, Garcia JG., Zhan X. Interaction of cortactin and Arp2/3 complex is required for sphingosine-1-phosphate-induced endothelial cell remodeling. *Exp Cell Res*. 2004;298(1):107-121. doi:10.1016/j.yexcr.2004.03.023
 62. SHIKATA Y, BIRUKOV KG, BIRUKOVA AA, VERIN A, GARCIA JGN. Involvement of site-specific FAK phosphorylation in sphingosine-1 phosphate- and thrombin-induced focal adhesion remodeling: role of Src and GIT. *FASEB J*. 2003;17(15):2240-2249. doi:10.1096/fj.03-0198com
 63. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Vol 4th.; 2008. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 64. Gavard J, Patel V, Gutkind JS. Angiopoietin-1 Prevents VEGF-Induced Endothelial Permeability by Sequestering Src through mDia. *Dev Cell*. 2008;14(1):25-36. doi:10.1016/j.devcel.2007.10.019
 65. Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967;58(4):1468-1471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5237880>. Accessed February 5, 2019.
 66. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-293. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4126434>. Accessed February 5, 2019.
 67. Nowell PC, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science (80-)*. 1960.
 68. BAIKIE AG, COURT-BROWN WM, BUCKTON KE, HARNDEN DG, JACOBS PA, TOUGH IM. A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1960;188:1165-1166. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13685929>. Accessed February 5,

- 2019.
69. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1982;300(5894):765-767. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6960256>. Accessed February 5, 2019.
 70. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 306(5940):277-280. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6580527>. Accessed February 5, 2019.
 71. Stam K, Heisterkamp N, Grosveld G, et al. Evidence of a new chimeric bcr/c-abl mRNA in patients with chronic myelocytic leukemia and the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 1985;313(23):1429-1433. doi:10.1056/NEJM198512053132301
 72. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell*. 1986;47(2):277-284. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3021337>. Accessed February 5, 2019.
 73. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*. 1986;233(4760):212-214. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3460176>. Accessed February 5, 2019.
 74. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990;247(4946):1079-1082. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2408149>. Accessed February 5, 2019.
 75. Hasselbach W, Ungeheuer M, Migala A, Ritter K. Selective abolition of sarcoplasmic reticulum vesicles' calcium releasing mechanisms. *Z Naturforsch C*. 41(5-6):652-656. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2944301>. Accessed February 5, 2019.
 76. Goldman JM, Melo J V. Chronic Myeloid Leukemia — Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *N Engl J Med*. 2003;349(15):1451-1464. doi:10.1056/NEJMra020777
 77. Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: Stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017. doi:10.1182/blood-2016-09-696013
 78. Giallongo C, Parrinello N, Tibullo D, et al. Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) are increased and exert immunosuppressive activity together with polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in chronic myeloid leukemia patients. Volti GL, ed. *PLoS One*. 2014;9(7):e101848. doi:10.1371/journal.pone.0101848
 79. Mellqvist UH, Hansson M, Brune M, Dahlgren C, Hermodsson S, Hellstrand K. Natural killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: role of reactive oxygen species and regulation by histamine. *Blood*. 2000;96(5):1961-1968. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961901>. Accessed February 5, 2019.
 80. Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, et al. Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood*. 2001;98(13):3750-3756. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739182>. Accessed February 5, 2019.
 81. Dong R, Cwynarski K, Entwistle A, et al. Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood*. 2003;101(9):3560-3567. doi:10.1182/blood-2002-06-1841
 82. Boissel N, Rousselot P, Raffoux E, et al. Defective blood dendritic cells in chronic myeloid leukemia correlate with high plasmatic VEGF and are not normalized by imatinib mesylate. *Leukemia*. 2004;18(10):1656-1661. doi:10.1038/sj.leu.2403474
 83. Mouldrem JJ, Lee PP, Wang C, et al. Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2000;6(9):1018-1023. doi:10.1038/79526
 84. Mumprecht S, Schürch C, Schwaller J, Solenthaler M, Ochsenschein AF. Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood*. 2009;114(8):1528-1536. doi:10.1182/blood-2008-09-179697
 85. Deininger MWN, Goldman JM, Melo J V, Dc W. The molecular biology of chronic myeloid leukemia The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000. doi:10.1016/j.jcrc.2009.12.006
 86. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-884. doi:10.1182/blood-

- 2013-05-501569
87. Baccarani M, Dreyling M, ESMO Guidelines Working Group. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2010;21 Suppl 5(Supplement 5):v165-7. doi:10.1093/annonc/mdq201
 88. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984;63(4):789-799. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6584184>. Accessed February 5, 2019.
 89. Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(11):850-858. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9625174>. Accessed February 5, 2019.
 90. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*. 2011;118(3):686-692. doi:10.1182/blood-2010-12-319038
 91. Baccarani M, Russo D, Rosti G, Martinelli G. Interferon-alfa for chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2003. doi:10.1016/S0037-1963(03)70040-7
 92. *Harrison's TM Principles of Internal Medicine, Nineteenth Edition.*; 2015.
 93. Druker BJ, Lydon NB. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest*. 2000;105(1):3-7. doi:10.1172/JCI9083
 94. Wong S, Witte ON. The BCR-ABL Story: Bench to Bedside and Back. *Annu Rev Immunol*. 2004;22(1):247-306. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104753
 95. Giehl M, Fabarius A, Frank O, et al. Expression of the p210BCR-ABL oncoprotein drives centrosomal hypertrophy and clonal evolution in human U937 cells. *Leukemia*. 2007;21(9):1971-1976. doi:10.1038/sj.leu.2404834
 96. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293(5531):876-880. doi:10.1126/science.1062538
 97. Apperley JF. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007;8(11):1018-1029. doi:10.1016/S1470-2045(07)70342-X
 98. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science (80-)*. 2004. doi:10.1126/science.1099480
 99. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*. 2008. doi:10.1038/nbt1358
 100. Branford S, Melo J V., Hughes TP. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? *Blood*. 2009;114(27):5426-5435. doi:10.1182/blood-2009-08-215939
 101. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J. Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(10):834-848. doi:10.1038/nrd2324
 102. Kantarjian HM, Hochhaus A, Saglio G, et al. Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(9):841-851. doi:10.1016/S1470-2045(11)70201-7
 103. Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, et al. Dasatinib (BMS-354825), a Dual SRC/ABL Kinase Inhibitor, Inhibits the Kinase Activity of Wild-Type, Juxtamembrane, and Activation Loop Mutant KIT Isoforms Associated with Human Malignancies. *Cancer Res*. 2006;66(1):473-481. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2050
 104. Lindauer M, Hochhaus A. Dasatinib. In: *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer*. Vol 212. ; 2018:29-68. doi:10.1007/978-3-319-91439-8_2
 105. Montero JC, Seoane S, Ocaña A, Pandiella A. Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2011;17(17):5546-5552. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2616
 106. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2260-2270. doi:10.1056/NEJMoa1002315

107. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34(20):2333-2340. doi:10.1200/JCO.2015.64.8899
108. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*. 2005;7(2):129-141. doi:10.1016/j.ccr.2005.01.007
109. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2012;367(22):2075-2088. doi:10.1056/NEJMoa1205127
110. Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2016;30(8):1648-1671. doi:10.1038/leu.2016.104
111. Sneed TB, Kantarjian HM, Talpaz M, et al. The significance of myelosuppression during therapy with imatinib mesylate in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer*. 2004;100(1):116-121. doi:10.1002/cncr.11863
112. Deininger MW, Manley P. What do kinase inhibition profiles tell us about tyrosine kinase inhibitors used for the treatment of CML? *Leuk Res*. 2012;36(3):253-261. doi:10.1016/j.leukres.2011.09.018
113. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Ravandi F, et al. Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy. *Cancer*. 2009;115(11):2482-2490. doi:10.1002/cncr.24257
114. Gratacap M-P, Martin V, Valéra M-C, et al. The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo. *Blood*. 2009;114(9):1884-1892. doi:10.1182/blood-2009-02-205328
115. Valent P, Hadzijušufovic E, Schernthaner G-H, Wolf D, Rea D, le Coutre P. Vascular safety issues in CML patients treated with BCR/ABL1 kinase inhibitors. *Blood*. 2015;125(6):901-906. doi:10.1182/blood-2014-09-594432
116. Steegmann JL, Cervantes F, le Coutre P, Porkka K, Saglio G. Off-target effects of BCR-ABL1 inhibitors and their potential long-term implications in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(12):2351-2361. doi:10.3109/10428194.2012.695779
117. Hughes TP, Laneuville P, Rousselot P, et al. Incidence, outcomes, and risk factors of pleural effusion in patients receiving dasatinib therapy for Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Haematologica*. 2019;104(1):93-101. doi:10.3324/haematol.2018.188987
118. Breccia M, Alimena G. Occurrence and current management of side effects in chronic myeloid leukemia patients treated frontline with tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Res*. 2013;37(6):713-720. doi:10.1016/j.leukres.2013.01.021
119. De Lavallade H, Punnialingam S, Milojkovic D, et al. Pleural effusions in patients with chronic myeloid leukaemia treated with dasatinib may have an immune-mediated pathogenesis. *Br J Haematol*. 2008. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07108.x
120. Steegmann JL, Cervantes F, le Coutre P, Porkka K, Saglio G. Off-target effects of BCR-ABL1 inhibitors and their potential long-term implications in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(12):2351-2361. doi:10.3109/10428194.2012.695779
121. Mezei G, Debreceni IB, Kerényi A, et al. Dasatinib inhibits coated-platelet generation in patients with chronic myeloid leukemia. *Platelets*. August 2018:1-8. doi:10.1080/09537104.2018.1501470
122. Quintas-Cardama A, Han X, Kantarjian H, Cortes J. Tyrosine kinase inhibitor-induced platelet dysfunction in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;114(2):261-263. doi:10.1182/blood-2008-09-180604
123. Mazharian A, Ghevaert C, Zhang L, Massberg S, Watson SP. Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. *Blood*. 2011;117(19):5198-5206. doi:10.1182/blood-2010-12-326850
124. Mazharian A, Thomas SG, Dhanjal TS, Buckley CD, Watson SP. Critical role of Src-Syk-PLC γ 2 signaling in megakaryocyte migration and thrombopoiesis. *Blood*. 2010;116(5):793-800. doi:10.1182/blood-2010-03-275990
125. Steegmann JL, Moreno G, Aláez C, et al. Chronic myeloid leukemia patients resistant to or intolerant of interferon alpha and subsequently treated with imatinib show reduced immunoglobulin levels and hypogammaglobulinemia. *Haematologica*. 2003;88(7):762-768. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857554>. Accessed February 5, 2019.
126. Kim DH, Kamel-Reid S, Chang H, et al. Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular

- lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. *Haematologica*. 2009;94(1):135-139. doi:10.3324/haematol.13151
127. Mustjoki S, Eklom M, Arstila TP, et al. Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia*. 2009;23(8):1398-1405. doi:10.1038/leu.2009.46
 128. Kreutzman A, Juvonen V, Kairisto V, et al. Mono/oligoclonal T and NK cells are common in chronic myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy. *Blood*. 2010;116(5):772-782. doi:10.1182/blood-2009-12-256800
 129. Schiffer CA, Cortes JE, Hochhaus A, et al. Lymphocytosis after treatment with dasatinib in chronic myeloid leukemia: Effects on response and toxicity. *Cancer*. 2016;122(9):1398-1407. doi:10.1002/cncr.29933
 130. Mustjoki S, Auvinen K, Kreutzman A, et al. Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia*. 2013;27(4):914-924. doi:10.1038/leu.2012.348
 131. Kreutzman A, Ilander M, Porkka K, Vakkila J, Mustjoki S. Dasatinib promotes Th1-type responses in granzyme B expressing T-cells. *Oncoimmunology*. 2014;3(5):e28925. doi:10.4161/onci.28925
 132. Molldrem JJ, Lee PP, Kant S, et al. Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells. *J Clin Invest*. 2003;111(5):639-647. doi:10.1172/JCI16398
 133. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 1999;94(4):1201-1208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438707>. Accessed February 5, 2019.
 134. Seggewiss R, Price DA, Purbhoo MA. Immunomodulatory effects of imatinib and second-generation tyrosine kinase inhibitors on T cells and dendritic cells: an update. *Cytotherapy*. 2008;10(6):633-641. doi:10.1080/14653240802317639
 135. Sun M, Fu H, Cheng H, et al. A dynamic real-time method for monitoring epithelial barrier function in vitro. *Anal Biochem*. 2012. doi:10.1016/j.ab.2012.03.010
 136. van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 2009. doi:10.1016/j.ctrv.2009.08.004
 137. Cortes JE, Kantarjian HM, Brümmendorf TH, et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood*. 2011. doi:10.1182/blood-2011-05-355594
 138. Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Myosin light chain mono- and di-phosphorylation differentially regulate adhesion and polarity in migrating cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010. doi:10.1016/j.bbrc.2010.10.071
 139. Kolega J. Asymmetric Distribution of Myosin IIB in Migrating Endothelial Cells Is Regulated by a rho-dependent Kinase and Contributes to Tail Retraction. *Mol Biol Cell*. 2003. doi:10.1091/mbc.e03-04-0205
 140. Radu M, Chernoff J. An *in vivo* Assay to Test Blood Vessel Permeability. *J Vis Exp*. 2013. doi:10.3791/50062
 141. Hekim C, Ilander M, Yan J, et al. Dasatinib Changes Immune Cell Profiles Concomitant with Reduced Tumor Growth in Several Murine Solid Tumor Models. *Cancer Immunol Res*. 2017. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0061-T
 142. Rohon P, Porkka K, Mustjoki S. Immunoprofiling of patients with chronic myeloid leukemia at diagnosis and during tyrosine kinase inhibitor therapy. *Eur J Haematol*. 2010. doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01501.x
 143. Fujimiya Y, Bakke A, Chang WC, et al. Natural killer-cell immunodeficiency in patients with chronic myelogenous leukemia. I. Analysis of the defect using the monoclonal antibodies HNK-1 (LEU-7) and B73.1. *Int J Cancer*. 1986. doi:10.1002/ijc.2910370502
 144. Pierson BA, Miller JS. CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood*. 1996;88(6):2279-2287. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822949>. Accessed February 5, 2019.
 145. Chen CIU, Koschmieder S, Kerstiens L, et al. NK cells are dysfunctional in human chronic myelogenous leukemia before and on imatinib treatment and in BCR-ABL-positive mice.

- Leukemia*. 2012. doi:10.1038/leu.2011.239
146. Sopper S, Mustjoki S, White D, et al. Reduced CD62L Expression on T Cells and Increased Soluble CD62L Levels Predict Molecular Response to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Early Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(2):175-184. doi:10.1200/JCO.2016.67.0893
147. Tahara-Hanaoka S, Sumida T, Kameyama T, et al. CD226 (DNAM-1) Is Involved in Lymphocyte Function-associated Antigen 1 Costimulatory Signal for Naive T Cell Differentiation and Proliferation. *J Exp Med*. 2003. doi:10.1084/jem.20030958
148. Zaini RG, Al-Rehaili AA. The Therapeutic Strategies of Regulatory T Cells in Malignancies and Stem Cell Transplantations. *J Oncol*. 2019. doi:10.1155/2019/5981054
149. Chang MC, Cheng HI, Hsu K, et al. NKG2A Down-Regulation by Dasatinib Enhances Natural Killer Cytotoxicity and Accelerates Effective Treatment Responses in Patients With Chronic Myeloid Leukemia. *Front Immunol*. 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.03152
150. Hughes A, Clarkson J, Tang C, et al. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood*. 2017;129(9):1166-1176. doi:10.1182/blood-2016-10-745992
151. Ilander MM, Olsson-Strömberg U, Lähtenmäki H, et al. Early Disease Relapse after Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment Discontinuation in CML Is Related Both to Low Number and Impaired Function of NK-Cells. *Blood*. 2014.
152. Hughes A, Yong ASM. Immune effector recovery in chronic myeloid leukemia and treatment-free remission. *Front Immunol*. 2017. doi:10.3389/fimmu.2017.00469
153. Ilander M, Olsson-Strömberg U, Schlums H, et al. Increased proportion of mature NK cells is associated with successful imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(5):1108-1116. doi:10.1038/leu.2016.360
154. McWilliams EM, Mele JM, Cheney C, et al. Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology*. 2016. doi:10.1080/2162402X.2016.1226720
155. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2260-2270. doi:10.1056/NEJMoa1002315
156. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, O'Brien S, et al. Pleural effusion in patients with chronic myelogenous leukemia treated with dasatinib after imatinib failure. *J Clin Oncol*. 2007;25(25):3908-3914. doi:10.1200/JCO.2007.12.0329
157. Hochhaus A, Rosti G, Cross NCP, et al. Frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the European ENEST1st study. *Leukemia*. 2016;30(1):57-64. doi:10.1038/leu.2015.270
158. Cortes JE, Kim D-W, Pinilla-Ibarz J, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2013;369(19):1783-1796. doi:10.1056/NEJMoa1306494
159. Kantarjian HM, Cortes JE, Kim D-W, et al. Bosutinib safety and management of toxicity in leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors. *Blood*. 2014;123(9):1309-1318. doi:10.1182/blood-2013-07-513937
160. Brümmendorf TH, Cortes JE, de Souza CA, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukaemia: results from the 24-month follow-up of the BELA trial. *Br J Haematol*. 2015;168(1):69-81. doi:10.1111/bjh.13108
161. Jain P, Kantarjian H, Jabbour E, et al. Ponatinib as first-line treatment for patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase: a phase 2 study. *Lancet Haematol*. 2015;2(9):e376-83. doi:10.1016/S2352-3026(15)00127-1
162. Strati P, Kantarjian H, Thomas D, et al. HCVAD plus imatinib or dasatinib in lymphoid blastic phase chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2014;120(3):373-380. doi:10.1002/cncr.28433
163. Lee H-H, Tien S-C, Jou T-S, Chang Y-C, Jhong J-G, Chang Z-F. Src-dependent phosphorylation of ROCK participates in regulation of focal adhesion dynamics. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 19):3368-3377. doi:10.1242/jcs.071555
164. Khromov A, Choudhury N, Stevenson AS, Somlyo A V, Eto M. Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca²⁺ sensitization force of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*. 2009;284(32):21569-21579. doi:10.1074/jbc.M109.019729

165. Dasgupta SK, Le A, Vijayan KV, Thiagarajan P. Dasatinib inhibits actin fiber reorganization and promotes endothelial cell permeability through RhoA-ROCK pathway. *Cancer Med.* 2017. doi:10.1002/cam4.1019
166. Fazakas C, Nagaraj C, Zabini D, et al. Rho-kinase inhibition ameliorates dasatinib-induced endothelial dysfunction and pulmonary hypertension. *Front Physiol.* 2018. doi:10.3389/fphys.2018.00537

Anexos

Publicaciones científicas del doctorando durante su tesis doctoral

Artículos elaborados y relacionados con su tesis doctoral

Dasatinib Reversibly Disrupts Endothelial Vascular Integrity by Increasing Non-Muscle Myosin II Contractility in a ROCK-Dependent Manner. Kreutzman A, **Colom-Fernández B**, Jiménez AM, Ilander M, Cuesta-Mateos C, Pérez-García Y, Arévalo CD, Brück O, Hakanen H, Saarela J, Ortega-Carrión A, de Rosendo A, Juanes-García A, Steegmann JL, Mustjoki S, Vicente-Manzanares M, Muñoz-Calleja C. Clin Cancer Res. 2017 Nov 1;23(21):6697-6707. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0667. Epub 2017 Aug 18.

Anexo I.

Otros artículos en los que ha participado el doctorando

Simultaneous Determination of Imatinib, Dasatinib, and Nilotinib by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Its Application to Therapeutic Drug Monitoring. Wojnicz A, Colom-Fernández B, Steegmann JL, Muñoz-Calleja C, Abad-Santos F, Ruiz-Nuño A. Ther Drug Monit. 2017 Jun;39(3):252-262. doi: 10.1097/FTD.0000000000000406.PMID:28490048

A high migratory capacity of donor T-cells in response to the lymph node homing receptor CCR7 increases the incidence and severity of GvHD. Portero-Sainz I, Gómez-García de Soria V, Cuesta-Mateos C, Fernández-Arandojo C, Vega-Piris L, Royg M, **Colom-Fernández B**, Marcos-Jiménez A, Somovilla-Crespo B, Ramírez-Mengíbar A, López-Huete V, de Rosendo-Serrano A, Kreutzman A, Muñoz-Calleja C. Bone Marrow Transplant. 2017 May;52(5):745-752. doi: 10.1038/bmt.2016.342. Epub 2017 Jan 23. PMID:28112745

Preclinical activity of anti-CCR7 immunotherapy in patients with high-risk chronic lymphocytic leukemia. Cuesta-Mateos C, Loscertales J, Kreutzman A, **Colom-Fernández B**, Portero-Sáinz I, Pérez-Villar JJ, Terrón F, Muñoz-Calleja C. Cancer Immunol Immunother. 2015 Jun;64(6):665-76. doi: 10.1007/s00262-015-1670-z. Epub 2015 Feb 28. PMID:25724841

Autoantibodies against TIF-1- γ and CADM-140 in Spanish patients with clinically amyopathic dermatomyositis (CADM): clinical significance and diagnostic utility. Cuesta-Mateos C, **Colom-Fernández B**, Portero-Sainz I, Tejedor R, García-García C, Concha-Garzón MJ, De las Heras-Alonso ME, Martínez MA, Juárez C, Muñoz-Calleja C. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2015 Mar;29(3):482-9. doi: 10.1111/jdv.12591. Epub 2014 Jul 28. PMID:25065441

Anexo I

Dasatinib Reversibly Disrupts Endothelial Vascular Integrity by Increasing Non-Muscle Myosin II Contractility in a ROCK-Dependent Manner



Anna Kreutzman^{1,2}, Beatriz Colom-Fernández¹, Ana Marcos Jiménez¹, Mette Ilander², Carlos Cuesta-Mateos¹, Yaiza Pérez-García¹, Cristina Delgado Arévalo^{1,3}, Oscar Brück², Henna Hakonen², Jani Saarela⁴, Alvaro Ortega-Carrión^{1,3}, Ana de Rosendo¹, Alba Juanes-García^{1,3}, Juan Luis Steegmann⁵, Satu Mustjoki², Miguel Vicente-Manzanares⁶, and Cecilia Muñoz-Calleja¹

Abstract

Purpose: Dasatinib is a short-acting dual ABL/SRC family tyrosine kinase inhibitor (TKI), which is frequently used to treat chronic myeloid leukemia. Although very effective, patients taking dasatinib often display severe adverse effects, including pleural effusions and increased risk of bleeding primarily in the gastrointestinal tract. The actual causes of these side effects are currently undetermined. We hypothesize that endothelial cells (ECs) that line the inner walls of blood vessels and control the traffic to the underlying tissues might be involved.

