



Fundación
Oncohematología
Infantil

PROYECTO SOBRE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

**IDENTIFICACIÓN DE MEDIADORES MOLECULARES DEL MICROAMBIENTE MEDULAR
ASOCIADOS A MAL PRONÓSTICO EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUA.**

Manuel Ramírez Orellana
Servicio de Oncohematología
Hospital Universitario Niño Jesús
Avenida Menéndez Pelayo, 65
28009-Madrid.
Tno: 915035938
Email: manuel.ramirez@salud.madrid.org



Fundación
Oncohematología
Infantil

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil es el cáncer más frecuente en la infancia. Aunque los resultados de los tratamientos actuales consiguen curar al 80% de estos niños, todavía la recaída de la LLA supone la quinta neoplasia más frecuente en la edad pediátrica y una de las más letales. El gran aumento en la tasa de curación de los niños con LLA se debe principalmente al uso de tratamientos dirigidos según el grupo de riesgo del paciente. El criterio para clasificar cada paciente en un grupo de riesgo determinado se basa en la presencia o ausencia de algunos factores biológicos encontrados al diagnóstico (número de células leucémicas, mutaciones de mal pronóstico), y la respuesta a la terapia, esto es, los niveles de enfermedad mínima residual (EMR) en momentos concretos del tratamiento. Los pacientes clasificados como grupo de Riesgo Alto (RA) son tratados de forma más agresiva, reservando protocolos menos agresivos para los pacientes de Riesgo Bajo (RB) o intermedio (RI). El hecho de que hasta un 15% de los pacientes etiquetados como de RB o RI recaen, demuestra que se desconocen aún factores que identifiquen correctamente a todos los casos.

La resistencia a la quimioterapia puede ser intrínseca a los linfoblastos (Holleman et al., 2004; Lugthart et al., 2005; Stam et al., 2010; Zaza et al., 2004), pero también es posible que el ambiente puede minimizar los efectos de los fármacos antileucémicos (Manabe et al, 1992; Iwamoto et al, 2007; Sisón y Brown, 2011). Los blastos leucémicos pueden infiltrarse en áreas donde los niveles de quimioterapias son subóptimas. Además, el ambiente puede proporcionar señales de supervivencia a las células leucémicas. Hay poca información sobre la base molecular de estos procesos. La identificación de moléculas que permiten que las células leucémicas se localicen y sobrevivan en nichos especiales puede ayudar en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para los pacientes en alto riesgo de recaídas.

Las recaídas leucémicas se han vinculado directamente a la supervivencia de los blastos en órganos tales como el sistema nervioso central (SNC) o los testículos (Pinkel 1981; Pui y Howard, 2008; Martínez-Laperche et al, 2013). La existencia de una barrera hematoencefálica (BHE), explica que los niveles de medicamentos antileucémicos en el SNC se vean disminuidos, por lo tanto, la capacidad de los blastos para alojarse tras la BHE, los expondría a niveles subóptimos de drogas, lo que contribuye a la supervivencia y recaídas. Dentro de la médula ósea (MO) existen nichos anatómicos formados por células, moléculas unidas a membrana y/o secretadas, que acomodan a las células madre hematopoyéticas (CMHs) y las células progenitoras linfoides y mieloides comprometidas por separado (Ding y Morrison, 2013). Estos nichos proporcionan las señales que controlan la función de las CMHs (quiescencia, auto-renovación, diferenciación) y regulan su migración y supervivencia (Kiel y Morrison, 2008). Dos son los componentes celulares más importantes para las CMHs: células endoteliales y células mesenquimales (MSCs) (Ding y Morrison, 2013). Estos nichos pueden ser “secuestrados” por los blastos leucémicos,



Fundación
Oncohematología
Infantil

aprovechando de este modo para incrementar su propia supervivencia (Colmone et al., 2008). Estos procesos requieren la expresión de moléculas de adhesión específicas por blastos leucémicos, siendo los receptores de quimioquinas entre las más importantes. Por lo tanto, es posible que las células leucémicas tengan ventajas competitivas contra la quimioterapia si expresan los receptores para las quimioquinas producidas en los nichos de CMHs o en la BHE.

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

Muy relacionado con el papel jugado por el microambiente en la supervivencia de las células leucémicas está su capacidad para conferirles resistencia a la quimioterapia. Así, una línea de estroma de MO humana, HS-5, mejora *in vitro* la supervivencia de células LMA y de blastos LLA y atenúa su muerte inducida por quimioterapia (Panayiotidis et al, 1996; Garrido et al, 2001; Konopleva et al, 2002). Por su parte, MSC aumentan la expresión de moléculas antiapoptóticas y la resistencia a citarabina de células LMA (Konopleva et al, 2002) y a hidrocortisona de células LLA (Ito et al, 1996), y la expresión de Bcl-2 aumentaba significativamente en células leucémicas cuando se cultivaban con estroma proveniente de pacientes resistentes a quimioterapia pero no si los pacientes eran sensibles. Se ha publicado que los nichos de la MO conceden resistencia a las LLA al tratamiento con asparaginasa, droga común en todos los protocolos de tratamiento (Iwamoto et al 2007). A diferencia de las células leucémicas, las MSC expresan altos niveles de asparagina sintetasa, liberando al medio niveles altos de asparagina lo que le da cierto grado de protección a la acción de la asparaginasa.



