

**LA INTERLEUQUINA 6 SECRETADA POR LAS CELULAS
ENDOTELIALES INHIBE LA APOPTOSIS “IN VITRO” DE LA
LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA B**

Memoria que presenta para optar al Grado de Doctora en Medicina, Ana María Moreno Cerro. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Servicio de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

Madrid, 1999.

Donde hay un deseo, hay un camino.

Refrán suajili

A mis padres,

AGRADECIMIENTOS

Ni que decir tiene que este trabajo no se hubiese podido realizar sin la ayuda de numerosas personas que han estado a mi lado, cada una de ellas aportando su granito de arena de manera diferente; todas ellas necesarias para mí. Unos me enseñaron el buen hacer, otros el buen pensar, unos me animaron, otros me escucharon, unos me alegraron la vida en el trabajo, otros me alegraron la vida fuera del trabajo... Todos ellos han contribuido a que esta tesis avanzara cada día y se convirtiera en este libro. Separar mi actividad como residente de inmunología de este trabajo de investigación es prácticamente imposible. Ha sido una etapa de mi vida muy intensa, llena de ilusión, nervios, entusiasmo, alegría, desesperación, pasión, decepción, prisas, emoción... Un tiempo que me ha aportado una gran satisfacción personal, y que nunca podré olvidar.

El "alma mater" de este trabajo de investigación ha sido Ernesto Roldán. Desde que le conocí hasta hoy, siempre me ha transmitido el entusiasmo, la inquietud y la perseverancia, imprescindibles para investigar. Además he tenido la suerte de poder disfrutar de su genialidad. Considero un privilegio haber podido compartir cuatro años de mi vida como inmunóloga con alguien que no sólo ha desplegado sus conocimientos y su buen hacer en esta tesis, sino que además, ha desbordado con su cariño y su amistad todas las expectativas que yo tenía al comenzar este trabajo.

Mi carrera como inmunóloga la comencé de la mano de Pedro González-Porqué. Sobre sus espaldas cayó la difícil tarea de enseñarme la magia de las que hasta entonces no habían sido para mí más que elementos arquitectónicos de indudable belleza y funcionalidad: las columnas. Tuve la suerte de tenerle como primer maestro en Inmunquímica. El consiguió hacerme sentir a gusto, a pesar de las bajas temperaturas del cuarto frío. Después de mi rotación, y a pesar de ella, ha continuado ayudándome y enseñándome. A él le debo mi permanencia en Inmunología Celular. Siempre le estaré agradecida por aquella intervención que resolvió un problema vital para mí. Ojalá continúe trabajando en favor de los residentes durante mucho tiempo.

La verdad es que una parte importante de esta tesis se ha llevado a cabo precisamente en Inmunquímica. Por esto, no puedo evitar el recuerdo de las personas que me fui encontrando en este laboratorio, siempre al borde del caos. Allí conocí a Menchu Palacios, gran compañera y amiga, con la que compartí ciencia y

arte; con ella hice mi primer ELISA y eso no se olvida así como así... Tampoco me olvido de mi querido Tino Cespón, de quien aprendí tanto como su paciencia (que es mucha) me permitió; siempre que le he necesitado ha estado dispuesto a echarme una mano. De May Villar tengo que decir que además de contribuir de manera importante en el desarrollo de este trabajo, nos ha servido a Ernesto y a mí de impulso en ciertos momentos difíciles, a base de grandes dosis de optimismo y de humor, elementos fundamentales para no entrar en la desesperación. Aunque ya no está, tampoco me olvido de Antonio Serrano, siempre fue un buen compañero, solidario y divertido como pocos. Gracias a Eva, a Jose y a Sara, que son los que más han colaborado conmigo últimamente en la búsqueda de algo concreto entre el mayor de los desórdenes que yo haya conocido.

En otros laboratorios, como Histocompatibilidad, aunque estuve menos tiempo también lo pasé bien. Jose Luis Castañer me enseñó muchas cosas y las que más me gustaron no tienen nada que ver con el HLA, por fortuna. Pilar Cuadrado fue el enzima que me facilitó la digestión del HLA, y a raíz de esta actividad enzimática surgió una amistad con la que recorrimos muchos kilómetros.

También he tenido la suerte de compartir mi trabajo en Inmunología Celular con dos compañeras estupendas: Rosario Luque y Carmen Cámara. Rosario fue (y siempre lo será) mi R mayor, y como tal me enseñó; ella fue mi guía durante mucho tiempo, hasta que aprendí a desenvolverme. Le agradezco su paciencia y su dedicación. Carmen es otra cosa, ella vive una revolución diariamente. Su vitalidad me ha acompañado de manera muy positiva en los últimos meses. Además, he tenido la fortuna de trabajar en una sección con un ambiente agradable, a veces, incluso un poco folklórica, y con muy buena compañía: Francine, Chus, Eva, Javier Coll y Carmen Quelle, siempre colaboradores. Con ellos el tiempo se me ha pasado volando. Ana del Amo, Ninocha y yo hemos compartido muchos cafés, y eso deja un poso... Hemos disfrutado de muchos momentos con menos ciencia y más humanidad, que les agradezco de corazón. En realidad ellas eran la cafeína cada mañana. ¿Con quien tomaré los cafés de la mañana ahora?. Será difícil conseguir un café con tanta calidad...

A Garbiñe, gracias por enseñarme y por ayudarme siempre que la he necesitado. Y a Pablo, mi inseparable compañero de residencia, por su desbordante buena voluntad y disposición.

A Chelo, a Nena y a Esther Escudero porque, cada una a su manera, me han apoyado en muchas ocasiones.

A Manuela Cuevas, por colaborar conmigo siempre que se lo he pedido.

Al Dr. Bootello, Jefe del Servicio de Inmunología, le agradezco algo muypreciado para mí: la libertad en el trabajo. Además, la última etapa experimental de esta tesis no hubiera sido posible sin su consentimiento, al igual que el del Coordinador de Docencia, Dr. Quereda, y del Director Médico, Dr. Martínez Molina. Gracias a ellos pude continuar trabajando un año más, acabada la residencia. Este año ha sido fundamental para conseguir los objetivos que nos habíamos propuesto. Por eso ellos, a su manera, también me han apoyado.

Al Dr. Javier López, le agradezco su interés y preocupación constante por suministrarnos todas las muestras procedentes de pacientes con LLC-B que ha podido.

A todas las generaciones de secretarias que han pasado por "Inmuno", por su colaboración y simpatía.

Al resto de mis compañeros del Servicio de Inmunología que también han contribuido, aunque sólo sea animándome, a que este trabajo haya podido concluirse.

Y a mi familia y amigos. Ellos han sido mi medio de cultivo, mi estufa y mi oxígeno.

INDICE

Página

1.- INTRODUCCION

1

1. 1. APOPTOSIS

1

1. 1. 1. Modelos experimentales de apoptosis

1

1. 1. 1. 1. Embriogénesis y apoptosis

1

1. 1. 1. 2. Deprivación de citoquinas y/o factores de crecimiento

2

1. 1. 1. 3. Inducción por fármacos y otros estímulos

2

1. 1. 2. Características morfológicas de la célula apoptótica

3

1. 1. 2. 1. Alteraciones en la membrana citoplásmica

3

1. 1. 2. 2. Aparición y/o desaparición de diferentes moléculas de membrana: ingestión de las células apoptóticas por células con capacidad fagocítica

3

1. 1. 2. 3. Alteraciones en el citoplasma y las organelas

5

1. 1. 2. 4. Alteraciones en el citoesqueleto

5

1. 1. 2. 5. Alteraciones nucleares

5

1. 1. 3. Mecanismos bioquímicos y moleculares del proceso apoptótico

5

1. 1. 3. 1. Estímulos que provocan la respuesta apoptótica. Primera fase de la apoptosis

6

1. 1. 3. 1. 1. Factores de crecimiento y citoquinas

6

1. 1. 3. 1. 2. Factores externos. Fármacos

7

1. 1. 3. 1. 3. Otros estímulos

7

1. 1. 3. 2. Detección de la señal apoptótica y trasducción de la señal. Segunda fase de la apoptosis

8

1. 1. 3. 2. 1. Receptores de factores de crecimiento o citoquinas

8

1. 1. 3. 2. 2. Receptores de glucocorticoides

9

1. 1. 3. 2. 3. Otros mediadores de la señal (CD95, ceramida, perforina y p53)

9

1. 1. 3. 3. Moléculas efectoras. Tercera fase de la apoptosis

10

1. 1. 3. 3. 1. Caspasas

10

1. 1. 3. 3. 2. Proteínas de la familia Bcl-2

11

1. 1. 3. 3. 3. Granzimas

12

1. 1. 3. 4. Condensación de la cromatina y degradación del ADN: activación de endonucleasas. Cuarta fase de la apoptosis

12

1. 2. HOMEOSTASIS CELULAR: PROLIFERACIÓN <i>VERSUS</i> APOPTOSIS	13
1. 2. 1. Alteraciones asociadas a aumento de supervivencia celular	13
1. 2. 1. 1. Cáncer	13
1. 2. 1. 2. Enfermedades autoinmunes	14
1. 2. 1. 3. Infecciones virales	14
1. 2. 2. Alteraciones asociadas a exceso de muerte celular	14
1. 2. 2. 1. Virus inductores de depleción de linfocitos. VIH	14
1. 2. 2. 2. Enfermedades neurodegenerativas	15
1. 2. 2. 3. Otros	15
1. 3. APOPTOSIS FISIOLÓGICA DE LOS LINFOCITOS B HUMANOS	15
1. 3. 1. Apoptosis de los linfocitos B de sangre de cordón	15
1. 3. 2. Apoptosis de precursores de linfocitos B en médula ósea	16
1. 3. 3. Apoptosis de los linfocitos B de los centros germinales	16
1. 3. 4. Apoptosis de los linfocitos B de sangre periférica	17
1. 4. APOPTOSIS Y ONCOGENESIS	18
1. 5. BIOLOGÍA DE LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA DE CELULAS B (LLC-B)	18
1. 5. 1. Características fenotípicas de la LLC-B	19
1. 5. 2. Proliferación y diferenciación de la célula tumoral	20
1. 5. 3. Posible origen de la célula de la LLC-B	21
1. 5. 4. Hipogammaglobulinemia en la LLC-B	21
1. 5. 5. Fenómenos autoinmunes en la LLC-B	21
1. 6. APOPTOSIS EN LAS CELULAS TUMORALES DE LA LLC-B Y EN OTRAS LEUCEMIAS / LINFOMAS DE LINFOCITOS B HUMANOS	22
1. 6. 1. Apoptosis de células tumorales en leucemias linfoblásticas agudas (LLAs) de linaje B	22
1. 6. 2. Apoptosis de células tumorales de linfomas no Hodgkin (LNH) de linfocitos B	22
1. 6. 3. Apoptosis de células tumorales en la LLC-B	23
1. 6. 3. 1. Efecto de factores solubles y agentes químicos	23
1. 6. 3. 1. 1. Inductores de apoptosis en la LLC-B	23

	Página
1. 6. 3. 1. 2. Inhibidores de apoptosis en la LLC-B	24
1. 6. 3. 2. Efecto de las interacciones célula-célula: papel jugado por las moléculas de adhesión	26
1. 6. 3. 3. Efecto de las proteínas de la familia Bcl-2	26
1. 6. 3. 4. Papel jugado por las caspasas	28
2.- OBJETIVOS	29
3.- MATERIAL Y METODOS	30
3. 1. MATERIALES	30
3. 1. 1. Citoquinas humanas y anticuerpos neutralizantes anti-citoquinas	31
3. 1. 2. Anticuerpos frente a antígenos de membrana y citoplásmicos	31
3. 2. METODOS	32
3. 2. 1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica	32
3. 2. 2. Obtención de células mononucleares de amígdala	32
3. 2. 3. Purificación de poblaciones celulares	33
3. 2. 3. 1. Purificación de linfocitos B de sangre periférica y amígdala con partículas inmunomagnéticas	33
3. 2. 3. 2. Enriquecimiento de linfocitos B de manto folicular y centro germinal con partículas inmunomagnéticas	33
3. 2. 4. Cultivo de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) y obtención de medio condicionado	33
3. 2. 5. Cultivo de la línea humana de células endoteliales ECV-304 y obtención de medio condicionado	34
3. 2. 6. Cultivos celulares	34
3. 2. 6. 1. Cocultivos en cámaras <i>transwell</i>	34
3. 2. 6. 2. Cultivos con medio condicionado procedente de células endoteliales	35
3. 2. 6. 3. Cultivos con proteínas de matriz extracelular (ME) purificadas	35
3. 2. 6. 4. Cultivos con la ME derivada de las células endoteliales: método de la lisis de la monocapa de las CE con deoxicolato sódico	35
3. 2. 6. 5. Cocultivos con CE's fijadas. Métodos de fijación utilizados	36
3. 2. 7. Bloqueo de las interacciones celulares con anticuerpos anti-moléculas de adhesión	36
3. 2. 8. Neutralización de la actividad del M.Cd de las células endoteliales con anticuerpos anti-citoquinas	36