Experimental Design: The effects of TKIs on ECs were studied by various assays, such as real-time cell impedance measurements, live-cell microscopy, wound healing, Western blot, and an *in vivo* model.

Results: Dasatinib uniquely causes a profound, dose-dependent disorganization of the EC monolayers. Dasatinib promoted

the disassembly of cell–cell contacts, altered cell–matrix contacts, and further altered the wound healing. A key observation is that this effect is fully reversible after drug washout. In line with these *in vitro* observations, intraperitoneal administration of dasatinib to mice caused significant vascular leakage in the intestine. The underlying molecular mechanism of dasatinib-induced reorganization of the actin involves ROCK activation, which increases the amount of the phosphorylation of myosin light chain and consequently activates the non-muscle myosin II.

Conclusions: Our data are consistent with a scenario in which dasatinib triggers a transient increase in vascular leakage that probably contributes to adverse effects such as bleeding diathesis and pleural effusions. *Clin Cancer Res*; 23(21): 6697–707. ©2017 AACR.

Introduction

Dasatinib is a short-acting tyrosine kinase inhibitor (TKI) approved for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML)

¹Department of Immunology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP), Spain. ²Hematology Research Unit Helsinki, Department of Clinical Chemistry and Hematology, University of Helsinki and Helsinki University Central Hospital Comprehensive Cancer Center, Helsinki, Finland. ³Universidad Autónoma de Madrid, School of Medicine, Spain. ⁴Institute for Molecular Medicine Finland (FIMM), University of Helsinki, Helsinki, Finland. ⁵Department of Hematology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP), Madrid, Spain. ⁶BMCC-CIC (CSIC-USAL), Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Authors: Anna Kreutzman, Hematology Research Unit Helsinki, University of Helsinki and Helsinki University Central Hospital Comprehensive Cancer Center, P.O. Box 700, 00029 HUCH, Finland. Phone: +358-9-471-71955; Fax: +358-9-471-71897; E-mail: anna.kreutzman@helsinki.fi; and Cecilia Muñoz-Calleja, Department of Immunology, Hospital Universitario de La Princesa, C/Diego de León 62, Madrid 28006, Spain. Phone: 34-915-202-386; Fax: 34-915-202-374; E-mail: cmunozc@salud.madrid.org

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0667

©2017 American Association for Cancer Research.

and Ph+ acute lymphoblastic leukemia. Dasatinib is a more potent inhibitor of the oncoprotein BCR-ABL1 than other approved, first-line TKIs, such as imatinib (1). In addition to BCR-ABL1, dasatinib inhibits a broad range of kinases, including members of the SRC, TEC, and SYK families (2). Moreover, dasatinib has a unique half-life of only 3 to 4 hours, and the peak plasma concentration (around 100 nmol/L) is achieved already 1 to 2 hours after oral intake of the drug (3, 4). Although dasatinib is very effective in the treatment of Ph+ leukemias, patients display frequent adverse effects such as diarrhea, pleural effusion, lymphocytosis, thrombocytopenia, and increased risk of bleeding, which primarily involves the gastrointestinal tract (5–7). Most of these events subside if the treatment with dasatinib is withdrawn. Importantly, the mechanisms underlying these side effects have not been elucidated, but are commonly attributed to the effect of dasatinib on off-target kinases expressed in cells other than leukemic blasts.

Endothelial cells (ECs) line the inner walls of the blood vessels, acting as an active barrier that controls blood vessel permeability. They also mediate the controlled exchange of substances between the blood and the underlying tissues, for example, nutrients in the gut, and oxygen and carbon dioxide in the lungs. In addition, ECs mediate leukocyte diapedesis, enabling the ingress of leukocytes into tissues. This process guarantees the physiological homing of

Translational Relevance

We describe here the cellular basis and molecular mechanism underlying dasatinib-induced pleural effusions and bleeding diathesis, which are some of the most common adverse effects of this short-acting dual ABL/SRC tyrosine kinase inhibitor (TKI). Our data demonstrate that clinically relevant concentrations of dasatinib, but not other TKIs, disrupt the endothelial monolayer and increase its permeability both *in vitro* and *in vivo*. Importantly, these effects are dose-dependent and rapidly reversible after drug washout. The ability to increase endothelial permeability transiently opens new possibilities to use dasatinib in other malignancies, a clear example being adjuvant therapy to favor delivery of targeted treatments to solid tumors. Finally, targeted kinase inhibition has dramatically changed the treatment of hematological malignancies. Given that TKI therapy is potentially lifelong, a detailed characterization of the pathogenesis of the most frequent and serious adverse events is critical to the clinical management and to optimize patient outcomes.

leukocytes and the onset of the inflammatory reaction. During inflammation, the adhesiveness of active leukocytes as well as the permeability of the endothelial monolayer increases. However, pathological sustenance of the inflammatory process as well as other factors can further maintain endothelial permeability increased, leading to edema, hemorrhage, and deleterious leukocyte infiltration (8).

The impermeability of the endothelial barrier is maintained by the strength of cell–cell junctions. Close to the lumen of the blood vessel, ECs display tight junctions mediated by occludins and claudins. At the center of the contact, cadherin-dependent adherent junctions seal the contact. ECs express VE-cadherin (CD144), which constitutes a canonical marker of EC junctions. A major regulator of junctional integrity is the actin cytoskeleton, best illustrated by the increased permeability induced by treatment of EC monolayers with actin polymerization inhibitors (9). VE-cadherin connects with actin through alpha-catenin and the actin-binding protein vinculin (10). These proteins are part of mechanosensitive relays that transmit myosin II–generated forces to the junctions. For example, thrombin-mediated activation of RhoA and its target Rho-associated protein kinase (ROCK) facilitates myosin light chain (MLC) phosphorylation activating non-muscle myosin II (NMII), which contracts actin at the contact, causing retraction and increasing permeability (11). Interestingly, inhibition of contraction also increases permeability (12), suggesting that deviations from the force balance at cadherin–cadherin junctions compromise the barrier function. Importantly, junctions are also connected to cell–matrix adhesions through the actin cytoskeleton. ECs make discrete contacts ("focal adhesions") with the basement membrane (13). Focal adhesions congregate integrin receptors as well as signaling intermediates, including proteins that link integrins to the actin cytoskeleton. In the context of EC monolayers, focal adhesions participate in the barrier function by acting as anchorage points for actin cables that also connect to the VE-cadherin–dependent contacts at cell–cell junctions (14). Thus, alterations to the cell–matrix contacts may be transmitted to the junctions, thereby perturbing permeability.

In this study, we demonstrate that dasatinib (with doses similar to those found in the plasma of patients treated with the drug) is the only TKI, which is approved for the treatment of CML, that disrupts the integrity of endothelial monolayer. This occurs through a combination of effects that include the disassembly of cell–cell contacts and the alteration of cell–matrix adhesions, that result in cells that fail to migrate collectively (15). The disassembly of the cell–cell contacts together with the alterations to the cell–matrix adhesions is accompanied by decreased impedance of the cell monolayer, consistent with impaired integrity of the monolayer and increased permeability. Importantly, these effects are dose-dependent and reversible. Indeed, dasatinib washout restored cell–matrix adhesions, cell–cell contacts, and impedance. We further show that local ROCK activation and its resulting MLC phosphorylation underlies the actin-remodeling effect of dasatinib. This unique effect of dasatinib on ECs can also be observed *in vivo* as mice treated intraperitoneally with dasatinib displayed vascular leakage particularly in the gut, and therefore our results bring novel insights to the pathogenesis of the adverse effects of dasatinib.

Materials and Methods

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated and cultured as previously described up to the fourth passage (16). TKIs that are currently used in the treatment of CML (dasatinib, imatinib, nilotinib, bosutinib, and ponatinib; ref. 1) were purchased from LC Laboratories or Selleckchem. The inhibitors were used at clinically relevant concentrations and times, mimicking the half-life and the peak plasma concentration of dasatinib (3, 4).

Measurement of endothelial cell impedance

The iCELLigence real-time cell analyzer (RTCA) measures cellular adhesion in real-time using E-plates, which are coated with high-density gold arrays for measuring electrical impedance (ACEA Biosciences Inc.). The iCELLigence biosensor measures cellular adhesion, which is converted to Cell Index (arbitrary units) by the iCELLigence software (version 1.1.1501). HUVECs were grown confluent on E-Plate L8-plates. Background of the E-plates was determined in 400 μ L medium in the real-time cell analyzer (RTCA) station. Next, 100 μ L of the HUVEC suspension was added (10,000 cells/well). E-plates were placed into the RTCA station for impedance measurement every minute for 24 hours. The next day when the cells were confluent, TKIs mentioned above (1) were added to the cells at given concentrations in duplicates. E-plates were placed back into the RTCA station, and measurements were done every minute for 24 hours. All cell indexes were normalized (set to 1) to the last time-point before the addition of the compounds as described in the RTCA Software Manual (ACEA Biosciences Inc.).

Immunofluorescence analysis of cell–cell and cell–matrix adhesions

HUVECs were grown to confluence on gelatin-coated coverslips. Cells were then treated with the indicated dose of dasatinib, imatinib, or vehicle (DMSO) for 2 hours. For washouts, cells were treated for 2 hours, rinsed twice with HBSS, and medium replaced with inhibitor-free HUVEC medium. Cells were fixed using 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes. For VE-cadherin staining (cell–cell contacts), antibody was diluted in TBS + 1% BSA.