Fundación
Oncohematología
Infantil

Experiencia previa del grupo de investigación en este tema. Recientemente hemos descrito un papel de las quimiocinas en las recaídas leucémicas (Gómez-García, 2012). Por ejemplo, hemos comprobado en ensayos funcionales que el eje CXCR3/CXCL10 induce quimiotaxis en los blastos de estas LLA, lo cual puede explicar el fenómeno de la infiltración leptomenígea. Además, la señalización por CXCR3 en células LLA produce quimiorresistencia mediante la inducción de la proteína antiapoptótica Bcl2. A la vista de estos resultados, proponemos que el eje CXCR3-CXCL10 es una explicación molecular a los dos conceptos de santuario. Por un lado, sirve para aislar a la LLA del exterior a la BHE, en su vertiente quimiotáctica. Por otro lado, es una molécula producida por el ambiente del SNC, que confiere resistencia a la quimioterapia. De esta manera, una sola molécula, CXCL10, permite que las LLA que expresen niveles altos de CXCR3, se aprovechen del santuario que es el órgano que la produce. Es posible que, además del eje CXCR3/CXCL10, otras quimioquinas estén implicadas en la recaída leucémica en el SNC, porque detectamos sobre-expresión significativa de CCR3, CCR5, CCR7, y casi significativa de CCR6 y CCR8 en las LLA-T, y de CCR3, CCR5 y CCR8 en las LLA-B. De igual modo, hemos encontrado que las recaídas leucémicas en MO se asocian a unos niveles significativamente más elevados de CCR5, CXCR3 y CXCR5 en las LLA-T, y de CCR5 y CCR8 en las LLA-B.

Recientemente hemos publicado los resultados de un trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Zapata en el que hemos podido comprobar cómo las MSCs de la MO de niños con LLA cambian desde el diagnóstico a lo largo del tratamiento, respecto a MSCs controles (Vicente et al, 2014). Estos cambios pueden reflejar un efecto diferente sobre el comportamiento biológico de las células leucémicas.



Fundación
Oncohematología
Infantil

BIBLIOGRAFÍA

Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 2008;332:1861-1865.

Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 2013; 495:231-235.

Garrido SM, Appelbaum FR, Willman CL, et al. *Exp Hematol* 2001; 29: 448-57.

Gómez-García 2012. Estudio de quemoquinas en la Leucemia Linfoblástica Aguda infantil. Papel del eje CXCR3/CXCL10 en la recaída del Sistema Nervioso Central. Tesis Doctoral UAM.

Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, Pei D, Cheng C, Pui CH, Relling MV, Janka-Schaub GE, Pieters R, Evans WE. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med*. 2004;351:533-542.

Ito C, Evans WE, McNinch L, et al. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2370-6.

Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest*. 2007;117:1049-1057.

Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:290-301.

Konopleva M, Konoplev S, Hu W, et al. *Leukemia*. 2002; 16: 1713-24.

Lugthart S, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Holleman A, Cheng C, Pui CH, Relling MV, Janka-Schaub GE, Pieters R, Evans WE. Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2005;7:375-386.

Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D. Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1992;79:2370-2377.

Martínez-Laperche C, Gómez-García AM, Lassaletta A, Moscardó C, Vivanco JL, Molina J, Fuster JL, Couselo JM, de Toledo JS, Bureo E, Madero L, Ramírez M. Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. *Am J Hematol*. 2013;88:359-364.

Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, et al. *Br J Haematol* 1996; 92: 97-103.

Pinkel D. CNS relapse in childhood leukaemia. *Lancet* 1981;2:1115.

Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *Lancet Oncol*. 2008; 9:257-268.

Sison EA, Brown P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. *Expert Rev Hematol*. 2011;4:271-283.



Fundación
Oncohematología
Infantil

Stam RW, Den Boer ML, Schneider P, de Boer J, Hagelstein J, Valsecchi MG, de Lorenzo P, Sallan SE, Brady HJ, Armstrong SA, Pieters R. Association of high-level MCL-1 expression with in vitro and in vivo prednisone resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115:1018-1025.

Vicente A, et al. Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: Correlations with the course of disease. *PLoS One*. 2014;9:e84496.

Zaza G, Yang W, Kager L, Cheok M, Downing J, Pui CH, Cheng C, Relling MV, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia with TEL-AML1 fusion has lower expression of genes involved in purine metabolism and lower de novo purine synthesis. *Blood*. 2004;104:1435-1441.