	Página
3. 2. 9. Métodos para la detección de apoptosis	37
3. 2. 9. 1. Método del marcaje con Anexina-V-FITC/Ioduro de propidio (IP) para citometría de flujo	37
3. 2. 9. 2. Método TUNEL (<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i> : marcaje de los cortes finales con deoxiuridín trifosfato mediado por la transferasa deoxinucleotidil terminal)	37
3. 2. 9. 3. Método para el estudio del pico hipodiploide y del ciclo celular para citometría de flujo	37
3. 2. 9. 4. Electroforesis del ADN en gel de agarosa	37
3. 2. 10. Método para la detección por citometría de flujo (CMF) de la fagocitosis de linfocitos con TAMRA	37
3. 2. 11. Análisis de los antígenos de membrana por citometría de flujo	38
3. 2. 11. 1. Inmunofluorescencia directa	38
3. 2. 11. 2. Detección del receptor de la IL-6 (IL-6R o CD126) con IL-6-biotina	38
3. 2. 12. Análisis de antígenos intracitoplásmicos por citometría de flujo	38
3. 2. 13. Citometría de flujo	38
3. 2. 14. Enzimoimmunoensayo (ELISA) para la cuantificación de IL-6	39
3. 2. 15. Concentración del medio condicionado	39
3. 2. 16. Cromatografía. Filtración sobre gel	39
3. 2. 17. Marcaje metabólico con metionina- ³⁵ S e inmunoprecipitación	40
3. 2. 17. 1. Marcaje metabólico	40
3. 2. 17. 2. Inmunoprecipitación de IL-6	40
3. 2. 18. Electroforesis en SDS-PAGE y autorradiografía	41
3. 2. 19. Análisis estadístico	41
4.- RESULTADOS	42
4. 1. LAS CELULAS ENDOTELIALES INHIBEN LA APOPTOSIS “IN VITRO” DE LAS CELULAS DE LA LLC-B	42
4. 1. 1. Las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) y de la línea de células endoteliales EVC-304 inhiben la apoptosis espontánea <i>in vitro</i> de las células de la LLC-B	42
4. 1. 2. La interacción física entre las células endoteliales y las células de la LLC-B no contribuye significativamente a la supervivencia de la célula tumoral	52

4. 1. 2. 1. Efecto del medio condicionado (M.Cd) y del contacto directo con la célula endotelial en la inhibición de la apoptosis de las células leucémicas	52
4. 1. 2. 2. Anticuerpos anti-moléculas de adhesión no afectan a la inhibición de la muerte celular de las células de la LLC-B	55
4. 1. 2. 3. Proteínas purificadas de matriz extracelular (ME) o procedentes de CE no afectan a la viabilidad de la célula leucémica	57
4. 1. 2. 4. La fijación de la monocapa de las células endoteliales anula el efecto anti-apoptótico de las mismas sobre las células tumorales	59
4. 1. 2. 5. Las células endoteliales fagocitan las células apoptóticas de la LLC-B	60
4. 2. LA SEÑAL MEDIADA POR LA CELULA ENDOTELIAL NO INDUCE PROLIFERACION NI DIFERENCIACION DE LA CELULA TUMORAL	62
4. 3. LA SEÑAL MEDIADA POR EL M.Cd DE LAS CEs ES ESPECIFICA PARA LAS CELULAS DE LA LLC-B	65
4. 3. 1. Efecto sobre los linfocitos de SP de individuos sanos	65
4. 3. 2. Efecto sobre las células B de centro germinal y manto folicular de amígdala	65
4. 3. 3. Efecto sobre otras células B neoplásicas distintas a la de la LLC-B	67
4. 4. CARACTERISTICAS FISICO - QUIMICAS DEL FACTOR SOLUBLE CONTENIDO EN EL MEDIO CONDICIONADO	67
4. 4. 1. Termoestabilidad	67
4. 4. 2. Peso molecular	68
4. 4. 2. 1. La actividad anti-apoptótica es retenida en el concentrado de una membrana de ultrafiltración con un poro de 50 kDa (XM50)	68
4. 4. 2. 2. El factor anti-apoptótico eluye en las fracciones de 40-60 kDa de un S-200	69
4. 5. IL-6 ES EL FACTOR ANTI-APOPTOTICO CONTENIDO EN EL MEDIO CONDICIONADO	72
4. 5. 1. Anticuerpos neutralizantes anti-IL-6 bloquean el efecto anti-apoptótico del medio condicionado	72
4. 5. 2. Las células de la LLC-B expresan el receptor de IL-6 (CD126) en su membrana	74
4. 5. 3. La IL-6 del medio condicionado de la CE tiene un peso molecular de 40-60 kDa	78

	Página
4. 5. 4. Marcaje metabólico e inmunoprecipitación de la IL-6 del medio condicionado	80
4. 5. 5. Comparación del efecto anti-apoptótico de la IL-6 del M.Cd de la célula endotelial y de otra IL-6 natural	81
4. 5. 6. Efecto de diferentes IL-6 recombinantes en la viabilidad de las células leucémicas: correlación con la formación de dímeros	82
4. 6. LAS PROTEINAS Bcl-2 Y Bax DE LA CELULA DE LA LLC-B NO ESTAN IMPLICADAS EN EL EFECTO ANTI-APOPTOTICO DE LA IL-6 PRODUCIDA POR EL ENDOTELIO	85
5.- DISCUSION	87
6.- CONCLUSIONES	108
7.- BIBLIOGRAFIA	111

ABREVIATURAS Y SIGLAS MAS UTILIZADAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

β_2m : β_2 -microglobulina

CAD: caspasa activadora de DNasa

CD: *cluster* de diferenciación

CE: célula endotelial

ced: *cell death abnormal* (genes relacionados con la muerte celular programada, descritos en *C. Elegans*)

C. Elegans: *Caenorhabditis elegans*

CE-Fij: célula endotelial fijada

CEs: células endoteliales

CG: centro germinal

CMF: citometría de flujo

Cont.dir: contacto directo (entre LLC-B/CE)

CSF: factor estimulante de colonias

CTL: linfocito T citotóxico

DMSO: dimetilsulfóxido

DNasa: desoxirribonucleasa

dUTP: deoxiuridín trifosfato

EBV: virus Epstein-Barr

ECV-304: nombre de una línea celular derivada de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano

ELISA: *enzyme linked immunoadsorbent assay* (enzímo inmunoensayo)

FIL-PM10: filtrado de un PM10

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FL-1: detector para fluorescencia verde

FL-2: detector para fluorescencia roja

FN: fibronectina

FN plasma: fibronectina plasmática

FN 30 kDa: fragmento proteolítico de fibronectina de 30 kDa

FN 70 kDa: fragmento proteolítico de fibronectina de 70 kDa

FSC: *Forward Scatter* (tamaño)

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos

HLAs: HLA soluble

HUVEC: células endoteliales de vena umbilical humana

IFN α : interferón alfa

IFN-G=IFN γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

Igs: Ig de superficie

IL: interleuquina

IL-4r: interleuquina 4 recombinante

IL-6r: interleuquina 6 recombinante

IL-6r-CHO: IL-6r derivada de células CHO (células de ovario de hamster)

IL-6r-Lev: IL-6r derivada de levadura

IMF: intensidad media de fluorescencia

IP: yoduro de propidio

IPr: inmunoprecipitado

LES: lupus eritematoso sistémico

lím. máx: límite máximo

lím. mín: límite mínimo

LLA: leucemia linfoblástica aguda

LLC-B: leucemia linfocítica crónica de células B

LNH: linfoma no Hodgkin

LPL-B: leucemia prolinfocítica B

LPS: lipopolisacárido o endotoxina

M.C: medio completo

M.Cd: medio condicionado

M.Cd-1, M.Cd-2, M.Cd-3: medio condicionado extraído en día +1, +2 y +3, respectivamente

ME: matriz extracelular

ME-CE: matriz extracelular de células endoteliales

ME-CE+1, ME-CE+2, ME-CE+3: matriz extracelular extraída de células endoteliales cultivadas durante 1, 2 y 3 días, respectivamente

MF: manto folicular

MM: mieloma múltiple

O.D: densidad óptica

PARP: poli(ADP-ribosa)polimerasa

PBS: tampón salino/fosfato 10 mM

PE: ficoeritrina

PKC: proteín quinasa C

Pm: Peso molecular

PMA (=TPA): *phorbol myristic acid* (un tipo de éster de forbol)

PM10: membrana de ultrafiltración con punto de corte de 10 kDa

PWM: *pokeweed mitogen*

RETE-XM50: retenido de un XM50

RETE-PM10: retenido de un PM10

RG: receptor de glucocorticoides

r.p.m: revoluciones por minuto

SAC: *Staphylococcus aureus* Cowan

S-200: sephacryl S-200

SN: sobrenadante

SP: sangre periférica

SSC: *Side Scatter* (granularidad)

STF: suero de ternera fetal

TAMRA: 5 & 6 carboxitetrametilrodamina, succinimidil éster

TβR: receptor de TGFβ

TdT: *terminal deoxynucleotidyl transferase* (deoxinucleotidil transferasa teminal)

TGFβ: factor transformante del crecimiento tipo beta

TNF: factor de necrosis tumoral

TNFR: receptor de TNF

TUNEL: *TdT-mediated dUTP nick end labeling* (marcaje de los cortes finales con dUTP mediado por la deoxinucleotidil transferasa terminal)

XM50: membrana de ultrafiltración con un punto de corte de 50 kDa

1X, 3X, 10X, 20X, 30X: número de veces que está concentrada una muestra; 1, 3, 10, 20 o 30 veces.

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION

1. 1. APOPTOSIS

Se han descrito dos formas de muerte celular en animales vertebrados: necrosis y apoptosis. La necrosis se refiere a los cambios morfológicos que se producen en células sometidas a una injuria severa y repentina, como isquemia, hipertermia importante o un trauma físico o químico. En la necrosis hay cambios muy precoces en la forma y función de la membrana mitocondrial, y la célula rápidamente es incapaz de mantener su homeostasis. La membrana plasmática sufre una lesión grave que impide regular la presión osmótica y la célula se lisa. El contenido celular se vierte en los tejidos que rodean a la célula, lo que provoca una respuesta inflamatoria¹.

El término apoptosis fue utilizado por primera vez por Kerr y col. en 1972² para describir los cambios morfológicos sucesivos que se producen en la muerte celular programada, considerada ésta como un proceso de "suicidio" ya que la célula participa activamente en su autodestrucción, y que incluyen encogimiento celular y fragmentación nuclear. Otra característica de la muerte celular por apoptosis es que las células apoptóticas son rápidamente eliminadas por fagocitos, evitando posibles efectos nocivos sobre los tejidos vivos que rodean la célula apoptótica³.

La apoptosis o muerte celular programada es muy importante en procesos como la embriogénesis, morfogénesis y en la regulación del recambio normal celular en organismos multicelulares.

1. 1. 1. Modelos experimentales de apoptosis

1. 1. 1. 1. Embriogénesis y apoptosis

La apoptosis es un elemento fundamental para la morfogénesis de los diferentes sistemas de todos los organismos⁴. El nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ha resultado ser un modelo experimental excelente para observar los estadios de muerte celular programada durante el desarrollo. En mutantes en los cuales la muerte celular es anómala, se han podido conocer los genes relacionados con la apoptosis. Estos genes, llamados *ced* (*cell death abnormal*), se han constituido en una excelente herramienta para el conocimiento de la apoptosis en el desarrollo embrionario. Otro modelo experimental ampliamente estudiado ha sido el desarrollo del SNC en el ratón, donde se conocen algunos genes reguladores de la apoptosis durante la

embriogénesis del encéfalo, y sus mutaciones dan lugar a morfogénesis anómala^{5, 6}. Numerosas anomalías congénitas en humanos podrían ser debidas a alteraciones de la muerte celular programada durante el desarrollo embrionario⁷.

1. 1. 1. 2. Deprivación de citoquinas y/o factores de crecimiento

Una forma importante de inducir apoptosis es la deprivación de factores de crecimiento. Por ejemplo, en tejidos hormono-dependientes se induce apoptosis y, como consecuencia atrofia tisular, en ausencia de ciertas hormonas. Así, en el endometrio este efecto sucede por déficit de progesterona, en la próstata por déficit de testosterona y en la corteza adrenal por deprivación de ACTH^{3, 8}. También se ha demostrado la inducción de apoptosis en células hematopoyéticas cuando se cultivan en ausencia de ciertos factores necesarios para su supervivencia. Esto se ha comprobado en linfocitos normales, en leucemias linfoides y en líneas celulares. Por ejemplo, se ha demostrado que IL-10 inhibe apoptosis en células B esplénicas⁹; IL-2 es una citoquina de la que dependen células T efectoras y líneas celulares T¹⁰; las células precursoras hematopoyéticas mueren por apoptosis en ausencia de CSF (factor estimulante de colonias)¹¹; la eritropoyetina previene la apoptosis de células progenitoras eritroides¹²; los monocitos mueren rápidamente en cultivos sin IL-1 β , TNF o GM-CSF¹³; IL-6 inhibe apoptosis en células de mieloma múltiple¹⁴⁻¹⁶; y también hay líneas murinas IL-3 dependientes derivadas de progenitores linfoides o mieloides que mueren en ausencia de esta citoquina¹⁷.

1. 1. 1. 3. Inducción por fármacos y otros estímulos

También se induce apoptosis por diversos estímulos exógenos. Por ejemplo, exposición celular a altas temperaturas¹⁸, así como por radiaciones ionizantes y ultravioleta¹⁹, y una amplia variedad de fármacos. La citotoxicidad de los fármacos empleados en el tratamiento del cáncer está generalmente mediada por mecanismos de acción que inducen apoptosis^{20, 21}. La familia de fármacos inductores de apoptosis más ampliamente estudiada, sobre todo en timocitos, es la de los glucocorticoides²²⁻²⁵ que actúan activando las endonucleasas, enzimas que cortan la cromatina nuclear en fragmentos oligonucleosomales²⁵. Se ha demostrado la inducción de apoptosis por fármacos que reaccionan con el ADN como cisplatino, clorambucil, melfalán y carmustina o BCNU; por fármacos antimetabolitos como el metrotexate y por agentes específicos de fase como araC y taxol^{20, 21}.