For actin and vinculin, cells were permeabilized for 10 minutes using 0.2% Triton X-100 in TBS and stained with Alexa647-phalloidin (Invitrogen) for F-actin or a 1:500 dilution of hVin-1 mAb (Sigma-Aldrich) + Alexa568-conjugated secondary antibody (Invitrogen). Cells were examined using a 4-laser (405, 488, 568, 647 nm) Leica SP5 spectral confocal scanning microscope fitted with a HyD detector (Leica Biosystems) and a 63 \times , 1.40NA PLANAPO oil objective. Images were acquired using LAS AF software (Leica) and analyzed using ImageJ (NIH).

Live microscopy

HUVECs were grown to confluence on 0.2% gelatin-pretreated cover slips for 24 hours, and DIC images were obtained in an inverted microscope (Olympus IX83) fitted with a full-housing Pekon incubator for temperature and CO₂ control. Samples were imaged using a 20 \times NA 0.75 immersion (oil) objective and a Hamamatsu EM-CCD (512 \times 512) camera. Images were sequentially collected every 60 seconds using Xcellence software (Olympus). Dasatinib or imatinib was added *in situ* as indicated in Figure 3.

Wound healing

HUVECs were grown to confluence in μ -Slide 4-well (Ibidi) previously coated with fibronectin (3 μ g/mL). Wounds were made by dragging a 10- μ L sterile pipette tip across the monolayer. Cells were incubated with dasatinib (100 nmol/L), nilotinib (5 μ mol/L), imatinib (10 μ mol/L), bosutinib (500 nmol/L), and without TKI for 12 hours. Pictures were taken every 15 minutes using the Olympus IX83 microscope as described in the previous section. Images were combined using a stitching algorithm (17) and analyzed using ImageJ (NIH).

Quantification of phosphorylated myosin regulatory light chain (RLC)

Phosphorylated RLC (Ser19) was quantified by densitometric analysis of confocal images. Briefly, condition-matched images were Z-projected using ImageJ, then analyzed for integrated intensity along a 1,024 \times 1,024 image. Then, the total cellular surface was calculated by thresholding the cell contours and calculating the overall surface covered by the cell monolayer. On average, % coverage was >95% for DMSO, dasatinib + Y-27632; 85% for Y-27632; and 60%–75% for dasatinib. The integrated intensity was corrected for the % coverage in each condition and values were referred to 100%, which was the mean of the measurements of cells treated with DMSO. Data represent the measurements of >10 fields (40 \times) from two independent experiments, corresponding to >200 cells. Statistical significance was determined according to the Mann–Whitney test after every condition failed the Shapiro–Wilk normality test.

Western blot

Confluent HUVECs were treated with DMSO or inhibitors for the times indicated in Figure 5. Washouts were carried out by rinsing the cells with HBSS at 37°C, followed by incubation with complete medium for the indicated times. After incubation, cells were scraped in Laemmli 2 \times buffer. Lysates were separated in 7% and 13.5% SDS/PAGE gels. Samples were transferred to PVDF membranes, blocked with 4% BSA, and incubated with antibodies against pThr18/pSer19 MLC, pSer19 MLC, pThr696 MYPT1, pThr853 MYPT1, and total MYPT1 were from Cell Signaling Technology. Antibody against total MHCII-B was from Biogen

and antibody against tubulin was from Sigma. After incubation with species-matched, HRP-conjugated antibodies and thorough rinsing with TBS-Tween, blotted images were acquired in an ImageQuant LAS-4000 workstation (GE). Bands were subjected to densitometry using ImageJ and normalized using the loading control (total MHCII-B or tubulin).

Viability assay

Confluent HUVECs were treated with dasatinib 5, 10, 25, 50, and 100 nmol/L for 3 hours. The entire supernatant was collected, and 7AAD was added. Events were acquired for 60 seconds from each tube with FACSVerse (BD Biosciences). Simultaneously, the number of detached cells was counted.

In vivo endothelial permeability assay

Female C57BL/6J mice (The Jackson Laboratory and Envigo) were treated 3 days with dasatinib (50 mg/kg), imatinib (100 mg/kg), bosutinib (50 mg/kg; all LC laboratories) or vehicle (Citric acid, pH 3.0) intraperitoneal once a day. At the third day, 30 minutes after the drug administration, Evans Blue (5 mg/mL in PBS, Sigma-Aldrich) was injected intravenously to the tail vein. The mice were euthanized after 30 minutes. Spleen, lungs, brains, and small intestine were collected and weighted. 0.5 mL of formamide (Sigma-Aldrich) was added and incubated at 55°C for 24 hours. The intensity of Evans Blue in the organs was determined by detecting absorbance at wavelength 610 nm. The animal experiments were approved by the Animal Experiment Board of the State Provincial Office of Southern Finland. All studies have been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

Statistical analysis

The results were compared by one-way ANOVA Kruskal–Wallis test. Significance was set at $P < 0.05$, and all analyses were performed using GraphPad Prism software (version 5.0c; GraphPad).

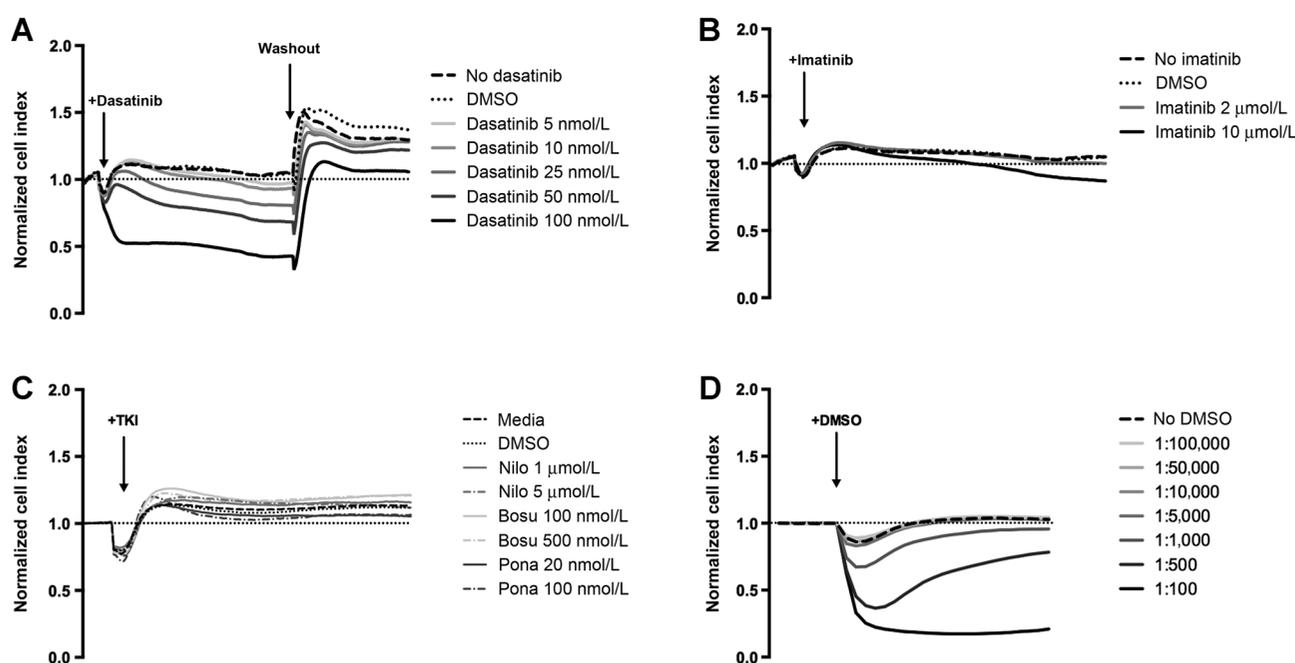
Results

Dasatinib reversibly disrupts the integrity of the endothelial monolayer in a dose-dependent manner

To assess the hypothesis that the adverse effects of dasatinib are at least partially based on its effect on ECs, we studied the effects of dasatinib and other TKIs that are currently used in the treatment of CML, on the integrity of monolayers of HUVEC. This was done by impedance measurements, which is a good readout of the integrity of a monolayer (18).

We selected different concentrations of dasatinib, imatinib, nilotinib, bosutinib, and ponatinib and vehicle alone (DMSO) that mimic the actual concentrations found in the serum of TKI-treated patients (19–21). Real-time follow-up of the cell contacts showed that the addition of dasatinib quickly decreases cell impedance in a dose-dependent manner. After 2 hours of treatment with 5 and 10 nmol/L dasatinib, we observed a mild decrease in impedance (Fig. 1A). In contrast, 25 and 50 nmol/L dasatinib induced a steep decrease, whereas 100 nmol/L (a dose similar to the levels found in the plasma of patients 1 hour after oral uptake of 100 mg dasatinib) caused a profound decrease in impedance (Fig. 1A). Conversely, treatment with 2 μ mol/L imatinib for 2 hours had no significant effect, and 10 μ mol/L

Kreutzman et al.

**Figure 1.**

Dasatinib uniquely lowers HUVEC impedance in a reversible and dose-dependent manner. HUVECs were cultured on iCELLigence E8 plates overnight to gain full confluence. When confluent, different concentrations of (A) dasatinib, (B) imatinib, (C) nilotinib, bosutinib, ponatinib, or (D) DMSO were added to the wells for 2 hours. Dasatinib was washed out from the wells, and the cells were left to recover for another hour while recording the impedance. The cell impedance was measured every minute with iCELLigence for 24 hours. The experiment shown is representative of three experiments performed.

decreased the impedance only slightly (Fig. 1B). Clinically relevant concentrations of nilotinib (1 and 5 $\mu\text{mol/L}$), bosutinib (100 and 500 nmol/L), and ponatinib (20 and 100 nmol/L) had no effect either on the impedance readings (Fig. 1C). The inhibitors were dissolved in DMSO and diluted at least 1:5,000 in cell culture media to avoid any effects on the impedance (Fig. 1D).

To address whether the effect of dasatinib was due to non-reversible damage to the endothelial monolayer, we removed the inhibitor, added fresh medium and measured the impedance for another hour in the absence of dasatinib. Importantly, impedance quickly recovered to levels comparable with those measured at the beginning of the experiment (Fig. 1A).

Dasatinib induces a fast and reversible disorganization of the actin cytoskeleton and the appearance of large gaps in endothelial monolayers

To address the possible cellular effects of dasatinib that decrease the impedance of the HUVEC monolayers, we examined the appearance of the HUVEC monolayers after treatment with the inhibitor. Initially, we stained polymerized F-actin with fluorescently tagged phalloidin (Fig. 2A). We found that 10 to 25 nmol/L dasatinib induced very small gaps between cells (Fig. 2A) and a modest decrease of the junctional F-actin (the F-actin found at the cell–cell contacts), consistent with the mild effect of these doses on impedance. On the other hand, 50 nmol/L dasatinib had a much more dramatic effect. We observed a deep decrease of junctional actin and the appearance of thin, F-actin–rich lamellipodia facing larger gaps between cells. Finally, 100 nmol/L dasatinib promoted a complete loss of the integrity of the monolayer. Cells appeared as single entities or in small islets with a high percentage of protrusive cells as revealed by thin rims of F-actin at

round edges (Fig. 2A, arrowheads). Conversely, 10 $\mu\text{mol/L}$ of imatinib had no effects on the monolayer.