Fundación
Oncohematología
Infantil

HIPÓTESIS

Los componentes celulares del nicho hematopoyético de la médula ósea pueden favorecer la supervivencia de células de leucemia linfoblástica aguda infantil. En estos procesos son fundamentales las moléculas de adhesión que facilitan el contacto célula a célula entre el ambiente y la hematopoyesis. Además de favorecer la adhesión, pueden tener un efecto pro-supervivencia. El conocimiento de las moléculas implicadas en estos procesos puede identificar nuevas dianas terapéuticas en los casos de LLA de mal pronóstico.

OBJETIVOS

EL objetivo general es identificar los mediadores moleculares de adhesión entre las células del nicho hematopoyético de la MO y las células leucémicas de niños con LLA, que se asocian a mal pronóstico. Para ello contemplamos los siguientes objetivos secundarios:

1. Desarrollar cultivos de células mesenquimales de MO a partir de muestras de niños con LLA, tanto de riesgo estándar como de recaídas leucémicas medulares.
2. Desarrollar cultivos de células endoteliales de MO a partir de muestras de niños con LLA, tanto de riesgo estándar como de recaídas leucémicas medulares.
3. Comparar los perfiles de expresión génica de las células del nicho (recaída versus riesgo estándar) en ambos linajes celulares (MSCs y endoteliales), para identificar diferencias a nivel de moléculas de adhesión.
4. Comprobar el papel de los posibles candidatos identificados en el punto anterior mediante ensayos funcionales.



Fundación
Oncohematología
Infantil

METODOLOGÍA

1.- PACIENTES: Se reclutarán niños diagnosticados de LLA en el Hospital Universitario Niño Jesús siempre con el consiguiente consentimiento informado. En todos los casos se conocerá el inmunofenotipo, el estudio de las translocaciones cromosómicas de las LLAs infantiles (por FISH y por RT-PCR) y el factor de riesgo en función de: número de blastos al diagnóstico, presencia de translocaciones (12;21 / 9;22 / cualquiera del gen mll), respuesta al tratamiento a día +8, y niveles de enfermedad residual en médula ósea los días +36 y +52. Los pacientes se clasificarán como de riesgo alto o bajo. Esta información sobre la estratificación, así como la evolución clínica (recaída y supervivencia) se utilizará a la hora del análisis de correlación clínico-biológica.

2.- MUESTRAS DE PACIENTES: Se obtendrá un aspirado de médula ósea (MO) en dos momentos: al diagnóstico, y a la recaída. Normalmente el 90% de las células obtenidas corresponden a blastos leucémicos. Se realizará separación mediante ficoll. El sobrenadante se congelará en alícuotas de 1 mL, a -80°C, para determinaciones posteriores. Las células mononucleares se distribuirán en alícuotas. Una de ellas se congelará en viabilidad (90% FBS y 10% dimetilsulfóxido, DMSO) y se almacenará en un contenedor de nitrógeno líquido, y las otras se utilizarán para iniciar cultivo de células mesenquimales y cultivo de células endoteliales. La primera alícuota servirá como reservorio de células leucémicas.

3.- CULTIVOS CELULARES: Tanto los cultivos de células mesenquimales como de células endoteliales de MO son cultivos ya descritos en la literatura, de los que el grupo investigador tiene experiencia previa.

4.- ESTUDIOS GENÓMICOS: Una vez generados los cultivos de MSCs y de endoteliales de MO, se obtendrá el RNA de dichos cultivos. Este RNA se utilizará para realizar estudios de secuenciación masiva del transcriptoma, focalizado en genes con un papel conocido en la adhesión-repulsión celular (integrinas, quimioquinas, metaloproteasas, ephrinas, etc). Los resultados de las muestras correspondientes a las recaídas leucémicas se compararán con los de las muestras de riesgo estándar. De estas comparaciones identificaremos genes candidatos de asociarse a mal pronóstico biológico. Estas comparaciones se realizarán entre las células mesenquimales por un lado, y las células endoteliales por otro lado.



Fundación
Oncohematología
Infantil

5.- ESTUDIOS FUNCIONALES: Una vez identificados genes candidatos, se realizarán estudios funcionales para comprobar la significación biológica de cada uno de ellos. Para ello, se realizarán experimentos en los que la expresión de cada gen candidato será aumentada o inhibida en las células mesenquimales o en las endoteliales. Para ello se usarán métodos de transferencia génica, bien vectores para sobre-expresar el gen, bien vectores que codifiquen un RNA de interferencia específico. Con las células así preparadas se realizarán cocultivos con células leucémicas, en presencia o ausencia de drogas quimioterápicas utilizadas en el tratamiento de niños con LLA (Citarabina, Metotrexate). En estos estudios se evaluarán tanto la adhesión como la migración y la respuesta a la quimioterapia.