Otras formas de inducción de apoptosis en timocitos es el tratamiento con anti-CD3, con CD95

ligando (CD95L/FasL) y con ionóforo del calcio A23187²⁶⁻²⁹, y en células B de linfomas no Hodgkin (LNH) por activación de la inmunoglobulina de superficie³⁰.

1. 1. 2. Características morfológicas de la célula apoptótica

En la muerte celular por apoptosis se producen una serie de cambios morfológicos característicos. Inicialmente, se reduce el volumen celular por pérdida de agua e iones, y hay un aumento de densidad celular. Sin embargo, las membranas celulares, incluidas la envuelta nuclear y las membranas mitocondriales, permanecen intactas. Por esto, la célula permanece impermeable a los colorantes vitales como el azul tripán y el yoduro de propidio hasta los últimos estadios del proceso apoptótico. En el núcleo suceden cambios muy marcados: hay condensación de la cromatina, que se separa de la envuelta nuclear y, por último, se forman densos micronúcleos rodeados de membrana. Al mismo tiempo, la membrana citoplasmática se irregulariza y el núcleo sufre fragmentación. Finalmente, la célula se desintegra en cuerpos apoptóticos, que son rápidamente fagocitados por los macrófagos tisulares (motivo por el cual el número de células apoptóticas en los tejidos es muy bajo). Los fagocitos reconocen moléculas de superficie específicas expresadas solo en células apoptóticas. La integridad de la membrana se mantiene, de modo que las células muertas son rápidamente eliminadas sin que haya liberación de contenido intracelular ni, como consecuencia, reacción inflamatoria^{2, 3}.

1. 1. 2. 1. Alteraciones en la membrana citoplásmica

La membrana plasmática en la célula apoptótica se irregulariza, se encrespa, se observa como si se formaran burbujas en su superficie. Este fenómeno se ha llamado zeiosis. A pesar de este cambio en la membrana, ésta sigue manteniendo su gradiente osmótico; no hay liberación de contenido intracelular y no se provoca inflamación¹.

1. 1. 2. 2. Aparición y/o desaparición de diferentes moléculas de membrana: ingestión de las células apoptóticas por células con capacidad fagocítica

El reconocimiento e ingestión de células apoptóticas por fagocitos locales permite la eliminación de dichas células, lo que evita la lesión de células vecinas y la respuesta inflamatoria. Este aspecto ha sido especialmente estudiado en el desarrollo del ojo en la *Drosophila*, donde miles de células mueren por apoptosis y son fagocitadas sin afectar la arquitectura del órgano³¹.

Los macrófagos son los fagocitos profesionales que eliminan las células apoptóticas, pero hay

otros tipos celulares que pueden participar en este proceso, entre otros, células endoteliales y fibroblastos³²⁻³⁵. En mamíferos, las células con capacidad fagocítica pueden expresar más de un mecanismo de reconocimiento de células apoptóticas al mismo tiempo. Hasta el momento han sido descritas cuatro formas principales de receptores en la superficie de los fagocitos que están implicados en el reconocimiento de células apoptóticas: 1) receptor tipo lectina, 2) receptores de trombospondina, 3) receptor de fosfatidilserina y 4) CD14.

Se cree que, como consecuencia de la apoptosis, las células sufren una pérdida de ácidos siálicos y otros cambios en los carbohidratos de su superficie que pueden ser específicos para el reconocimiento por parte de un receptor tipo lectina en los fagocitos aún no caracterizado³⁶. Los receptores de trombospondina descritos en el reconocimiento de las células apoptóticas son el receptor de vitronectina (integrina $\alpha_v\beta_3$) y el CD36. La integrina $\alpha_v\beta_3$ es una estructura del macrófago implicada en el reconocimiento de linfocitos apoptóticos de sangre periférica³⁷ y timocitos apoptóticos³⁸; pero también se ha descrito en el reconocimiento de neutrófilos por fagocitos semiprofesionales como los fibroblastos³⁵. CD36 se ha implicado en el reconocimiento de eosinófilos y linfocitos apoptóticos por parte de los macrófagos³⁹. La trombospondina sería sintetizada y secretada por los macrófagos y crearía un puente entre la célula apoptótica y la superficie del macrófago a través de $\alpha_v\beta_3$ y CD36⁴⁰.

El otro mecanismo de reconocimiento está relacionado con los profundos cambios que se producen en la estructura de la superficie celular, concretamente de sus fosfolípidos. La membrana plasmática está constituida por una bicapa lipídica, que predominantemente contiene fosfolípidos neutros (esfingomielina y fosfatidilcolina) y aniónicos (fosfatidilserina) que, en condiciones normales están restringidos a la capa interna de la membrana plasmática. En las células apoptóticas se produce una translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana que los macrófagos reconocen a través de receptores específicos, lo que da lugar a una señal de fagocitosis⁴¹. La expresión de fosfatidilserina en la superficie de células apoptóticas se ha detectado en diversos tipos celulares incluidos linfocitos y neutrófilos humanos^{38, 42}, si bien el receptor para fosfatidilserina aun no ha sido bien caracterizado.

También se ha demostrado que CD14, una glicoproteína anclada a la membrana por fosfatidilinositol, existente en la membrana plasmática de los macrófagos, media el reconocimiento y la fagocitosis de células apoptóticas⁴³, aunque todavía no se conoce qué estructura(s) reconoce

en la superficie de la célula apoptótica.

1. 1. 2. 3. Alteraciones en el citoplasma y las organelas

Las células apoptóticas muestran en microscopía electrónica un citoplasma muy condensado, con organelas de apariencia normal. No se han descrito lesiones específicas en organelas citoplásmicas. Se ha detectado un aumento de tamaño de las cisternas del retículo endoplásmico y posterior fusión de las más superficiales a la membrana plasmática³⁶. A nivel bioquímico, la célula rápidamente disminuye su síntesis de ARN y proteínas, y ambos son degradados; pero estos cambios no han sido bien caracterizados a nivel morfológico¹. En la mitocondria se ha detectado una caída del potencial de transmembrana y un incremento en la producción de iones superóxido, si bien estas alteraciones tampoco parecen modificar la morfología de esta organela^{42, 44}.

1. 1. 2. 4. Alteraciones en el citoesqueleto

Se han descrito ejemplos en los que un desbarajuste del citoesqueleto parece encabezar el proceso de apoptosis. Así, los filamentos de citoqueratina se agregan en los primeros estadios de la apoptosis, degradándose en las fases finales; y, en el modelo clásico de apoptosis inducido previa activación celular, la escisión proteolítica de la proteína fodrina parece protagonizar parte de los cambios morfológicos característicos de este tipo de muerte celular^{45, 46}.

1. 1. 2. 5. Alteraciones nucleares

El núcleo es el lugar donde suceden los cambios más dramáticos en la muerte celular por apoptosis. Aunque el patrón puede variar de una célula a otra, en general el núcleo se encoge y su cromatina se hace muy densa, rompiéndose en áreas, con forma de media luna en estrecha proximidad con la membrana nuclear. Finalmente, el núcleo se convierte en varias esferas densas en el interior de la célula. Este cambio se acompaña de la fragmentación de ADN en subunidades regulares en escalera (objetivable en la electroforesis en geles de agarosa para ADN), que es el resultado de cortes fortuitos del ADN de doble cadena en zonas de unión internucleosomales. Puede haber un millón de estos cortes en cada célula, una situación que ya no puede ser reparada y en sí misma obliga al cese de la transcripción. En escasos sistemas celulares se han observado formas de corte de una sola cadena de ADN^{1, 32}.

1. 1. 3. Mecanismos bioquímicos y moleculares del proceso apoptótico

La muerte celular fisiológica sucede cuando una célula dentro de un organismo muere por un

mecanismo organizado en el que intervienen proteínas codificadas por el genoma del huésped. El propósito de este proceso es eliminar las células no necesarias, lo que sucede en tres situaciones: a) desarrollo y homeostasis, b) defensa del organismo y c) envejecimiento.

El proceso de muerte celular fisiológica puede dividirse en cuatro fases: 1) La primera fase se refiere al estímulo que provoca la respuesta apoptótica. Puede ser una señal externa transmitida a través de los receptores de membrana o puede originarse dentro de la célula. 2) La segunda fase incluye la detección de la señal o del estado metabólico apoptótico y la trasducción de la señal. Este mensaje es enviado hasta la maquinaria efectora de muerte celular. 3) La tercera fase es la efectora de los mecanismos de muerte celular. Incluye las proteasas que son activadas durante la apoptosis, así como sus reguladores positivos y negativos. 4) Por último, en la cuarta fase o fase *postmortem*, la cromatina nuclear se condensa y su ADN es degradado. *In vivo*, pero no necesariamente *in vitro*, las células muertas son reconocidas y fagocitadas por otras células⁴⁷.

1. 1. 3. 1. Estímulos que provocan la respuesta apoptótica. Primera fase de la apoptosis

Los estímulos que pueden desencadenar muerte por apoptosis son diversos e incluyen: ausencia o presencia de ciertos factores de crecimiento y citoquinas, entre los que destacan el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y el factor de crecimiento tumoral beta ($TGF\beta$); fármacos, irradiación y apoptosis mediada por linfocitos T citotóxicos (CTLs).

1. 1. 3. 1. 1. Factores de crecimiento y citoquinas

$TNF\alpha$ es una proteína de 17kD producida predominantemente por macrófagos activados y linfocitos. La unión de $TNF\alpha$ a su receptor específico es imprescindible para que éste de lugar a un efecto citotóxico. Una vez que $TNF\alpha$ se une a su receptor, es internalizado y posteriormente degradado, aunque la internalización no es necesaria para que ejerza sus efectos biológicos, lo que significa que el receptor de $TNF\alpha$ puede transducir la señal. El efecto de $TNF\alpha$ en la muerte celular puede objetivarse morfológicamente como necrosis o bien como apoptosis, con fragmentación de ADN⁴⁸.

$TNF\alpha$ puede inducir apoptosis en diversos tipos celulares como células T maduras y linfoblastos T^{49, 50}.

Se han descrito 3 isoformas de $TGF\beta$ ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$). Son proteínas que regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis en muchos tipos celulares. Es producido por macrófagos activados,

linfocitos T y B y plaquetas, entre otras células. TGF β induce apoptosis en células normales y neoplásicas como timocitos⁵¹, célula B normal (incluidos linfocitos B en reposo), líneas celulares de linfoma B y leucemia linfoblástica de linaje B⁵²⁻⁵⁵, leucemia mieloide aguda⁵⁶, células epiteliales ováricas normales y en carcinoma ovárico⁵⁷, hepatocitos y hepatoma^{58, 59} y en carcinoma gástrico⁶⁰ entre otros. Algunos tipos celulares, sin embargo, son resistentes a la apoptosis inducida por TGF β , como es el caso de la leucemia linfocítica crónica B⁵⁴.

1. 1. 3. 1. 2. Factores externos. Fármacos.

Se ha demostrado en diversos sistemas experimentales, así como en neoplasias humanas, la inducción de apoptosis por múltiples agentes quimioterápicos: AraC, bleomicina, clorambucil, cisplatino, ciclofosfamida, etopósido, fludarabina, hidroxiurea, mostaza nitrogenada, taxol, vincristina, etc. Hay experimentos en los que se ha observado la inducción de apoptosis vía Fas por varios quimioterápicos en algunos tipos celulares⁶¹. Se cree que algunos fármacos como cisplatino, melfalán y taxol, capaces de aumentar la liberación de TNF α por células del sistema inmune, podrían inducir apoptosis a través de TNF-R1 (receptor de TNF tipo 1)⁶²⁻⁶⁴. La unión del ligando a TNF-R1 y a Fas da lugar a la activación de esfingomielinasas, y a ceramida como segundo mensajero de la señal de apoptosis. Se ha comprobado un incremento muy rápido de ceramida intracelular en apoptosis inducida por TNF⁶⁵ y agentes quimioterápicos⁶⁶. También se ha observado que agentes quimioterápicos dan lugar a la expresión de genes asociados a muerte celular programada como c-jun y c-fos en varias líneas tumorales⁶⁷⁻⁶⁹, así como a la activación de caspasas⁷⁰ y endonucleasas⁷¹.

La capacidad de los glucocorticoides para inducir apoptosis en células de origen linfoide es utilizada como base del tratamiento de numerosas neoplasias hematológicas. Sin embargo, en algunas leucemias linfoblásticas y en ciertos linfomas existen resistencias al tratamiento, que son debidas a la baja expresión de receptores de glucocorticoides⁷². También se conoce que el tratamiento con glucocorticoides, a través de la activación de sus receptores específicos, causa degradación internucleosomal de ADN en los linfocitos neoplásicos⁷³.

1. 1. 3. 1. 3. Otros estímulos

Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) tienen capacidad para producir muerte celular en sus células diana mediante necrosis (explicada en el punto 1.1.3.2.3) o apoptosis. La principal defensa contra los virus en animales vertebrados la constituyen los CTLs, los cuales pueden reconocer

e inducir apoptosis de células infectadas por virus^{74, 75}. Los CTLs expresan CD95L, lo que permite a estas células inducir apoptosis en las células diana que expresen en su superficie CD95⁷⁶. Además, los CTLs están cargados de gránulos que pueden liberar sus enzimas sobre sus células diana⁴⁷ (explicado en el punto 1.1.3.3.3).