Because the major effect of dasatinib focused on the cell–cell junctions, we examined these in more detail by visualizing the adherens junction marker VE-cadherin, which was no longer detected on the surface of dasatinib-treated HUVECs (Fig. 2B). However, dasatinib washout rapidly restored VE-cadherin at the reformed cell–cell junctions. These data indicate that dasatinib induces the rapid disappearance of VE-cadherin from the cell–cell contacts concomitant to their dissolution.

We next analyzed the dynamics of contact dissolution and reformation using time-lapse live-cell microscopy. By imaging confluent HUVECs every minute after the addition of dasatinib, we observed that the drug quickly disrupted the cell–cell contacts, and large gaps between the cells could be observed as early as 6 minutes after dasatinib addition (Fig. 3A, top). After 1 hour, the endothelial monolayer was disorganized and only scattered cell–cell contacts remained. Individual, spindly, isolated cells were readily observed (Fig. 3A; Supplementary video S1). Conversely, imatinib had no significant effect on the integrity of the monolayers (Fig. 3A, bottom). Again, dasatinib washout led to the rapid recovery of the integrity of the monolayer, which was apparent after 10 minutes and comparable with untreated monolayers after 40 minutes (Fig. 3B, Supplementary video S2).

Dasatinib prevents endothelial cell wound healing by inhibiting the formation of cell–cell contacts

The effect of dasatinib on the integrity of the EC monolayer suggested a crucial role for a dasatinib target in the organization of polarized actin at cell–cell junctions. This led us to hypothesize that dasatinib would also prevent the formation of cell–cell

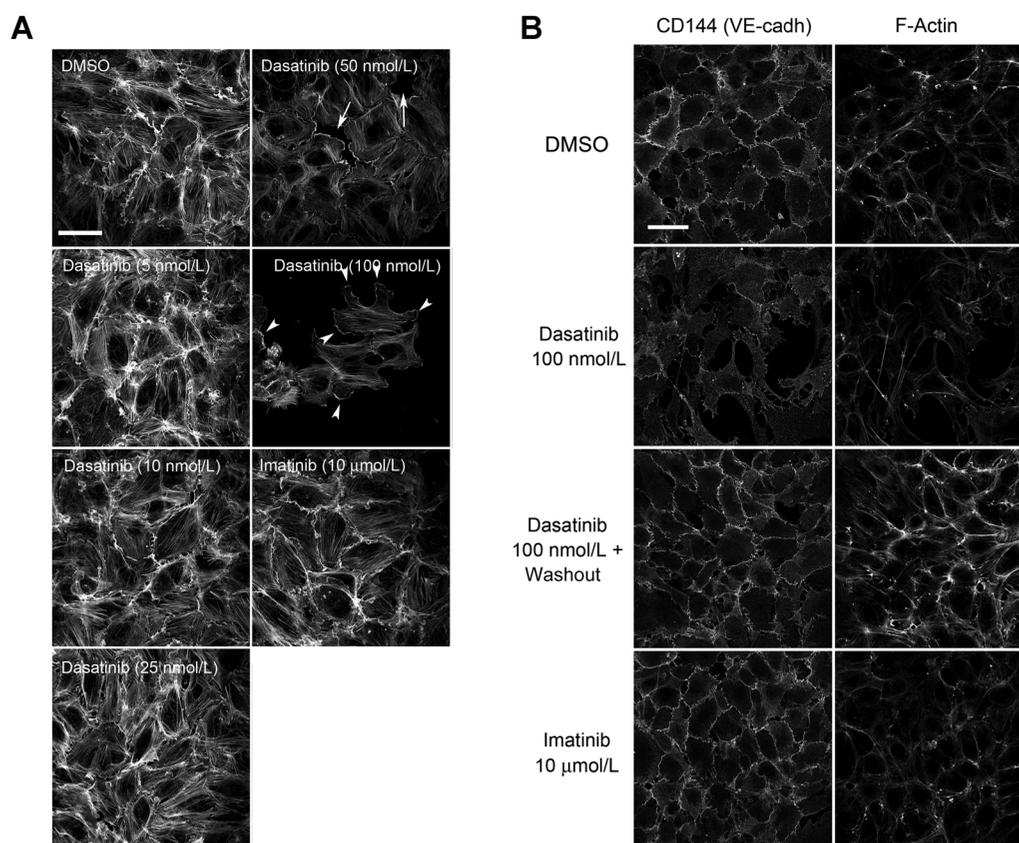


Figure 2.

Dasatinib disorganizes actin cytoskeleton and breaks cell-cell junctions in a dose-dependent and reversible manner. HUVECs were cultured on cover slips precoated with gelatin until confluent. **A**, Dasatinib dose-response was analyzed by visualizing the actin-cytoskeleton by microscope. When confluent, the cells were treated with dasatinib for 2 hours at different concentrations (or imatinib 2 hours, 10 $\mu\text{mol/L}$). The wells were then fixed and further stained with Alexa647-phalloidin to detect F-actin. **B**, Confluent HUVECs were treated with 100 nmol/L dasatinib or 10 $\mu\text{mol/L}$ imatinib for 2 hours. After the treatment, some wells were washed three times with warm medium, and the cells were recovered in cell culture conditions for 1 hour. The wells were then fixed and further stained for VE-Cadherin. F-Actin was simultaneously stained to observe the concomitant disorganization of the actin cytoskeleton. All images were taken with a Leica DMR fluorescence microscope fitted with a Xenon lamp and a 20 \times immersion (oil) objective. Images are representative of 20 fields acquired per condition in three independent experiments. Scale bar, 50 μm .

contacts if the integrity of the monolayer had been compromised by alternative means (e.g., mechanical wounding of the monolayer). In this scenario, cells are required to migrate first and then form stable contacts.

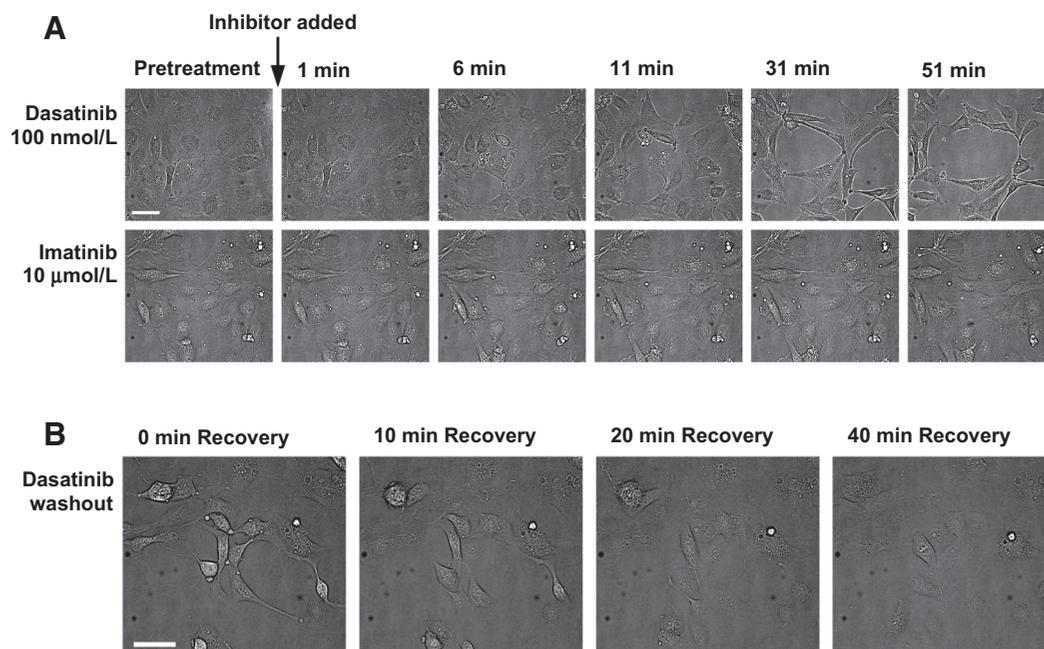
To test this hypothesis, we performed wound-healing assays in the presence of different TKIs. The wound area decreased similarly in the presence of nilotinib, bosutinib, and imatinib as in the control wounds and healed completely in 420 minutes. Conversely, dasatinib significantly slowed down the healing process (Fig. 4A and B), with $\sim 30\%$ of the wound still open after 12 hours from scratching. Time-lapse movies of the closing wounds (Supplementary videos S3 and S4) revealed that dasatinib compromised the integrity of the advancing endothelial monolayer, promoting the emergence of isolated cells that migrated individually, i.e., detached and lacking any contact with other cells of the monolayer nearby. Careful examination of the advancing dasatinib-treated monolayers revealed loss of cell-cell contacts and mesenchymal traits in many individual cells (e.g., lamellipodia in cells in the rear cohorts) (Fig. 2A, arrowheads). These data suggest that dasatinib does not prevent cell migration, but it inhibits the for-

mation of intercellular contacts, promoting a more individual, non-collective type of migration and thereby preventing the reestablishment of the integrity of the monolayer.

Dasatinib increases ROCK/non-muscle myosin II activity

The effect of dasatinib in the organization of the actin cytoskeleton and the disappearance of junctional actin suggested an alteration in a signaling pathway involved in actin remodeling. A major regulator of actin remodeling is NMII (22). To test the involvement of NMII in dasatinib-induced actin remodeling, we treated HUVEC monolayers with dasatinib and other TKIs that are currently used in the treatment of CML and measured its effect on Ser19 and Thr18/Ser19 phosphorylation of MLC. These phosphorylations are bona fide markers of the activation of NMII (23), which is the main actin-related molecular motor expressed in these cells (24). Western blot and image intensity quantification revealed that dasatinib induced a modest, but reproducible, increase in the amount of MLC phosphorylated in Ser19 and Thr18/Ser19, consistent with a dasatinib-induced reorganization of the actin by modulation of NMII activity (Fig. 5A-C). These changes also altered the distribution of cell-matrix adhesions,

Kreutzman et al.

**Figure 3.**

Live imaging on the effect of dasatinib on cell-cell junctions. HUVECs were cultured on cover slips pre-coated with gelatin. When confluent, the cells were placed in a microscope, and 100 nmol/L dasatinib or 10 μmol/L imatinib were added. Images were taken every minute for 1 hour. After 1 hour, the cells were washed three times and recovered while obtaining images every minute for 1 hour. The live images were obtained in an inverted microscope (Olympus IX83) fitted with a full-housing Pekon incubator to control temperature and CO₂. Samples were imaged using a 20x NA 0.75 immersion (oil) objective and a Hamamatsu EM-CCD (512 × 512) camera.

which were sharper and better defined in dasatinib-treated cells compared with control conditions (Fig. 5D). Together, these data indicate that dasatinib increases the mesenchymal traits of endothelial cells, perturbing the cell-cell junctions by increasing NMII-mediated contractility.