La inducción de apoptosis también se puede llevar a cabo a través de CD95 con anticuerpos anti-Fas^{77, 78}, por las radiaciones ionizantes y ultravioleta^{79, 80} y también se ha descrito inducción de apoptosis por fibronectina en líneas de células hematopoyéticas a través de su interacción con VLA-5 (CD49e)⁸¹.

1. 1. 3. 2. Detección de la señal apoptótica y trasducción de la señal. Segunda fase de la apoptosis.

La activación o la fase de señalización de la muerte celular incluye una gran variedad de vías de trasducción de señal, unas procedentes del exterior de la célula y otras originadas dentro de la misma. Estas vías incluyen tirosín-quinasas, receptores de esteroides, ceramida, fosfatos de inositol y receptores de citoquinas⁴⁷.

1. 1. 3. 2. 1. Receptores de factores de crecimiento o citoquinas

Existen receptores para TNF α en células sensibles a su efecto, pero también en células que son resistentes⁴⁸. Hay dos tipos de receptores: p55 o TNF-R1 y p75 o TNF-R2. Varias proteínas que interaccionan con dominios citoplásmicos de CD95 y de los receptores de TNF están implicadas como intermediarias en la señalización de apoptosis. Estas proteínas son Mort1/FADD, RIP y TRADD, y contienen *dominios de muerte* homólogos a los *dominios de muerte* de CD95 y de TNF-R1⁸²⁻⁸⁶. La unión del TNF al receptor TNF-R2 también puede inducir apoptosis, aunque este receptor no tiene *dominio de muerte*^{49, 87, 88}. En este caso la trasducción de la señal se lleva a cabo a través de la asociación del dominio citoplásmico de TNF-R2 con factores denominados TRAF1 y TRAF2, los cuales son necesarios para la activación del factor de transcripción NF- κ B por TNF-R2^{89, 90}.

Existen receptores específicos para TGF β , denominados receptor para TGF β tipo I (T β R-I), II (T β R-II) y III (T β R-III o betaglicano), los cuales son ampliamente expresados en muchos tipos celulares⁹¹. Estos receptores tienen un dominio extracelular rico en cisteínas y un solo dominio transmembrana serin/treonin-quinasa, cuya fosforilación inicia la trasducción de la señal⁹².

1. 1. 3. 2. 2. Receptores de glucocorticoides

El receptor de glucocorticoides (RG) es un miembro de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas/tiroideas, que son factores de transcripción intracelulares regulados por su ligando⁹³. En ausencia de hormonas, el RG es un heterodímero que reside en el citoplasma. La unión con su ligando da lugar a un cambio conformacional, al que se denomina activación o transformación, que va seguido de la translocación del complejo hormona-receptor al núcleo, el cual se une a secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a glucocorticoides, los cuales inducen o reprimen los genes de respuesta a glucocorticoides. En la inducción de apoptosis por glucocorticoides, además, se sabe que el RG es un factor de transcripción que funciona, en parte, cambiando la estructura de la cromatina, haciendo que ésta sea más sensible a las endonucleasas. También se cree que los cortes internucleosomales pueden ser debidos a alteraciones importantes en la organización molecular del ADN secundarias a la unión del RG^{94, 95}.

1. 1. 3. 2. 3. Otros mediadores de la señal (CD95, ceramida, perforina y p53)

Fas/APO-1/CD95 es una glicoproteína de 40-50 kD perteneciente a la superfamilia de receptores del TNF que se expresa en la superficie de células normales y malignas. Se expresa en bajos niveles en células T y B en reposo, y se incrementa su expresión en linfocitos normales tras su activación. La unión con su ligando (CD95L) da lugar a una señal de activación de la apoptosis en células T, B y NK. Hay estudios que indican que la vía de señalización puede ser la misma que la del receptor de TNF^{96, 97}.

La hidrólisis de esfingomielina y la generación de ceramida se ha implicado en la trasducción de señal en la muerte celular programada de diversos tipos celulares, y actúa como segundo mensajero⁹⁸. La ceramida ha sido implicada en la muerte inducida a través de CD95 y TNF-R, aunque también por sí sola puede provocar apoptosis en varios tipos celulares⁹⁸⁻¹⁰¹, si bien el papel exacto de ceramida aún no se conoce^{102, 103}.

Los CTLs pueden provocar una muerte celular por necrosis causada por la liberación de perforina de sus gránulos, formando poros en la membrana plasmática de la célula diana, lo que conduce a la lisis celular¹⁰⁴. La apoptosis es inducida por dos mecanismos diferentes: 1) Vía apoptótica mediada por FasL (mencionada en 1.1.3.1.3) y 2) Vía apoptótica mediada por perforina y granzimas^{105, 106}. La perforina es una proteína existente en los gránulos de los CTLs

capaz de formar un poro en la membrana plasmática que facilita la entrada de varias serín-proteasas, especialmente la granzima B, dentro de la célula diana (más información en punto 1.1.3.3.3)¹⁰⁷.

La proteína p53 es codificada por el gen supresor de tumor p53. La característica funcional de esta proteína es su capacidad de suprimir el crecimiento de células tumorales, ya que cuando el ADN celular sufre una lesión, p53 actúa bien deteniendo el ciclo celular en fase G₁, bien induciendo apoptosis. La detención del ciclo impide la entrada de la célula en fase S, evitando la replicación del ADN hasta que éste no haya sido reparado. Por otra parte, la inducción de apoptosis por p53 en células con lesiones en el ADN, impide la propagación permanente de células con alteraciones genómicas que pueden incrementar la susceptibilidad a una transformación maligna. El descenso de p53 puede contribuir a la generación de tumores y puede ser la causa de fenotipos tumorales resistentes a quimioterápicos, ya que dichos tumores no poseen el mecanismo que elimina células dañadas en su ADN por fármacos¹⁰⁸.

1. 1. 3. 3. Moléculas efectoras. Tercera fase de la apoptosis

Muchas de estas moléculas han sido descritas primero en *C. elegans*. Los elementos efectores más conocidos de esta fase son las caspasas y los granzimas. También hay numerosos estudios sobre Bcl-2 y proteínas de su familia como reguladoras de esta fase de la apoptosis

1. 1. 3. 3. 1. Caspasas

Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas que cortan proteínas específicamente después de residuos aspartato. En el *C. elegans*, la cisteín-proteasa Ced-3 es esencial para que se active la muerte celular programada^{109, 110}. Hasta ahora se han descrito diez caspasas numeradas desde la caspasa 1 hasta la caspasa 10. En humanos, al menos siete de estas caspasas están implicadas en una de las dos vías de señalización en las que pueden participar: 1) activación de citoquinas proinflamatorias y 2) muerte por apoptosis¹¹¹. Los genes ced codifican cisteín-proteasas que, inicialmente, son sintetizadas en forma de precursores inactivos. Para ser activos, en situación de apoptosis, estos precursores deben ser cortados a nivel de residuos aspartato y deben formarse heterotetrámeros. La cisteína activa está situada en medio del motivo común conservado en todas estas proteasas QACRG. Las mutaciones de esta cisteína inactivan la caspasa. Se cree que estas enzimas pueden activarse a sí mismas o actuar en forma de cascada⁴⁷. Se ha descrito que las caspasas juegan un papel importante en la apoptosis. Algunas

de estas proteasas pueden romper e inactivar la poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP)¹¹², un enzima que participa en la reparación del ADN y mantenimiento del genoma¹¹³. Aunque no está claro el significado de la proteólisis de PARP durante la apoptosis, se ha usado esta característica como marcador de activación de las caspasas y apoptosis en varios modelos experimentales^{70, 114, 115}. La caspasa 1 (ICE) no corta directamente PARP, pero sí lo hace indirectamente por activación de la caspasa 3¹¹⁶, y no es esencial para el desarrollo de muerte celular, ya que no se requiere para la muerte causada por radiación, corticosteroides o privación de factores de crecimiento, la cual puede ser eficientemente antagonizada por Bcl-2. Parece que diferentes estímulos inductores de apoptosis pueden activar distintas cisteín-proteasas^{117, 118}.

Aún no se sabe qué es lo que inicia la cascada de cisteín-proteasas. En *C. elegans* Ced-4 es necesario para la activación de Ced-3¹⁰⁹. Sin embargo, aún no se conoce el homólogo de Ced-4 en mamíferos¹¹⁹. Lo que sí está claro es que las células en mamíferos expresan varias proteasas de muerte celular, aunque la célula no esté en apoptosis; y que las proteasas pueden ser activadas sin necesidad de síntesis *de novo*¹²⁰.

1. 1. 3. 3. 2. Proteínas de la familia Bcl-2

El primer gen que mostró su implicación específica en el proceso de muerte celular fisiológica fue *bcl-2*¹²¹. Bcl-2 es una proteína integral de membrana que se encuentra en la cara interna de la membrana mitocondrial, en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear¹²²⁻¹²⁴. La proteína Bcl-2 puede inhibir la apoptosis de muchos tipos celulares e inducida por muy distintos agentes. Son ejemplos de este efecto: a) Bcl-2 protege a timocitos inmaduros CD4⁺CD8⁺ de los glucocorticoides, la irradiación y la apoptosis inducida por anti-CD3¹²⁵; b) la modulación de la expresión de Bcl-2 es un determinante en la vida y la muerte de linfocitos normales¹²⁶; c) en linfoblastos B humanos infectados con virus Epstein-Barr (EBV) que son muy resistentes a diversos tipos de *stress*, incluyendo calor, etano, metotrexate y ausencia de suero, los niveles de Bcl-2 son muy elevados¹²⁷.

Ced-9 es estructural y funcionalmente muy parecido a su gen homólogo en mamíferos *bcl-2*¹²⁸. En mamíferos hay otros cinco genes con estructura similar a *bcl-2*: A1, cuya función aún se desconoce¹²⁹; Mcl-1, que actúa como Bcl-2, protegiendo a la célula de apoptosis^{130, 131}; Bax, Bak y Bad, que antagonizan la protección de Bcl-2 (y Bcl-x_L)¹³²⁻¹³⁶. Otro gen, *bcl-x*, codifica

dos proteínas: una más larga, llamada Bcl-x_L, que inhibe la apoptosis; y otra más corta, Bcl-x_S, que antagoniza la función protectora de Bcl-2 y Bcl-x_L¹³⁷. Los miembros de la familia Bcl-2 conservan motivos compartidos que permiten la formación de homo y heterodímeros^{132, 138, 139}. Bcl-2 requiere para su actividad la formación de heterodímeros con la proteína Bax¹³². Así, el equilibrio en la formación de heterodímeros de Bcl-2:Bax (suprime apoptosis) y de homodímeros Bax:Bax (activa apoptosis) juega un papel fundamental en la regulación molecular de la apoptosis¹³⁹. Si bien el mecanismo de aumento de la supervivencia en las células debido a Bcl-2 aún se desconoce^{140, 141} se ha propuesto que el efecto antiapoptótico de Bcl-2 se debe a una actividad antioxidante, relacionada con la mitocondria^{142, 143} y, también se ha sugerido que Bcl-2 inhibe la apoptosis por interferencia en el flujo de calcio sobre el retículo endoplásmico¹⁴⁴. Bcl-x_L es, bajo ciertas circunstancias, un protector de apoptosis más potente que Bcl-2 y su actividad no es inhibida por Bax, sino que, posiblemente esté relacionada con Bak^{145, 146}.

1. 1. 3. 3. 3. Granzimas

Las granzimas son serín-proteasas que se encuentran almacenadas en los gránulos especializados de los CTLs y de las células NK. Estas enzimas están claramente implicadas en la inducción de apoptosis por CTLs, ya que una mutación introducida en el locus de una de ellas, por ejemplo, la granzima B, provoca un severo defecto en la inducción de apoptosis en las células diana^{147, 148}. Hay numerosos trabajos demostrando que el sustrato de las granzimas son diversas caspasas^{107, 149-154}. Por tanto, y en definitiva, la actividad de los granzimas en la apoptosis viene mediada por la activación de cisteín-proteasas.

Parece que Bcl-2 es capaz de bloquear la apoptosis vía perforina-granzimas y la apoptosis vía FasL inducidas por CTLs¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

1. 1. 3. 4. Condensación de la cromatina y degradación del ADN: activación de endonucleasas. Cuarta fase de la apoptosis.

Durante el proceso de apoptosis hay una serie de cambios morfológicos sucesivos en el núcleo. Primero hay una condensación de la cromatina en áreas con forma de media luna en la periferia nuclear, se produce desintegración nucleolar y reducción del tamaño del núcleo. Después, los fragmentos de ADN quedan rodeados por citoplasma y membrana plasmática, constituyendo los cuerpos apoptóticos. Por último, si no hay fagocitosis, se produce una desintegración progresiva de las estructuras nucleares y citoplásmicas residuales¹⁵⁸. La fragmentación del ADN

es el resultado de la actividad endonucleasa endógena. La más conocida es la endonucleasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dependiente que ha sido detectada en linfocitos humanos, y comprobada su actividad en la degradación de ADN característica de apoptosis¹⁵⁹: esta enzima es capaz de cortar la cromatina en puntos internucleosomales¹⁶⁰ y, por lo tanto dar lugar al típico patrón en escalera de degradación de ADN en geles de agarosa.

También se ha descrito actividad endonucleasa en el proceso de apoptosis por parte de otras enzimas, la DNasa tipo I¹⁶¹ y la DNasa tipo II¹⁶². Por otra parte, recientemente se ha descubierto otra DNasa implicada en la degradación de ADN, cuya actividad está inducida por la caspasa 3. Esta DNasa se ha denominado CAD (*caspase-activated DNase*). Se sabe que CAD se encuentra inactiva formando un complejo con otra proteína llamada ICAD (inhibidora de CAD) en la célula viva. Las caspasas activadas por señales de apoptosis rompen el complejo CAD-ICAD y liberan CAD, dando lugar a la degradación de ADN por parte de la DNasa CAD^{163, 164}.