Next, we aimed at elucidating the specific mechanism by which dasatinib promotes these changes in endothelial monolayers. Based on the alterations in NMII phosphorylation, we hypothesized that ROCK was involved in the mechanism altered by dasatinib. To address this, we treated HUVEC cells with the specific ROCK inhibitor Y-27632 in the absence, or presence, of dasatinib. We found that, consistent with previous results, Y-27632 reversibly abrogated phosphorylation of MYPT1 on Thr696 and Thr853, which are two dependent sites through which ROCK prevent NMII dephosphorylation and inactivation (Fig. 5E). Dasatinib restored some MLC phosphorylation despite the presence of Y-27632 (Fig. 5A–C) and also MYPT1 phosphorylation on Thr853, and specially Thr696 (Fig. 5E). These results indicate that dasatinib promotes the activation of ROCK, even overcoming the inhibiting effect of Y-27632. Also, these experiments constitute the proof of a molecular mechanism by which dasatinib promotes local ROCK activation and alters the organization of the actin cytoskeleton.

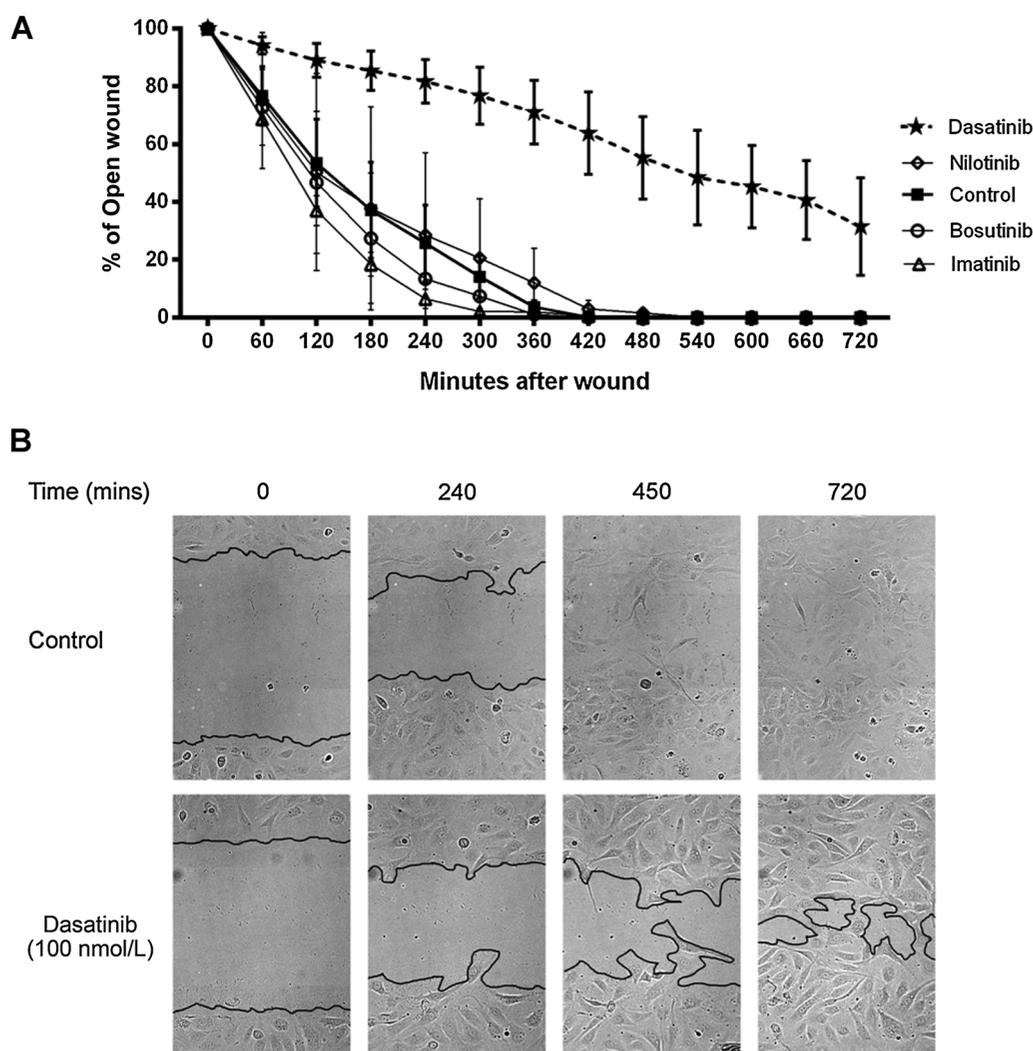
Therapeutic concentrations of dasatinib are not toxic for endothelial cells

The dramatic effects observed in the presence of dasatinib could be due to acute toxicity of the drug. A major argument against this possibility is the reversibility of the cellular effects

when the drug was washed out. If dasatinib was toxic for the cells, the cells would not be able to recover their ability to reform cell-matrix adhesions or the integrity of the endothelial monolayer. To further rule out toxicity-related effects, we treated HUVEC with different clinically relevant concentrations of dasatinib and cell viability from four different EC monolayers was assayed using 7AAD. The mean percentage of non-viable 7AAD-positive cells in the control wells was 5.4%, and with 5 nmol/L dasatinib 5.4%, 10 nmol/L 7.5%, 25 nmol/L 6.9%, 50 nmol/L 7.5%, and 100 nmol/L 7.5% ($P = 0.026$). Moreover, the number of detached cells was counted from the supernatant of each well by constant flow for 60 seconds and compared with the control well (no dasatinib). No significant increase was observed in the number of cells in the supernatant in respect to the control condition (mean fold change of detached cells in respect to the control well (1) was 1.0 with 5 nmol/L dasatinib, 1.1 with 10 nmol/L, 1.1 with 25 nmol/L, 1.1 with 50 nmol/L and 1.2 with 100 nmol/L dasatinib; $P = 0.13$). These results are consistent with low toxicity at this dose of dasatinib on ECs.

Dasatinib causes vascular leakage *in vivo*

To correlate our observations in an *in vivo* setting, we performed an Evans Blue assay, which measures blood vessel permeability *in vivo* (25). Mice were treated intraperitoneally for 3 days with dasatinib (50 mg/kg), imatinib (100 mg/kg), or bosutinib (50 mg/kg) once a day. This dose of dasatinib causes similar side effects, such as lymphocytosis, than those seen in humans at a therapeutic dose (26). On the third day, 30 minutes after the administration of the drugs, Evans Blue was injected intravenously.

**Figure 4.**

Dasatinib impairs wound closure and alters collective cell migration. **A**, HUVECs were grown to confluence in μ -Slide 4-well and scratched with a 10- μ L pipet tip in the presence of the doses of dasatinib, imatinib, nilotinib, and bosutinib as indicated in Material and Methods. Percentage of open area either for dasatinib, imatinib, bosutinib, and control every hour is represented. Data is the mean \pm SD of two independent experiments in which we represent the % area of the coverslip not covered with cells at every time point. **B**, Representative images of the experiments quantified in (A), control and dasatinib wound at 0, 240, 450, and 720 minutes.

The mice were euthanized after 30 minutes, and different organs were collected into solvent, and Evans Blue concentration was measured.

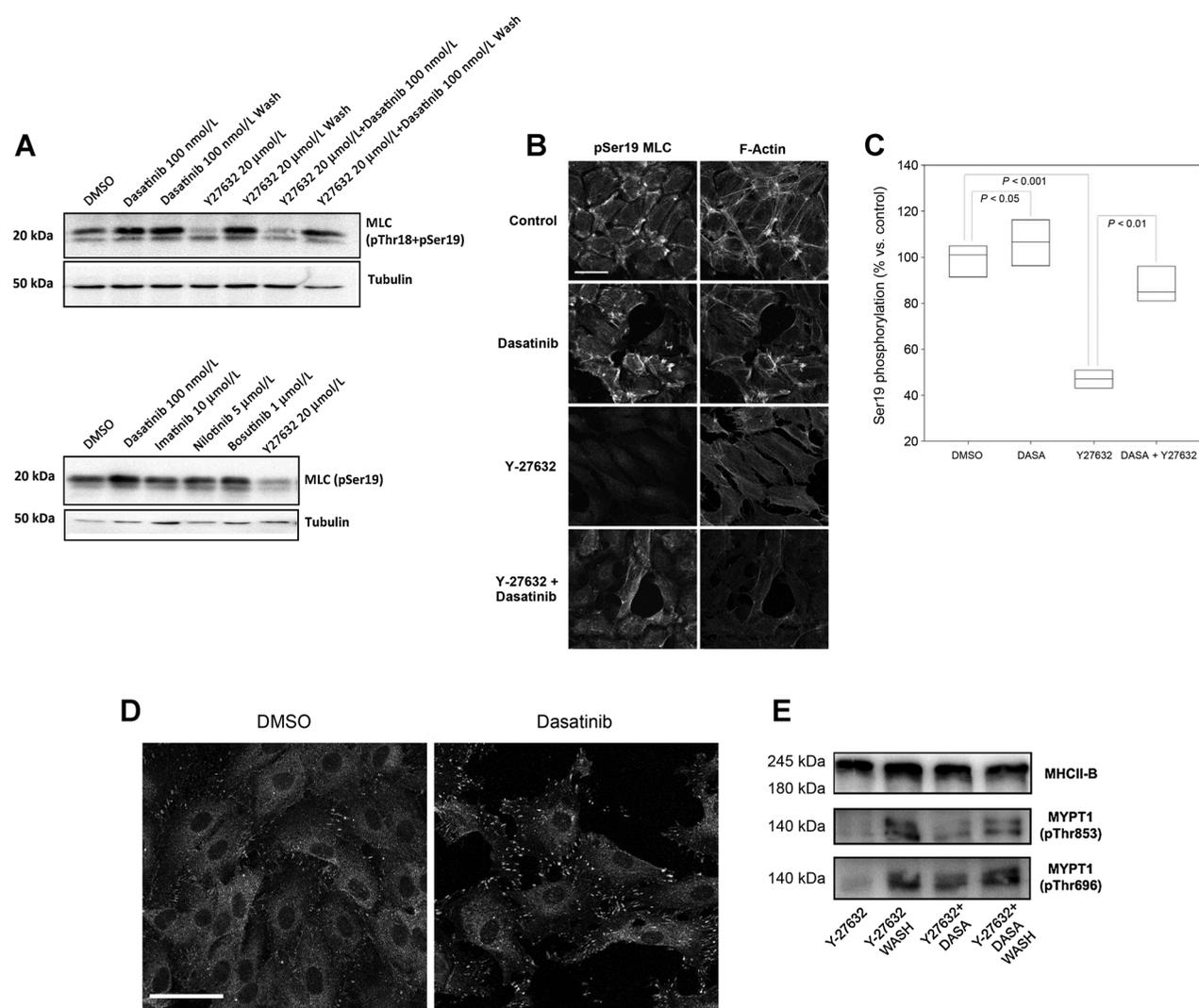
Dasatinib significantly increased the amount of Evans Blue in the small intestine compared with the control group and the other TKIs (dasatinib mean 13.6, vehicle 1.0, imatinib 2.8, bosutinib 1.5 mg Evans Blue/mg tissue; $P = 0.0089$; Fig. 6A, Supplementary Fig. S5). The amount of detected Evans Blue in the spleen was also higher in the mice which had been treated with dasatinib (dasatinib mean 11.1, vehicle 6.6, imatinib 3.9, bosutinib 7.6 mg Evans Blue/mg tissue; $P = 0.04$; Fig. 6B). In contrast, no significant differences of Evans Blue were found in the brain (dasatinib mean 6.7, vehicle 0.3, imatinib 0.6, bosutinib 2.2 mg Evans Blue/mg tissue) and lungs (dasatinib mean 25.1, vehicle 38.9, imatinib 2.4, bosutinib 2.2 mg Evans Blue/mg tissue).