1. 2. HOMEOSTASIS CELULAR: PROLIFERACION VERSUS APOPTOSIS

En cada tipo celular, el control del número de células está determinado por el balance entre proliferación y muerte celular. En ausencia de una compensación en la proliferación, los cambios en la velocidad de muerte celular pueden dar lugar a acumulación (si la velocidad está disminuida) o a depleción (si la velocidad está aumentada) celular. La proliferación celular está regulada por múltiples elementos, entre los que se incluyen factores de crecimiento y proto-oncogenes como reguladores positivos de la progresión del ciclo celular y genes que actúan como supresores controlando negativamente la proliferación.

El defecto en la muerte celular programada puede dar lugar a enfermedades como cáncer, enfermedad autoinmune o infección viral; y el exceso de apoptosis puede explicar la patogenia de enfermedades neurodegenerativas, SIDA, ciertas enfermedades hematológicas y osteoporosis¹⁶⁵.

1. 2. 1. Alteraciones asociadas a aumento de supervivencia celular

1. 2. 1. 1. Cáncer

Este trastorno de la supervivencia celular está especialmente analizado en el punto 1.4. Apoptosis y Oncogénesis.

1. 2. 1. 2. Enfermedades autoinmunes

La regulación fisiológica de la muerte celular es esencial para eliminar los linfocitos potencialmente autorreactivos durante el desarrollo. En modelos animales ya se ha demostrado la importancia de la disregulación de la apoptosis en la etiología de enfermedades autoinmunes. Un ejemplo es la generación de lupus eritematoso en ratón debido a alteraciones en la apoptosis mediadas por defecto de Fas o de FasL¹⁶⁶. Actualmente se está investigando también el papel de la apoptosis en artritis reumatoide, psoriasis, diabetes mellitus autoinmune, y otras enfermedades autoinmunes humanas.

1. 2. 1. 3. Infecciones virales

El suicidio de la célula infectada es un mecanismo que utiliza ésta para prevenir la propagación viral. Además, los CTLs utilizan dos diferentes vías que conducen a la muerte de las células infectadas por virus: 1) por reconocimiento y muerte de células que presentan péptidos virales en asociación con moléculas de MHC clase I en la superficie celular, y 2) por inducción de apoptosis endógena en las células diana (infectadas por virus), activando el receptor de Fas en su superficie, o por introducción de proteasas tales como granzima B, que activan la muerte celular programada desde el citoplasma^{47, 76}.

Algunos virus, sin embargo, han desarrollado mecanismos que impiden la regulación normal de la apoptosis en la célula infectada. Por ejemplo, en la infección por adenovirus, la proteína E1B 19-kD bloquea la apoptosis directamente; el gen que codifica a esta proteína es muy similar a bcl-2. Genes parecidos también existen en virus Epstein-Barr (EBV) y de la fiebre porcina africana. El EBV, además puede producir una infección latente en células B por medio del gen viral LMP-1 capaz de regular específicamente de forma positiva la expresión de Bcl-2 de la célula infectada. Los pox virus inhiben apoptosis por producción de un inhibidor de la caspasa-1¹⁶⁵.

1. 2. 2. Alteraciones asociadas a exceso de muerte celular

1. 2. 2. 1. Virus inductores de depleción de linfocitos. VIH

El desarrollo de SIDA se correlaciona con la depleción de células T CD4⁺, la célula diana del virus. CD4 actúa como receptor, facilitando la entrada del VIH. La estimulación del receptor CD4 tras su unión con la gp120 soluble (glicoproteína del virus) da lugar al desarrollo de apoptosis en células T no infectadas¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Sin embargo, una de las grandes paradojas de la

infección por el VIH es que una elevada proporción de células $CD4^+$ que mueren por apoptosis durante la infección no están infectadas por el virus. Esta aparente contradicción ha tratado de ser explicada por el hallazgo de una elevada expresión del antígeno CD95 en los linfocitos de los enfermos infectados por VIH con respecto a individuos sanos. Además, dicho antígeno parece ser funcional, lo que se ha relacionado con la depleción continuada de los linfocitos en esta enfermedad¹⁷⁰.

1. 2. 2. 2. Enfermedades neurodegenerativas

Algunos ejemplos de enfermedad neurodegenerativa en la que se ha podido demostrar un descenso del número de células debido a un incremento de la apoptosis son: la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) hereditaria, la retinitis pigmentaria y la enfermedad de Alzheimer.

En la ELA hereditaria existe una mutación en el gen que codifica la cobre-zinc superóxido dismutasa. Este defecto da lugar a la acumulación de radicales libres en la célula, induciendo la apoptosis^{171, 172}.

La degeneración retiniana en la retinitis pigmentaria es debida a apoptosis secundaria a la acumulación de una proteína mutante (rodopsina) o a la alteración funcional de dicha proteína¹⁷³.

En la enfermedad de Alzheimer el amiloide β induce apoptosis de las neuronas¹⁷⁴.

1. 2. 2. 3. Otros

Ciertas patologías hematológicas como síndromes mielodisplásicos y algunas formas de anemia aplásica, que se caracterizan por descenso en la producción de células hemáticas, se han asociado a incremento de apoptosis celular en la médula ósea¹⁷⁵.

También a nivel del sistema músculo-esquelético se han podido observar aspectos morfológicos muy sugestivos de apoptosis en osteoporosis y en artritis degenerativa¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

1. 3. APOPTOSIS FISIOLÓGICA DE LOS LINFOCITOS B HUMANOS

La apoptosis o muerte celular programada es la vía fisiológica por la que se eliminan la mayoría de las células, incluidos los linfocitos B normales¹⁷⁹.

1. 3. 1. Apoptosis de los linfocitos B de sangre de cordón

En la sangre de cordón hay células B, de las cuales aproximadamente la mitad son $CD5^+$. En el estudio de la supervivencia de las células B de cordón umbilical (totales: $CD5^+$ y $CD5^-$) de Lagneaux y col., se ha observado una muerte celular *in vitro* bastante rápida (31 % células

mueras a las 48 h), y no inhibible en cocultivo con células de estroma de médula ósea. Dicha muerte no solo no se redujo, sino que incluso aumentó cuando estas células se cultivaron con medio condicionado producido por las células de estroma¹⁸⁰.

La célula B CD5⁺ de sangre de cordón umbilical representa un tipo celular normal (no neoplásico) fenotípicamente muy parecido al de la LLC-B. Hasta el momento se sabe, en relación a la muerte por apoptosis de estas células, que no expresan transcritos de Bcl-2¹⁸¹.

1. 3. 2. Apoptosis de precursores de linfocitos B en médula ósea

Se conoce poco sobre la apoptosis de células precursoras B de médula ósea en humanos. Sin embargo, este aspecto se ha estudiado algo más en ratón.

Para el estudio de la supervivencia de células pro-B de ratón se han empleado cocultivos de estas células con células de estroma. Con este modelo experimental se ha llegado a ciertas conclusiones sobre la apoptosis en células pro-B de médula ósea: 1) Las células de estroma tienen un papel importante en el mantenimiento de la supervivencia. 2) IL-7, citoquina producida por las células de estroma, constituye una señal de proliferación muy importante. 3) La transcripción de Bcl-2 cesa rápidamente cuando las células pro-B son extraídas del microambiente estromal, coincidiendo con un cese de la proliferación celular y un incremento de la mortalidad. 4) Hay un aumento de la expresión de Bax cuando las células son retiradas del cocultivo¹⁸².

Hay trabajos que muestran el papel de Bcl-2 en los diferentes estadios de la linfopoyesis B. En ratones transgénicos para Bcl-2 hay un elevado número de células pre-B y éstas sobreviven por largos periodos de tiempo *in vitro*¹⁸³.

En células B inmaduras normales de médula ósea humanas se ha observado que los niveles de Bcl-2 son bajos; y que mueren rápidamente a pesar de la presencia de células de estroma medular¹⁸⁴.

En realidad, para el estudio de precursores B en humanos se ha utilizado como modelo de célula principalmente la célula B de la leucemia linfoblástica de linaje B (Ver punto 1.6.1).

1. 3. 3. Apoptosis de los linfocitos B de los centros germinales

Las células B de amígdala se dividen fenotípicamente, morfológicamente y funcionalmente en dos poblaciones: células de centro germinal (CG) y manto folicular (MF). Cuando estas células son cultivadas a 37°C existe una gran diferencia en sus cinéticas de muerte celular. Las células B

de CG mueren mucho más rápidamente que las de MF (a las 40 h. de cultivo no quedan células de CG viables y, sin embargo, el 50% de las células MF permanecen vivas, incluso a las 96 h. el 20-30% continúan viables)¹⁸⁵.

Los centros germinales son el lugar donde se lleva a cabo el proceso de selección positiva de la célula B. Concretamente la célula B de CG puede servir como modelo de célula no neoplásica con muerte rápida. Existen numerosos estudios sobre la muerte celular programada en células B de CG. Se han descrito inductores e inhibidores de apoptosis, así como se ha comprobado que ciertas citoquinas influyen en la capacidad de supervivencia de las células de CG. Son inductores de apoptosis los glucocorticoides e ionóforos de calcio¹⁸⁶. La IL-10 inhibe apoptosis⁹. También los anticuerpos anti-CD40 y/o anti-Ig inhiben la apoptosis de la célula B de CG¹⁸⁵.

También se ha estudiado extensamente la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en estas células^{9, 181, 185, 187, 188}, y se ha observado que las células B de CG no expresan proteína Bcl-2^{9,181}; al contrario que las células B de MF, que sí la expresan^{9, 181}. En cuanto a la existencia de ARNm de Bcl-2 en células de CG hay discrepancia en los resultados, algunos autores no lo detectan^{181, 189} y otros sí¹⁹⁰.

Las células B de CG expresan CD11a/CD18 (LFA-1) y CD49d (VLA-4), dos integrinas en las cuales se ha investigado un posible papel en la apoptosis de estas células. Para ello se han realizado estudios en los que se ha comprobado la repercusión en la muerte celular de estas moléculas con sus ligandos respectivos, CD54 (ICAM-1) y CD106 (VCAM-1), dos moléculas de adhesión expresadas en notable cantidad por las células dendríticas foliculares. Se ha sugerido que la unión CD11a/CD18-CD54 y la unión CD49d-CD106 pueden inhibir la apoptosis de células B de CG, por lo que estas moléculas de adhesión podrían estar implicadas en la selección de células B¹⁹¹.

1. 3. 4. Apoptosis de los linfocitos B de sangre periférica

Las células B humanas normales de sangre periférica mueren *in vitro* por apoptosis⁵³. La velocidad de muerte es mucho más lenta que en la célula B de CG; aproximadamente hay un 23% de mortalidad a las 48 h. de cultivo. Se ha descrito que IL-13 e IL-4 (los receptores para IL-4 e IL-13 tienen una subunidad común¹⁹²) inhiben apoptosis en célula B normal de SP, y CD40L tiene un efecto sinérgico con ambas citoquinas y no está acompañado de proliferación

celular. También inhiben la apoptosis anticuerpos anti-IgMs y TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; =PMA). Son inductores de apoptosis cAMP (AMP cíclico) y TGF β . Estas células expresan proteína Bcl-2 en su mayoría y ésta no se modifica cuando se cultivan con inductores o inhibidores de apoptosis^{54, 193}.

1. 4. APOPTOSIS Y ONCOGENESIS

La muerte celular programada es un mecanismo celular activo con un importante papel en la regulación del número de células. La supervivencia celular aberrante contribuye a la oncogénesis. El conocimiento de las condiciones que puedan inducir o inhibir apoptosis en un tipo celular en concreto puede sugerir formas de eliminación artificial de células tumorales induciendo la muerte celular.

Un ejemplo clásico de neoplasia por incremento de la supervivencia celular son los tumores en los que se ha detectado sobreexpresión de Bcl-2, donde existe una clara evidencia de que esta expresión aberrantemente incrementada puede contribuir a la oncogénesis¹²¹. En el caso del linfoma folicular generalmente (en un 80-90% de los casos) es debido a la translocación t(14;18)^{194, 195}.

Hay tumores con expresión deficitaria de p53. P53 es necesaria para iniciar la apoptosis en respuesta a lesiones del ADN; por eso, las células deficientes en p53, aunque tengan lesiones en su ADN no entran en apoptosis y, los tumores con esta característica, son resistentes a los agentes quimioterápicos y a las radiaciones. Además, los errores en la reparación del ADN dan lugar a mutaciones con facilidad¹⁹⁶.

1. 5. BIOLOGIA DE LA LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA DE CELULAS B (LLC-B)

La LLC-B es la forma de leucemia del adulto más frecuente en países occidentales. Es una neoplasia de linfocitos B maduros en reposo. Las células de la LLC-B, que se asemejan morfológicamente a linfocitos pequeños, maduros, de la sangre periférica, se acumulan en médula ósea, sangre periférica, ganglios linfáticos y bazo en grandes cantidades. La enfermedad suele observarse en pacientes mayores de 50 años. Hay una clasificación internacional de los estadios de la enfermedad que integra las clasificaciones de Binet (A, B y C) y de Rai (0, I, II, III y IV). Estadio A.- Linfocitosis con afectación clínica de menos de tres grupos ganglionares (Grupos de ganglios linfáticos: cervical, axilar, inguinal, hepático,

esplénico), sin anemia ni trombocitopenia; (0) sin ganglios aumentados de tamaño; (I) ganglios aumentados de tamaño; (II) hepatomegalia o esplenomegalia. Estadio B.- Afectados más de tres grupos ganglionares. Sin anemia ni trombocitopenia; (I) ganglios aumentados de tamaño; (II) hepatomegalia o esplenomegalia. Estadio C.- Anemia o trombocitopenia, con independencia del número de grupos ganglionares afectados; (III) anemia; (IV) trombocitopenia¹⁹⁷.