Discussion

Many studies have reported the immune-related adverse effects of dasatinib (7, 27–33). However, these side effects do probably not account for all the observed deleterious effects of the treatment in human patients, for example, pleural effusions and bleeding diathesis. These are critical events that physicians take into account when prescribing the drug, but data on their molecular basis remains scarce. Interestingly, we found that dasatinib, in contrast to the other studied TKIs, compromises the barrier function the vascular endothelium, which is consistent with some of the observed unique side effects of dasatinib.

Pleural effusions are the most characteristic adverse events in patients with dasatinib-treated Ph+ leukemia. Depending on the study, 10% to 35% of the treated patients develop pleural

Kreutzman et al.

**Figure 5.**

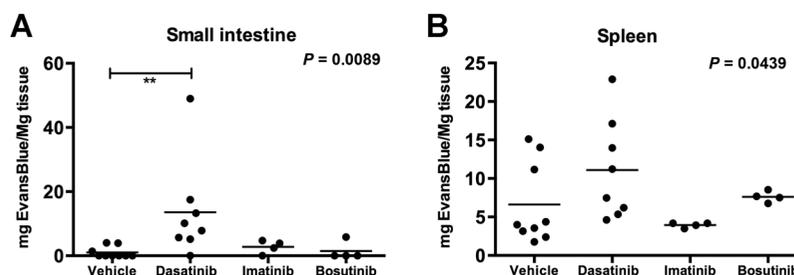
Cell-cell junction dissolution induced by dasatinib involves non-muscle myosin II activation and altered ROCK activity. **A**, HUVECs were grown to confluence in tissue culture dishes, then treated with the indicated doses of the indicated inhibitors for 1 hour. In the wash conditions, cells were incubated with the inhibitors for 1 hour, removed and allowed to recover for an additional 1 hour. Cells were lysed and blotted for MLC phosphorylated on Ser19 or Thr18/Ser19 as indicated. Tubulin is shown as loading control. The experiment shown is representative of three performed. **B**, Confocal images of HUVECs grown to confluence in gelatin-covered coverslips and incubated with the indicated inhibitors (100 nmol/L dasatinib, 20 μmol/L Y-27632, alone or in combination) for 1 hour. Cells were fixed and stained for MLC phosphorylated on Ser19 and F-actin. Scale bar, 50 μm. **C**, Quantification by densitometric analysis of fields as shown in (B; see Materials and Methods for details). Data represent the measurements of >10 fields (40×) from two independent experiments, corresponding to >200 cells. Statistical significance was determined according to Mann-Whitney test. **D**, Confocal images of HUVECs grown to confluence in gelatin-covered coverslips and incubated with DMSO or 100 nmol/L dasatinib for 2 hours. Cells were fixed and stained for vinculin to visualize focal adhesions. Images are representative of 20 fields acquired per condition in three independent experiments. Scale bar, 50 μm. **E**, HUVECs grown to confluence in tissue culture dishes were treated with Y-27632 (20 μmol/L), alone or in combination with dasatinib for 1 hour. In the wash condition, inhibitors were removed and cells allowed to recover for an additional 1 hour. Cells were lysed and blotted for phosphorylated MYPT1 (residues Thr696 and Thr853). MHCII-B (myosin II heavy chain) is shown as a loading control. The experiment shown is representative of three experiments performed.

effusions at some point of their treatment. These effusions have traditionally been considered as unique side effect to dasatinib treatment as they are extremely rare during imatinib, nilotinib, and ponatinib treatment (34–37). Recent studies showed that a small percentage of bosutinib-treated patients has pleural effusions; however, most of them had a history of pleural effusions with previous treatments with dasatinib (38). In contrast, pleural effusions are rarer in patients treated first-line with

bosutinib (39). Pleural effusions may depend on different cellular systems and an increase in the endothelial barrier permeability of both vascular and lymphatic vessels in intimate contact with the visceralis pleura could contribute to the onset of pleural effusions. Interestingly, we did not observe significant differences in vascular leakage in the lungs of mice treated with different TKIs. As seen in our results, also the control mice had an elevated amount of Evans Blue in the lungs, which

Figure 6.

Dasatinib causes endothelial leakage *in vivo*. Blood vessel permeability was studied by an Evans Blue assay. The mice were treated i.p. 3 days either with dasatinib (50 mg/kg), imatinib (100 mg/kg), bosutinib (50 mg/kg), or vehicle, and albumin binding Evans Blue was injected i.v. After 30 minutes, the mice were sacrificed, and spleen, lungs, brains, and small intestine were collected into solvent, and Evans Blue concentration was measured. Increased concentration of Evans Blue was observed in the (A) small intestine and (B) spleen of dasatinib-treated mice.



might be caused by contamination of blood from large vessels while removing the lungs, rendering possible differences in vascular leakage undetectable. Another possibility is that the barrier function of the lung is intrinsically less efficient than in other organs. Lung microvasculature is non-contractile, and proteins of the connexin family permit passage to molecules under 1 kDa in size (40). The molecular weight of Evans Blue is close to 1 kDa; hence, it is not unsurprising that it appears in the lungs of control animals. Evans Blue might therefore be inadequate to assess lung permeability, but it is excellent to account for endothelial permeability in contractile endothelium, e.g., in the gut. Moreover, the effusions observed in the patients are likely related to the cumulative, long-term use of dasatinib, as effusions normally occur after weeks of treatment and are dose-dependent (41). We propose that dasatinib causes accumulative damage and leakage due to its reversible effect on the barrier function of ECs when the clinical concentration is achieved.

Another typical adverse effect of dasatinib is the onset of hemorrhage and bleeding diathesis (41). Such events have rarely been reported in patients with CML treated with other TKIs (38, 39, 42, 43). The pathophysiology of bleeding diathesis associated with dasatinib therapy remains poorly understood. Typically, this has been attributed to thrombocytopenia and/or the reversible inhibition of platelet aggregation caused by dasatinib (44, 45). Bleeding has been observed in up to 23% of patients treated with dasatinib who had failed imatinib treatment. The majority of the bleeding was localized to the gastrointestinal tract (5). Moreover, an overview of >900 patients undergoing treatment with dasatinib displayed hemorrhages in various tissues in 40% of the patients. Also, 14% of the patients displayed gastrointestinal bleeding. Most of these patients were receiving high doses of dasatinib (>100 mg) or two doses per day (46). The specific occurrence of gastrointestinal bleedings correlates with the oral administration of dasatinib, which therefore involves direct contact of the drug with the local gastrointestinal endothelium. Our mice experiment reproduced these observations of the dasatinib-treated patients.

Another possible effect of the disruption of the endothelium by dasatinib *in vivo* is an exposure of the subendothelial matrix, which may cause platelet immobilization and a subsequent decrease of the number of circulating platelets. Interestingly, the platelet count in peripheral blood drops quickly after dasatinib intake, recovering back to baseline a few hours later (4). In this scenario, dasatinib-induced thrombocytopenia might be caused not only by a central and chronic effect on megakaryocytopoiesis and platelet production (47), but also by an acute peripheral, transient effect at the endothelial level.

Many different phosphatases and kinases act as regulators of the endothelial barrier function, like those involved in the activation of NMII, including ROCK and MLC. In migrating cells, SRC phosphorylates ROCK on Y722, decreasing its association to RhoA, thereby preventing NMII phosphorylation via this axis. This mechanism is involved in adhesion turnover at the leading edge (48). We propose a model in which an Src family kinase (e.g., SRC) phosphorylates and inactivates ROCK on Y722, maintaining NMII activation in check to maintain the homeostasis of cell–cell junctions. Dasatinib would inhibit this SFK, promoting ROCK activation, which would in turn phosphorylate MYPT1 on Thr696 and Thr853. This phosphorylation inhibits the phosphatase, increasing NMII phosphorylation (49). Interestingly, dasatinib reverses the inhibitory effect of Y-27632. This could be due to an allosteric effect by which dephosphorylation of ROCK in Y722 (caused by dasatinib) would decrease the affinity of Y-27632 for ROCK. Alternatively, an additional kinase could be mediating the phosphorylation of MYPT1 on Thr696 and Thr853. The latter is unlikely because ROCK phosphorylates those residues directly (49).

Despite all this, these findings do not rule out additional mechanisms or other kinases. Several possibilities emerge: one is that there is simultaneous inhibition of two, or more, kinases, that account for a joint phenotype as described here. This can occur in an additive, synergistic, or cascading manner. Another nonexclusive possibility is that dasatinib has more than one mechanism of inhibition of a given kinase: clear examples would be the inhibition of scaffolding functions or the inhibition of the kinase domain of the putative kinase. In this scenario, the blockade of the kinase activity would prevent the release of an autoinhibitory domain (in the kinase itself, or in another adaptor), which would result in the blockade of an entire pathway.

The ability of dasatinib to open transiently and dose-dependently endothelial cell–cell junctions would not only explain some of the side effects of the drug such as bleeding, thrombocytopenia, and pleural effusions, but it would also promote its use to deliver other therapeutic drugs to previously unreachable anatomic locations. In this view, dasatinib could be useful as coadjuvant therapy to transiently increase the endothelial barrier permeability and favor the delivery of additional targeted treatments into organs, for example, solid tumors. In addition, our wound-healing experiments suggest that this drug has angiostatic activity as it interferes with the establishment of the endothelial monolayer and would hinder the formation of new vessels and the consequent delivery of nutrients and oxygen to the tumor.