1. 5. 1. Características fenotípicas de la LLC-B

La LLC-B es un síndrome linfoproliferativo crónico de células B CD5⁺. Expresa antígenos pan-B como CD19, CD20, CD22, CD24, CD40 y DR. Presenta antígenos de célula B en reposo como la inmunoglobulina de superficie (Igs). La mayoría de las LLC-B son IgMs⁺ o coexpresan IgMs e IgDs. La Igs expresada por la LLC-B es de una densidad bastante más baja que la de la célula B normal de sangre periférica o de tejido linfoide; y es también de menor densidad que la expresada en otras leucemias y linfomas. La clonalidad puede demostrarse por la expresión de una sola cadena ligera en la Igs. Característicamente, la intensidad de fluorescencia de la Igs, por citometría de flujo, es débil. En cuanto a la expresión de moléculas de adhesión, la LLC-B, como las células normales, tiene ausencia o una baja expresión de LFA-1 (CD11a/CD18). En contraste con células B normales, LLC-B suele expresar CD11c (asociado no covalentemente con CD18). Al igual que las células B normales de sangre periférica, LLC-B expresa CD44 (receptor de *homing* linfocitario). La ausencia de LFA-1 y la expresión de CD44 puede explicar, en parte, la capacidad de la célula de la LLC-B para recircular y diseminarse ampliamente. La mayoría de las LLC-Bs expresan CD21, que es el receptor de C3d (C3dR) y del virus Epstein-Barr. No suele expresar antígenos de célula pre-B como CD10 o CD34. La expresión de antígenos de activación B (CD25, CD54, CD77 o CD80) es variable. FMC7, que suele ser positivo en leucemia prolinfocítica B y en tricoleucemia, es casi siempre negativo en LLC-B. Según las series, CD23 es positivo hasta en un 60% de las LLC-B. Aunque el antígeno CD5 es propio de células T maduras, su presencia es característica de la célula B de LLC-B. Se ha demostrado que células B normales esplénicas pueden expresar CD5 y CD23 tras estímulo con PMA (*phorbol myristic acid*; =TPA); lo que indica que la activación de la proteína-quinasa C (PKC) induce la expresión en la célula B normal de un fenotipo similar al de la LLC-B^{198, 199}.

1. 5. 2. Proliferación y diferenciación de la célula tumoral

Las células de la LLC-B son activadas en general con mayor dificultad que las células B normales. Se ha descrito diferenciación (secreción de IgM monoclonal) tras estimulación con *Staphylococcus aureus* (SAC)+*pokeweed* (PWM); la estimulación con uno sólo de estos mitógenos puede no ser suficiente para la secreción de Ig²⁰⁰. También se ha demostrado diferenciación con ésteres de forbol, como PMA²⁰¹⁻²⁰⁴, en ausencia de proliferación²⁰⁵. Además existe sinergismo entre el ionóforo del calcio A23187 y PMA en la proliferación y diferenciación de la célula B de la LLC-B, aunque el ionóforo sólo no activa las células²⁰³.

Las únicas citoquinas descritas hasta el momento capaces de inducir proliferación son IL-2 e IL-15. Estas dos interleuquinas tienen, en general, efectos biológicos muy parecidos; ambas utilizan las cadenas β y γ del receptor de IL-2 (IL-2R). La IL-15 induce proliferación en las células de la LLC-B (a través de IL-2R) y no en células B normales en reposo²⁰⁶.

TNF α es capaz de inducir proliferación de la LLC-B solamente en combinación con bajas concentraciones de PMA. Esta inducción es completamente inhibida por IL-6. Por otra parte IL-4 induce diferenciación en combinación con PMA. Tanto IL-6 como TNF α no inducen diferenciación^{207, 208}.

También se ha valorado la capacidad de incrementar la expresión de CD23 en la célula de la LLC-B por parte de algunas citoquinas, lo que puede estar relacionado con la activación celular. Se ha observado que IFN α , IFN γ , TNF α e IL-2 aumentan la expresión de CD23, mientras que IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, GM-CSF, CSF, TGF β y linfoxina no modifican su expresión²⁰⁹.

En la interpretación de estos resultados sobre proliferación y diferenciación hay un elemento a tener muy en cuenta: la actividad apoptótica, antiapoptótica, o la ausencia de regulación de apoptosis por parte de las citoquinas y/o mitógenos. Por ejemplo, la presencia en los cultivos de PMA, la cual inhibe la apoptosis de la célula de la LLC-B (punto 1.6.3.1.2), da lugar a resultados muy distintos en la estimulación con citoquinas a los que se obtienen en cultivos en ausencia de PMA.

1. 5. 3. Posible origen de la célula de la LLC-B

Algunos autores han estimado que la célula B de la LLC-B podría corresponder a una expansión de un clon de célula B inmadura detenida en un estadio comprendido entre la célula

pre-B y B madura, basados en la presencia de CD5 en estadios precoces de la ontogenia B, ya que la coexpresión de antígenos B y CD5 se detecta en ganglios linfáticos fetales, bazo fetal y sangre de cordón umbilical, aunque no en médula ósea ni en hígado fetales^{210, 211}.

Alternativamente, se ha postulado que la célula B CD5⁺ de la LLC-B podría ser la contrapartida tumoral de la población B CD5⁺ normal²¹². Las células B CD5⁺ son escasas en el adulto. Se ha identificado un número escaso en la periferia del centro germinal de ganglios linfáticos normales²¹³, en sangre periférica y en amígdala, pero no en médula ósea²¹⁴. También se ha detectado un incremento de esta población en sangre periférica en pacientes tratados con trasplante alogénico o autólogo de médula ósea²¹⁵⁻²¹⁷, y en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (LES)²¹⁸.

Otros autores consideran que la LLC-B tiene características fenotípicas de célula B de memoria de la zona de manto de los folículos secundarios de ganglio linfático¹⁸¹, incluso se ha sugerido que la contrapartida normal de las células de la LLC-B podría ser una subpoblación B de larga vida media recirculante de manto folicular²¹⁹.

1. 5. 4. Hipogammaglobulinemia en la LLC-B

La hipogammaglobulinemia sucede en el 10-60% de LLC-B según la series. Los pacientes con LLC-B tienen una respuesta humoral deficitaria a la infección e inmunización. La hipogammaglobulinemia es un fenómeno poco frecuente en otras neoplasias de célula B. Se considera que la causa de este déficit puede estar ocasionada por una disfunción de las células B no clonales, por descenso o inhibición de dichas células B CD5 negativas²²⁰.

1. 5. 5. Fenómenos autoinmunes en la LLC-B

Las manifestaciones de tipo autoinmune son relativamente frecuentes en LLC-B y, en general, son debidas a anticuerpos frente a células hematopoyéticas. La anemia hemolítica autoinmune sucede en un 10-25% de los pacientes a lo largo del curso de la enfermedad. La trombocitopenia autoinmune sucede en un 2% de los casos, aunque con cierta frecuencia existe trombocitosis. La aplasia eritroide y los anticuerpos antineutrófilo son poco frecuentes. En la mayoría de los casos los autoanticuerpos de la LLC-B no son secretados por el clon maligno, por lo que parece que los fenómenos autoinmunes son debidos a las células B CD5⁻ normales, al igual que la hipogammaglobulinemia¹⁹⁹.

1. 6. APOPTOSIS EN LAS CELULAS TUMORALES DE LA LLC-B Y EN OTRAS LEUCEMIAS/LINFOMAS DE LINFOCITOS B HUMANOS

1. 6. 1. Apoptosis de células tumorales en leucemias linfoblásticas agudas (LLAs) de linaje B

En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre la muerte por apoptosis en la LLA de linaje B. Se ha encontrado una mayor supervivencia de las células B inmaduras leucémicas que en las equivalentes normales (célula B inmadura normal de médula ósea) en idénticas condiciones de cultivo *in vitro*¹⁸⁴. También se ha observado que las células B de la LLA, sobreviven mucho más tiempo en presencia de células de estroma medular que en su ausencia, y esta peculiaridad se ha empleado para el estudio de inducción de apoptosis *in vitro* por diferentes fármacos y citoquinas²²¹⁻²²⁵ para posibles aplicaciones terapéuticas y pronósticas de la enfermedad. Se ha comprobado que las células leucémicas no se diferencian y mantienen sus características inmunofenotípicas y genéticas a lo largo del cultivo con células de estroma²²². Algunos autores consideran que las LLAs de linaje B que sobreviven durante más tiempo en cocultivo con células de estroma son más agresivas²²⁵.

En general, la expresión de CD95 en las células de la LLA de linaje B es baja y la inducción de apoptosis a través de CD95 es escasa en general, aunque se puede incrementar si las células son previamente activadas con CD40 ligando (CD40L)^{96, 226}. La expresión de Bcl-2 en este tipo de leucemia no se relaciona con aspectos clínicos de la enfermedad, a pesar de que es mayor que en los progenitores de células B normales. Bcl-2 tampoco se relaciona con resistencias a fármacos. Además, en los pocos casos descritos en la literatura de LLA con cromosoma Philadelphia (aspecto considerado de alto riesgo) los niveles de Bcl-2 son muy bajos²²⁷.

1. 6. 2. Apoptosis de células tumorales de linfomas no Hodgkin (LNH) de linfocitos B

La investigación de la apoptosis en LNH se ha enfocado sobre todo, hasta el momento, al estudio de moléculas relacionadas con apoptosis, y hay pocos trabajos sobre función celular. Así, hay multitud de publicaciones sobre proteínas de la familia de Bcl-2 y también hay algún trabajo sobre expresión e inducción de Fas *in vitro*.

Se ha descrito que los linfomas localizados y los de bajo grado expresan menos Bcl-2 que los linfomas diseminados y los de alto grado²²⁸. Sin embargo, en los linfomas foliculares, muchos de los cuales presentan la translocación t(14;18) que induce una expresión muy elevada de

Bcl-2, la existencia o no de dicha translocación no parece influir en la supervivencia de los pacientes. La cantidad de Bcl-2 expresada tampoco parece ser un factor significativamente importante en la evolución de la enfermedad²²⁹. La mayoría de los LNH expresan Bcl-2 en niveles altos y Fas en niveles bajos. Además, las células B de los LNH son poco sensibles a la muerte inducida por FasL. Se consigue una expresión mucho más alta de Fas cuando las células son activadas con CD40L y, así, tras esta activación, la mayoría de los LNH parecen sensibles a la acción inductora de apoptosis de CD95L⁹⁶.

1. 6. 3. Apoptosis de células tumorales en la LLC-B

Las células de la LLC-B característicamente no están en división, ya que en el análisis del ciclo celular tras su extracción de sangre periférica se observa un porcentaje de células en fase S y G₂+M similar al de los linfocitos B normales, permaneciendo más del 95 % de las células están en fase G₀/G₁^{205, 230, 231}. Este es el motivo por el que se considera que el exceso clonal es debido al descenso de la muerte celular y no a la proliferación²³², es decir, que en la LLC-B existe una acumulación de células B monoclonales de larga vida media²³³ en fase G₀/G₁.

Se ha comprobado que las células B de la LLC-B mueren *in vitro* rápidamente por apoptosis^{230,234}. Existe una marcada heterogeneidad en la velocidad de muerte celular programada de las células de la LLC-B *in vitro* en los diferentes pacientes^{54, 235, 236}.

No hay diferencias en la incidencia de apoptosis en cultivos de LLC-B deplecionados o no deplecionados de células T. Tampoco hay diferencias en la supervivencia cuando las células se cultivan con suero autólogo o con suero procedente de humanos sanos. La densidad celular no influye en la apoptosis *in vitro* de las células de LLC-B (comprobado en 0,5-2x10⁶ células/ml)²³⁰.

1. 6. 3. 1. Efecto de factores solubles y agentes químicos

1. 6. 3. 1. 1. Inductores de apoptosis en la LLC-B

Los glucocorticoides¹⁸⁶ y otros agentes quimioterápicos usados clínicamente como clorambucil²³⁷, 2-cloro-2'-deoxiadenosina^{237, 238} y fludarabina^{239, 240} inducen apoptosis en la LLC-B, lo que sugiere que la apoptosis es un mecanismo de su acción terapéutica. *In vitro*, los anticuerpos anti-IgMs, los ionóforos del calcio¹⁸⁶ y la actinomicina-D²³⁵ inducen apoptosis. También se han descrito citoquinas inductoras de apoptosis en las células de la LLC-B *in vitro* como IL-5²⁴¹ e IL-10²⁴².

Hay numerosos estudios en LLC-B basados en la experiencia previa de otro modelo experimental: la muerte celular programada en timocitos. Así, los glucocorticoides y el ionóforo del calcio A23187 inducen apoptosis en timocitos inmaduros^{23-25, 27-29}, y también en las células B de la LLC-B¹⁸⁶. Otra forma de inducción de apoptosis clásica en timocitos es el tratamiento con anti-CD3²⁸ por lo que se investigó la analogía existente en la LLC-B encontrándose inducción de apoptosis secundaria al tratamiento con anti-IgM¹⁸⁶, ya que la célula tumoral de la LLC-B expresa en su membrana IgM²⁴³. Hay evidencias de que estos tres mecanismos de inducción de apoptosis se relacionan con el incremento de los niveles de calcio en el citosol de las células de LLC-B y de que los núcleos de estas células tienen una importante actividad endonucleasa endógena calcio-dependiente¹⁸⁶. Por otra parte, la fragmentación de ADN se incrementa con actinomicina-D, un inhibidor de la síntesis de ARN²³⁵.