In summary, we demonstrate that clinically relevant concentrations of dasatinib disrupt the endothelial monolayer dose dependently and reversibly, which is accompanied with impaired

Kreutzman et al.

integrity and increased permeability. The effect was observed also *in vivo*, as mice treated with dasatinib displayed vascular leakage especially in the gut. Our results bring novel insights to the pathogenesis of the typical side effects observed in dasatinib-treated patients.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

J.L. Steegmann is a consultant/advisory board member for Bristol-Myers Squibb, Incyte, Novartis and Pfizer. S. Mustjoki reports receiving speakers bureau honoraria from and is a consultant/advisory board member for Bristol-Myers Squibb, Novartis, and Pfizer, and reports receiving commercial research grants from Ariad, Novartis and Pfizer. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: A. Kreutzman, C. Cuesta-Mateos, S. Mustjoki, M. Vicente-Manzanares, C. Muñoz-Calleja
Development of methodology: A. Kreutzman, B. Colom-Fernández, Y. Pérez-García, M. Vicente-Manzanares
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): B. Colom-Fernández, A. Marcos Jiménez, M. Ilander, Y. Pérez-García, C. Delgado Arévalo, O. Brück, H. Hakanen, J. Saarela, A. Ortega-Carrión, A. de Rosendo, A. Juanes-García, S. Mustjoki, M. Vicente-Manzanares
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): A. Kreutzman, A. Marcos Jiménez, C. Delgado Arévalo, J. Saarela, A. Ortega-Carrión, A. Juanes-García, J.L. Steegmann, M. Vicente-Manzanares, C. Muñoz-Calleja

References

- Larson RA. Is there a best TKI for chronic phase CML? *Blood* 2015;126:2370–5.
- Hantschel O, Rix U, Superti-Furga G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma* 2008; 49:615–9.
- Luo FR, Yang Z, Camuso A, Smykla R, McGlinchey K, Fager K, et al. Dasatinib (BMS-354825) pharmacokinetics and pharmacodynamic biomarkers in animal models predict optimal clinical exposure. *Clin Cancer Res* 2006;12:7180–6.
- Mustjoki S, Auvinen K, Kreutzman A, Rousselot P, Hernesniemi S, Melo T, et al. Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia* 2013;27:914–24.
- Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Vidal-Senmache G, et al. Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy. *Cancer* 2009; 115:2482–90.
- Porkka K, Khoury HJ, Paquette RL, Matloub Y, Sinha R, Cortes JE. Dasatinib 100 mg once daily minimizes the occurrence of pleural effusion in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase and efficacy is unaffected in patients who develop pleural effusion. *Cancer* 2010;116:377–86.
- Steegmann JL, Baccarani M, Breccia M, Casado LF, Garcia-Gutierrez V, Hochhaus A, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2016;30:1648–71.
- Komarova YA, Kruse K, Mehta D, Malik AB. Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circ Res* 2017;120:179–206.
- Shasby DM, Shasby SS, Sullivan JM, Peach MJ. Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability. *Circ Res* 1982; 51:657–61.
- Schnittler H, Taha M, Schnittler MO, Taha AA, Lindemann N, Seebach J. Actin filament dynamics and endothelial cell junctions: the Ying and Yang between stabilization and motion. *Cell Tissue Res* 2014;355:529–43.
- van Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, van Hinsbergh VW. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res* 2000;87:335–40.

Writing, review, and/or revision of the manuscript: A. Kreutzman, M. Ilander, J. Saarela, J.L. Steegmann, S. Mustjoki, M. Vicente-Manzanares, C. Muñoz-Calleja

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): A. Marcos Jiménez, C. Delgado Arévalo
Study supervision: A. Kreutzman, S. Mustjoki, C. Muñoz-Calleja

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Paloma Sánchez-Mateos for providing HUVECs, the personal at the Department of Immunology, Hematology Research Unit Helsinki and the FIMM Technology Center High Throughput Biomedicine unit for their technical expertise, support, and use of instruments.

Grant Support

A. Kreutzman is a Sigrid Jusélius postdoctoral fellow. Grants PI12/00494P and PI15/02085 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias to C. Muñoz-Calleja supported this work. C. Muñoz-Calleja was co-financed by FEDER funds. M. Vicente-Manzanares is an investigator from the Ramon y Cajal Program (RYC-2010-06094) and is supported by grants SAF2014-54705-R from MINECO, Marie Curie CIG-293719 from the EU, CIVP16A1831 from Ramon Areces Foundation and the BBVA Foundation. S. Mustjoki is supported by the Finnish Cancer Institute, Academy of Finland, Sigrid Jusélius Foundation and Finnish Cancer Associations.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 15, 2016; revised August 10, 2016; accepted August 10, 2017; published OnlineFirst August 18, 2017.

- Breslin JW, Zhang XE, Worthylake RA, Souza-Smith FM. Involvement of local lamellipodia in endothelial barrier function. *PLoS One* 2015;10: e0117970.
- Case LB, Waterman CM. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. *Nat Cell Biol* 2015;17:955–63.
- Atherton P, Stutchbury B, Jethwa D, Ballestrom C. Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin. *Exp Cell Res* 2015.
- Haeger A, Wolf K, Zegers MM, Friedl P. Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends Cell Biol* 2015; 25:556–66.
- Munoz C, Pascual-Salcedo D, Castellanos MC, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity. *Blood* 1996;88:3482–90.
- Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* 2009;25: 1463–5.
- Sun M, Fu H, Cheng H, Cao Q, Zhao Y, Mou X, et al. A dynamic real-time method for monitoring epithelial barrier function in vitro. *Anal Biochem* 2012;425:96–103.
- van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev* 2009;35:692–706.
- Cortes JE, Kantarjian HM, Brummendorf TH, Kim DW, Turkin AG, Shen ZX, et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* 2011; 118:4567–76.
- Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2012;367:2075–88.
- Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:778–90.

23. Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Myosin light chain mono- and diphosphorylation differentially regulate adhesion and polarity in migrating cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402:537–42.
24. Kolega J. Asymmetric distribution of myosin IIB in migrating endothelial cells is regulated by a rho-dependent kinase and contributes to tail retraction. *Mol Biol Cell* 2003;14:4745–57.
25. Radu M, Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Visualized Exp* 2013:e50062.
26. Hekim C, Ilander M, Yan J, Michaud E, Smykla R, Vaha-Koskela M, et al. Dasatinib changes immune cell profiles concomitant with reduced tumor growth in several murine solid tumor models. *Cancer Immunol Res* 2017;5:157–69.
27. Kreutzman A, Porkka K, Mustjoki S. Immunomodulatory effects of tyrosine kinase inhibitors. *Int Trends Immun* 2013;01:22–33.
28. Ilander M, Hekim C, Mustjoki S. Immunology and immunotherapy of chronic myeloid leukemia. *Curr Hematol Malignancy Rep* 2014; 9:17–23.
29. Kreutzman A, Ilander M, Porkka K, Vakkila J, Mustjoki S. Dasatinib promotes Th1-type responses in granzyme B expressing T-cells. *Oncoimmunology* 2014;3:e28925.
30. Kreutzman A, Juvonen V, Kairisto V, Ekblom M, Stenke L, Seggewiss R, et al. Mono/oligoclonal T and NK cells are common in chronic myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy. *Blood* 2010;116:772–82.
31. Kreutzman A, Ladell K, Koehel C, Gostick E, Ekblom M, Stenke L, et al. Expansion of highly differentiated CD8+ T-cells or NK-cells in patients treated with dasatinib is associated with cytomegalovirus reactivation. *Leukemia* 2011;25:1587–97.
32. Mustjoki S, Ekblom M, Arstila TP, Dybedal I, Epling-Burnette PK, Guilhot F, et al. Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia* 2009;23:1398–405.
33. Lee SJ, Jung CW, Kim DY, Lee KH, Sohn SK, Kwak JY, et al. Retrospective multicenter study on the development of peripheral lymphocytosis following second-line dasatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2011;86:346–50.
34. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010;362:2260–70.
35. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, O'Brien S, Borthakur G, Bruzzi J, Munden R, et al. Pleural effusion in patients with chronic myelogenous leukemia treated with dasatinib after imatinib failure. *J Clin Oncol* 2007;25:3908–14.
36. Hochhaus A, Rosti G, Cross NC, Steegmann JL, le Coutre P, Ossenkoppele G, et al. Frontline nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the European ENEST1st study. *Leukemia* 2016;30:57–64.
37. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2013;369:1783–96.
38. Kantarjian HM, Cortes JE, Kim DW, Khoury HJ, Brummendorf TH, Porkka K, et al. Bosutinib safety and management of toxicity in leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2014;123:1309–18.
39. Brummendorf TH, Cortes JE, de Souza CA, Guilhot F, Duville L, Pavlov D, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukaemia: results from the 24-month follow-up of the BELA trial. *Br J Haematol* 2015;168:69–81.
40. Bhattacharya J, Matthay MA. Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury. *Annu Rev Physiol* 2013;75:593–615.
41. Steegmann JL, Cervantes F, le Coutre P, Porkka K, Saglio G. Off-target effects of BCR-ABL1 inhibitors and their potential long-term implications in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012; 53:2351–61.
42. Kantarjian HM, Hochhaus A, Saglio G, De Souza C, Flinn IW, Stenke L, et al. Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. *Lancet Oncol* 2011;12:841–51.
43. Jain P, Kantarjian H, Jabbour E, Gonzalez GN, Borthakur G, Pemmaraju N, et al. Ponatinib as first-line treatment for patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase: a phase 2 study. *Lancet Haematol* 2015;2: e376–e83.
44. Strati P, Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S, Konoplev S, Jorgensen JL, et al. HCVAD plus imatinib or dasatinib in lymphoid blastic phase chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2014;120:373–80.
45. Quintas-Cardama A, Han X, Kantarjian H, Cortes J. Tyrosine kinase inhibitor-induced platelet dysfunction in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009;114:261–3.
46. Brave M, Goodman V, Kaminskas E, Farrell A, Timmer W, Pope S, et al. Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. *Clin Cancer Res* 2008;14:352–9.
47. Mazharian A, Ghevaert C, Zhang L, Massberg S, Watson SP. Dasatinib enhances megakaryocyte differentiation but inhibits platelet formation. *Blood* 2011;117:5198–206.
48. Lee HH, Tien SC, Jou TS, Chang YC, Jhong JG, Chang ZF. Src-dependent phosphorylation of ROCK participates in regulation of focal adhesion dynamics. *J Cell Sci* 2010;123:3368–77.
49. Khromov A, Choudhury N, Stevenson AS, Somlyo AV, Eto M. Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca²⁺ sensitization force of smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 2009;284:21569–79.

Clinical Cancer Research

Dasatinib Reversibly Disrupts Endothelial Vascular Integrity by Increasing Non-Muscle Myosin II Contractility in a ROCK-Dependent Manner

Anna Kreutzman, Beatriz Colom-Fernández, Ana Marcos Jiménez, et al.

Clin Cancer Res 2017;23:6697-6707. Published OnlineFirst August 18, 2017.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-16-0667](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0667)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2017/08/18/1078-0432.CCR-16-0667.DC1>

Cited articles This article cites 47 articles, 17 of which you can access for free at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/23/21/6697.full#ref-list-1>

Citing articles This article has been cited by 1 HighWire-hosted articles. Access the articles at:
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/23/21/6697.full#related-urls>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, use this link
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/23/21/6697>.
Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.