Se han detectado algunas citoquinas con efecto inductor de apoptosis en la LLC-B. Por ejemplo, IL-5 incrementa la apoptosis espontánea de la LLC-B *in vitro*. IL-4 protege de esta muerte inducida por IL-5^{241, 244}. Por otra parte, existen resultados contradictorios con relación a la actividad apoptótica de la IL-10 sobre la LLC-B. Un grupo de investigación concluye que la IL-10 induce muerte por apoptosis en las células B de la LLC-B y descenso en los niveles de Bcl-2²⁴² y, en otro trabajo se refiere que IL-10 inhibe la proliferación, induce la diferenciación y no provoca apoptosis en la LLC-B; además, como IFN α e IFN γ (citoquinas que, como IL-10 pertenecen a la familia de receptores de IFN), IL-10 reduce significativamente la muerte por apoptosis inducida por hidrocortisona²⁴⁵. Por otro lado, en este segundo estudio no detectan diferencias en la expresión de Bcl-2 entre células tratadas y no tratadas con IL-10.

1. 6. 3. 1. 2. Inhibidores de apoptosis en la LLC-B

Los ésteres de forbol, PMA y PDBu (*phorbol-12,13-dibutyrate*) bloquean la fragmentación de ADN y la muerte celular programada espontánea o inducida por fármacos en la LLC-B²³⁵, lo que sugiere que la activación de la proteína-quinasa-C (PKC) desensibiliza a las células tumorales para entrar en apoptosis^{186, 246}. La apoptosis espontánea o inducida por drogas (colchicina o etoposido) puede ser bloqueada en presencia de inhibidores de endonucleasas como el ácido aurintricarboxílico, lo que indica el papel fundamental de las endonucleasas en la muerte por apoptosis en la LLC-B. La cicloheximida no impide el efecto antiapoptótico de PMA, lo que indica que la acción de los ésteres de forbol no requiere síntesis de proteínas²⁴⁶.

Ciertas citoquinas previenen la apoptosis *in vitro* de la LLC-B: IFN α ²⁴⁷⁻²⁵⁰, IFN γ ²⁵¹, IL-4^{54, 235, 244, 252}, IL-6²⁵³, IL-8²⁵⁴ e IL-13²⁵⁵.

La muerte celular y fragmentación de ADN se inhibe en presencia de IL-4 recombinante humana (0,5-5 ng/ml) y las células B monoclonales pueden mantenerse en cultivo durante 3 semanas. Esta inhibición de la apoptosis no estimula la proliferación celular y es comparable al efecto mediado por PMA²³⁵. Sin embargo, hay diferencias importantes entre los efectos de IL-4 y PMA: PMA activa la protein-quinasa C e induce cambios morfológicos en la LLC-B²⁰³, mientras que IL-4 activa una tirosín-fosfatasa específica y no induce cambios morfológicos²⁵⁶. Las células de la LLC-B expresan constitutivamente *in vitro* el gen de IL-6 y producen IL-6 en ausencia de estímulos exógenos²⁵⁷. Sin embargo, hay discrepancias sobre el efecto de IL-6 sobre la muerte celular programada en la LLC-B: unos trabajos indican que IL-6 no inhibe la apoptosis espontánea o la inducida por hidrocortisona^{251, 252} y en otro estudio describen reducción de la apoptosis²⁵³.

IL-8 prolonga la supervivencia de las células B de la LLC-B. La concentración de IL-8 capaz de conseguir este efecto es comparable con los niveles liberados constitutivamente por las células de la LLC-B, indicando que la acción protectora se consigue a concentraciones fisiológicas. Los autores de este estudio consideran que la potencial acción reguladora autocrina de IL-8 es apoyada por la evidencia de que la IL-8 exógena incrementa la expresión de ARNm de IL-8 en las células de LLC-B²⁵⁴. Por otra parte, los niveles circulantes de IL-8 son significativamente más elevados en LLC-Bs no tratadas que en individuos normales; y no existen evidencias de producción de IL-8 por células B normales²⁵⁸.

Como ya se ha mencionado, IL-13 es una citoquina que desarrolla efectos muy parecidos a la IL-4 en la célula B normal¹⁹². Su actividad anti-apoptótica sobre la célula B de la LLC-B es controvertida: Fluckiger y col.¹⁹² no detectan efecto, mientras que Chaouchi y col. sí describen un efecto promotor de supervivencia²⁵⁵. En este segundo estudio comprueban que el efecto de IL-13 e IL-4 son independientes, y que IL-13 no es un factor de crecimiento para las células monoclonales de LLC-B. Este efecto antiapoptótico de IL-13 es dosis-dependiente aunque a concentraciones 10-20 veces (100-200 ng/ml) superiores a las de IL-4.

1. 6. 3. 2. Efecto de las interacciones célula-célula: papel jugado por las moléculas de adhesión

Se ha estudiado la posible influencia de otros tipos celulares sobre la supervivencia de las células de la LLC-B. Está descrito un aumento de la supervivencia en cocultivos con células de estroma de médula ósea^{180, 259}, en ausencia de factores exógenos, encontrándose un retraso de la muerte celular muy superior en los cocultivos que en cultivos en medio solo, incluso a los 30 días de cultivo. La separación de las células de la LLC-B de las células de estroma mediante filtros de cultivo de 0,45 μm de poro resultan en una menor protección de la apoptosis, por lo que se considera que la adhesión de células de LLC-B a células de estroma de médula ósea es importante para la protección de la apoptosis. Las células de estroma son capaces de proteger las células B de la LLC-B del efecto inductor de apoptosis de la hidrocortisona²⁵⁹. Además, parece que los factores solubles producidos por las células de estroma, en ausencia de contacto entre la célula B de la LLC-B y la célula de estroma, inducen apoptosis¹⁸⁰ aunque dichos factores no han sido identificados. Por otra parte, los resultados obtenidos en células B de CG sobre la implicación de moléculas de adhesión en la inhibición de la apoptosis, ha llevado a investigar esto mismo en la célula B de la LLC-B. Hasta ahora se ha visto que el bloqueo de la unión CD11a/CD18 con su ligando (CD54), junto con el bloqueo de CD49d con CD106, reduce la adhesión de las células de la LLC-B a las células del estroma; pero aún no hay resultados sobre la repercusión de este bloqueo sobre la muerte por apoptosis en la LLC-B¹⁸⁰.

También se ha observado que el cocultivo de células de LLC-B con células endoteliales (línea celular híbrida de células endoteliales de vena umbilical humana EA.hy926) retrasa la apoptosis, y se considera que el contacto celular es necesario para conseguir este efecto ya que, el medio condicionado de las células endoteliales no previene la apoptosis²⁶⁰.

1. 6. 3. 3. Efecto de las proteínas de la familia Bcl-2

Es conocido que el producto del proto-oncogen bcl-2 inhibe la muerte celular inducida por diversos estímulos apoptóticos, en numerosos tipos celulares²⁶¹. La expresión de Bcl-2 está mayoritariamente restringida a las células linfoides. Bcl-2 inhibe la muerte celular programada en la LLC-B²⁶²; incluso se ha sugerido que la expresión del gen bcl-2 puede ser una vía de escape principal de la apoptosis de la LLC-B²⁶³ junto con la débil expresión de Fas^{264, 265}.

Además es difícil aumentar la expresión de Fas y, aún así, no se consigue aumentar la muerte inducida por FasL o anticuerpos anti-Fas⁹⁶. Por otra parte, solo el 10% de las LLC-Bs tienen la translocación del gen de bcl-2 en el loci para la Ig, concretamente en la cadena ligera²⁶⁶, a diferencia del 80-90% de translocaciones t (14;18) encontradas en el linfoma de fenotipo centrofolicular¹⁹⁴. Sin embargo, la expresión de transcritos y proteína Bcl-2 está presente en las células B clonales CD5⁺ de la LLC-B sin translocación del gen bcl-2, y está ausente en las células B normales CD5⁺ de cordón umbilical¹⁸¹. Esta sobreexpresión de Bcl-2 en LLC-B ha sido confirmada por otros investigadores^{262, 267}, y se ha sugerido que puede ser debida a un exceso de transcripción causado por la hipometilación del gen bcl-2²⁶². Ciertos autores encuentran una correlación entre los niveles de proteína Bcl-2 y la supervivencia *in vitro* de las células de LLC-B: en los casos con menos Bcl-2 la muerte celular sucede más rápidamente que en aquellos con altos niveles²⁶²; sin embargo, en otro estudio no se observa esta correlación en la apoptosis *in vitro* y mencionan que la expresión de niveles altos de Bcl-2 está relacionada con peor pronóstico^{180, 268}.

En el estudio de Bcl-2 mediante citometría de flujo se observa a tiempo cero un único pico que, con el paso de los días de cultivo se convierte en un doble pico, uno de baja intensidad y otro de alta intensidad de fluorescencia. Este último es el que se corresponde con el pico detectado a tiempo cero²³⁶.

Citoquinas inhibitoras de apoptosis en la LLC-B como IL-4²⁵², IL-8²⁵⁴ e IFN α ²⁴⁷ incrementan los niveles de Bcl-2.

En células de la LLC-B se ha observado (como en la célula B normal de centro germinal: punto 3.3) que la expresión de Bcl-2 tiene una relación inversa con la proliferación celular: los estímulos que inducen proliferación dan lugar a una reducción de la expresión de Bcl-2¹⁸¹.

La expresión de otras proteínas de la familia Bcl-2 también ha sido estudiada, detectándose: 1) altos niveles de Bcl-x_L, molécula que sinergiza con Bcl-2; 2) altos niveles de Bax, con actividad contraria a Bcl-2; y 3) muy bajos niveles de Bcl-x_s, la cual inhibe la función de Bcl-2²⁶⁹.

En los casos de LLC-B en los que se induce apoptosis con fludarabina se observa un descenso de Bcl-2 y tienen una buena respuesta clínica al tratamiento con este fármaco²⁷⁰. Sin embargo, algunas LLC-Bs son resistentes a tratamiento con fludarabina+mitoxantrona, esta resistencia

a la apoptosis se asocia con una elevada expresión de Bcl-2 y Bax. Por otra parte, cuando las células de la LLC-B se cultivan *in vitro* se produce un descenso de Bcl-2 tanto en células sensibles a apoptosis como resistentes a apoptosis, dándose una disminución de Bax solo en las muestras resistentes, lo que hace pensar en mecanismos más complejos en la inhibición de la apoptosis en la LLC-B dentro de la familia de Bcl-2. También en relación con esta familia de proteínas se ha observado que la actividad endonucleasa representa un indicador pronóstico en la sensibilidad de la LLC-B a la apoptosis, incluso más importante que la expresión de Bcl-2, y que es posible que Bcl-2 y Bax determinen el contenido de endonucleasas de estas células, así como diversos factores de crecimiento y mitógenos pueden actuar sobre la actividad endonucleasa²⁷¹.

1. 6. 3. 4. Papel jugado por las caspasas

En la LLC-B se ha estudiado la inactivación de PARP comprobando la conversión del enzima nativo de 116 kDa a su fragmento proteolítico de aproximadamente 85 kDa. Se ha observado que la activación de las caspasas se produce en la apoptosis espontánea e inducida por glucocorticoides y fludarabina en la LLC-B. Además, la apoptosis de la LLC-B se bloquea cuando las células se incuban con inhibidores de caspasas, indicando estos resultados que las caspasas son esenciales para la apoptosis en la LLC-B²⁷².

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

1. Estudio de la apoptosis *in vitro* de la célula B en un amplio número de casos diagnosticados clínica, morfológica e inmunofenotípicamente como LLC-B, utilizando para ello varios métodos considerados de utilidad en el análisis de la apoptosis.
2. Papel de la célula endotelial en la supervivencia de las células de la LLC-B. Aproximación a los factores que regulan la cinética de apoptosis de las células leucémicas:
 2. 1. Factores solubles
 2. 2. Interacciones célula tumoral/célula endotelial: papel jugado por las moléculas de adhesión
 2. 3. Interacciones célula tumoral/proteínas de matriz extracelular
3. Determinación de factores solubles y/o de membrana que intervienen en este proceso.
4. Comprobar si el efecto ejercido por las células endoteliales sobre la apoptosis de las células de la LLC-B está mediado por procesos de proliferación y/o diferenciación de las células tumorales.
5. Comprobar si el efecto de las células endoteliales sobre la apoptosis es específico de la LLC-B. Para ello se estudiarán linfocitos, normales o neoplásicos, distintos a la célula de la LLC-B.
6. Determinar a través de qué receptor (es) es vehiculada la señal, originada en la célula endotelial, que regula la cinética de la apoptosis de las células de la LLC-B.
7. Investigar si el efecto de las células endoteliales sobre la LLC-B está mediado por la regulación de proteínas de la familia Bcl-2.

MATERIAL Y METODOS

3.- MATERIAL Y METODOS

3. 1. MATERIALES

Se emplearon los siguientes productos Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en diferentes aplicaciones: tripsina, EDTA, TRIS, SDS (dodecil-sulfato sódico), deoxicolato sódico, glutaraldehído, paraformaldehído, etanol, RNasa, yoduro de propidio, agarosa, PMSF (phenyl-methylsulfonyl fluoride), pepstatina, leupeptina, Nonidet P-40, β -mercaptoetanol, CINA, acrilamida, metanol, ácido acético, proteinasa K, fenol, cloroformo, alcohol isoamílico, acetato sódico, N-laurilsarcosin, azul tripan, DMSO (dimetilsulfóxido), colágeno tipo I, fibronectina (FN) de plasma humano, FN celular, fragmentos proteolíticos de FN de 30 y 70 kDa, vitronectina y laminina.

Además, se utilizó Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed, Sheldon, Birmingham, UK), microesferas inmunomagnéticas unidas a IgG de ratón (Immunotech, Marseille, France), microesferas inmunomagnéticas unidas a IgG₂ de ratón (DynaL RAM IgG₂ Collection Kit, Dynal, New Ferry, Wirral, UK), concentrador de partículas magnéticas (DynaL MPCTM-1). Células HUVEC Pooled (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) y medio de crecimiento para células endoteliales EGM Bulletkit B-3124 constituido por medio basal (EBM, Bio-Whittaker) suplementado con factor de crecimiento de células endoteliales humano (hEGF, BW-4017, Bio-Whittaker), hidrocortisona (BW-4035, Bio-Whittaker), gentamicina-anfotericina B (BW-4081, Bio-Whittaker), extracto de cerebro bovino (BBE, BW-4092, Bio-Whittaker) y suero de ternera fetal (FBS, BW-4101; Bio-Whittaker). La línea celular ECV-304 procede de ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK). Frascos de Roux (Nunc, Roskilde, Denmark) de 25, 50 y 75 cm². Filtros de 0,2 μ m. de poro (Costar, Cambridge, MA). Placas de 24 pocillos de fondo plano (Costar), cámaras transwell de 0,4 μ m. de poro para placas de 24 pocillos (Costar). Suero pre-inmune de conejo (Normal rabbit IgG, R & D, Minneapolis, MN). Kit de Anexina-V-FITC (Bender, Vienna, Austria). Kit para método TUNEL "In situ cell death kit, fluorescein" (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN). Colorante TAMRA o 5, 6-carboxitetrametil-rodamina, succinimidil éster (Molecular Probes, Eugene, OR). "FACS-Lysing Solution" (Becton Dickinson, San Jose, CA), "Fix and Perm kit" (Caltag, San Francisco, CA). Kit para la detección de CD126 con IL-6-biotina, "Human interleukin 6 biotin conjugate, kit Fluorokine" (R & D). Kit para la cuantificación de IL-6 mediante ELISA,

"Predicta" (Genzyme, Cambridge, MA). Medio RPMI 1640 (ICN, Oxnard, CA), L-glutamina (Sigma), penicilina-estreptomicina (Gibco, Paisley, Scotland), suero de ternera fetal (Gibco). Metionina-³⁵S (ICN), medio DMEM sin glutamina ni metionina (ICN). Membranas de ultrafiltración DAFLO, PM10 y XM50 (Amicon, Beverly, MA), sephacryl S-200 (Pharmacia, Piscataway, NJ), proteína-G-sepharosa (4 Fast Flow, Pharmacia), *enhancer* Amplify (Amersham, Buckinghamshire, UK). Patrones de peso molecular para SDS-PAGE, "Kaleidoscope Prestained Standards" (Bio-Rad, Hercules, CA).

3. 1. 1. Citoquinas humanas y anticuerpos neutralizantes anti-citoquinas

IL-6 humana recombinante derivada de levadura (Genzyme). IL-6 humana recombinante derivada de células CHO (Genzyme). IL-6 humana recombinante derivada de E. coli (PeproTech). IL-6 natural obtenida por superinducción de células de osteosarcoma humano (Sigma). IL-4 humana recombinante (Genzyme).

Anticuerpo policlonal de conejo anti-IFN γ (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Anticuerpo policlonal de conejo anti-GM-CSF (Genzyme). Anticuerpo policlonal de oveja anti-IL-4 (Genzyme). Anticuerpo monoclonal (AcMo) de ratón anti-IL-5 (Genzyme). Anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-6 (Genzyme). AcMo de ratón anti-IL-7 (Genzyme). AcMo de ratón anti-IL8 (Genzyme). Anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-10 (PeproTech). Anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-13 (PeproTech).

3. 1. 2. Anticuerpos frente a antígenos de membrana y citoplásmicos

Controles isotípicos: AcMo de ratón IgG-FITC e IgG-RD1 (Coulter, Hialeah, FL). Anti-CD5: AcMo de ratón T1-RD1 (Coulter). Anti-CD19: AcMo de ratón B4-FITC (Coulter), B4-RD1 (Coulter) y CD19-PerCP (Becton Dickinson, San Jose, CA). Anti-CD20: AcMo de ratón Leu-16-FITC y Leu-16-PE (Becton Dickinson). Anti-CD23: AcMo de ratón Leu-20-PE (Becton Dickinson). Anti-CD38: AcMo de ratón Leu-17-PE (Becton Dickinson). Anti-CD138: AcMo de ratón anti-CD138-RPE (Immuno Quality Products, Groningen, The Netherlands). Anti-cadenas ligeras de las Ig: anticuerpos policlonales de conejo anti-Kappa-FITC y anti-Lambda-FITC (Dako). Anti-CD49d: AcMo de ratón anti-VLA- α 4-PE (Becton Dickinson). Anti-CD49e: AcMo de ratón anti-CD49e-RPE (Cymbus Bioscience, Southampton, UK). Anti-CD29: AcMo de ratón 4B4-RD1 (Coulter). Anti-CD11a: AcMo de ratón anti-CD11a-RPE (Serotec, Oxford, UK). Anti-CD11b: AcMo de ratón Leu-15-PE (Becton Dickinson). Anti-CD11c: AcMo de

ratón Leu-M5-PE (Becton Dickinson). Anti-CD54: AcMo de ratón Leu-54-PE (Becton Dickinson). Anti-CD62L: AcMo de ratón TQ1-RD1 (Coulter). Anti-CD44: AcMo de ratón anti-CD44-RPE (Serotec). Anti-CD45: AcMo de ratón anti-HLe-1-FITC (Becton Dickinson). Anti-CD126: AcMo de ratón anti-CD126-PE (Immunotech). Anti-CD130: AcMo de ratón anti-CD130-PE (Pharmingen, San Diego, CA). Anti-Bcl-2: AcMo de ratón anti-Bcl-2 humano-FITC (Dako). Marcaje indirecto de Bax: anticuerpo policlonal de conejo anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA) como anticuerpo primario y un anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo-FITC (Sigma) como secundario; y como control negativo se utilizó una IgG policlonal de conejo irrelevante (Normal rabbit IgG. R & D) como anticuerpo primario y, como secundario el mismo anticuerpo anti-conejo-FITC.

Para el boqueo de la adhesión se utilizaron los anticuerpos que se citan a continuación: AcMo de ratón anti-CD18, clon TS1/18, *mouse anti-human β_2 -integrin* (Endogen, Woburn, MA). AcMo de ratón anti-CD29, clon TS2/16, *mouse anti-human β_1 -integrin* (Endogen). AcMo de ratón anti-CD62L, clon LAM1-3, *mouse anti-human LAM-1* (Coulter). AcMo de ratón anti-CD44, clon L178, *Leu-44* (Becton Dickinson) y también el clon BU75, isotipo IgG_{2a} (Ancell, Bayport, MN, USA). Además se utilizó un AcMo de ratón anti-CD2, *T11 IgG1* (Coulter).

3. 2. METODOS

3. 2. 1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Se utilizaron muestras de sangre periférica (SP) de controles sanos y pacientes con LLC-B (n=38), linfoma de manto (n=1) y una leucemia prolinfocítica B (LPL-B) (n=1), diagnosticados en todos los casos de acuerdo a criterios clínicos, morfológicos e inmunológicos. Las células mononucleares totales (CMSP) se aislaron, previa dilución de la sangre en una proporción 1:1 con PBS, por centrifugación en un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Las CMSP fueron retiradas de la interfase, lavadas, contadas y utilizadas inmediatamente o bien congeladas y almacenadas en medio conteniendo DMSO al 10%. Las células descongeladas tuvieron una viabilidad entre el 75-95%, valorada con el colorante vital azul tripán.

3. 2. 2. Obtención de células mononucleares de amígdala

Las células mononucleares de amígdala, procedente de pacientes con amigdalitis crónica, se obtuvieron previa disgregación mecánica de la misma para obtener una suspensión celular que

ulteriormente fue centrifugada en un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Estas células se manipularon en todo momento a 4°C. Algunas células fueron congeladas en DMSO 10%. La viabilidad de las células descongeladas, determinada por exclusión del colorante azul tripán, osciló entre 85-95 %.

3. 2. 3. Purificación de poblaciones celulares

3. 2. 3. 1. Purificación de linfocitos B de sangre periférica y amígdala con partículas inmunomagnéticas

Se realizó utilizando depleción negativa con microesferas inmunomagnéticas (Magnetic beads mouse IgG, Immunotech) que fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-CD2 (T11 IgG1 purificado de Coulter Clone) y, posteriormente incubadas con las CMSP, siguiendo las instrucciones de uso de ambos productos. Para cada 10×10^6 células $CD2^+$ se utilizaron 5 μ g de anticuerpo monoclonal anti-CD2 y 1 mg. de microesferas inmunomagnéticas. Las fracciones positiva y negativa se separaron utilizando un concentrador de partículas magnéticas (DYNAL MPCTM-1). Los lavados y volúmenes de incubación utilizados siguieron las instrucciones recomendadas. La purificación de células B fue $\geq 96\%$ en las LLC-B (también en el linfoma de manto y en la LPL-B) y de un 99,5 % en las amígdalas.

3. 2. 3. 2. Enriquecimiento de linfocitos B de manto folicular y centro germinal con partículas inmunomagnéticas

Después de la obtención de los linfocitos B de amígdala tal y como se ha descrito en el punto anterior, tales células fueron incubadas con microesferas inmunomagnéticas (Dynal RAM IgG2 Collection Kit) que previamente habían sido incubadas con el AcMo de ratón anti-CD44 humano (Clon BU75, isotipo IgG2a. Ancell) según las instrucciones del kit. Tras la aplicación del concentrador de partículas magnéticas, las células $CD44^-$ (fracción enriquecida en células de centro germinal) se recogieron en la fracción negativa, y las $CD44^+$ (fracción enriquecida en células de manto folicular) de la fracción positiva se liberaron de las microesferas mediante la DNasa suministrada por el kit, siguiendo las instrucciones de uso del mismo. Todos los pasos de este proceso se realizaron a 4°C.

3. 2. 4. Cultivo de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) y obtención de medio condicionado

Se utilizaron HUVEC criopreservadas (HUVEC Pooled. Clonetics/Bio-Whittaker). Se

descongelaron y se cultivaron en medio de crecimiento EGM Bulletkit BW-3124 (Bio-Whittaker), en frascos de Roux a 2.500 células/cm², añadiendo 1 ml. de medio por cada 5 cm². Después de una adherencia de 24 h. se retiró todo el medio y se renovó. Se siguió renovando el medio hasta conseguir confluencia. Cuando las HUVEC cubrieron el 70-90% de la superficie del frasco las células se incubaron con tripsina 0,025%/EDTA 0,01% en estufa hasta conseguir que las células se despegaran del plástico. Después del primer pase las HUVEC se cultivaron a una densidad de 5.000 células/cm² y no se renovó el medio hasta 7 días después, momento tras el cual se objetivó una monocapa de aproximadamente un 80%, recogiendo el sobrenadante. Este medio condicionado (M.Cd) de HUVEC se pasó a través de un filtro de 0,2 µm. de poro y se congeló a -20°C hasta su uso.

3. 2. 5. Cultivo de la línea humana de células endoteliales ECV-304 y obtención de medio condicionado

Las células ECV-304 son una línea celular de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano. Estas células se cultivaron en frascos de Roux a 100.000/ml. en medio completo (M.C: RPMI 1640 1X sin glutamina (ICN), L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomycin y suero de ternera fetal (STF) descomplementado 10%). En el día +3 de cultivo, con una monocapa cercana al 100%, las células se incubaron con tripsina al 0,25% en estufa. Para la obtención de M.Cd se recogieron los sobrenadantes (de día +1, +2, +3, etc, de cultivo) de CEs con 2 o 3 pases. El M.Cd se pasó a través de un filtro de 0,2 µm. de poro, y se congeló a -20°C hasta su uso.

3. 2. 6. Cultivos celulares

Las diferentes subpoblaciones celulares fueron cultivadas a 0,5x10⁶ células/ml. en placas de 24 pocillos de fondo plano (Costar), en un medio completo (M.C del punto 3.2.5).

Las citoquinas recombinantes y/o naturales se añadieron desde el comienzo del cultivo, sin posteriores adiciones en los sucesivos días de cultivo.

Todos los cultivos celulares se realizaron en un incubador a 37°C, en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO₂.

3. 2. 6. 1. Cocultivos en cámaras transwell

Los cocultivos de células de LLC-B con CEs se realizaron preparando las ECV-304 24 h. antes de añadir los linfocitos. El cultivo se inició con células ECV-304 a una densidad de 100.000

células/ml. en placas de 24 pocillos, con un volumen por pocillo de 1 ml. Se incubaron en estufa y, a las 24 h. se comprobó que existía una monocapa celular de aproximadamente el 50% de la superficie del pocillo. Después se retiró todo el sobrenadante del cultivo de cada pocillo, y se añadieron $0,5 \times 10^6$ células de LLC-B en 1 ml. de M.C en los cocultivos en contacto directo. Paralelamente, se realizaron cocultivos de las CEs y las células de LLC-B utilizando cámaras transwell de $0,4 \mu\text{m}$. de poro en placas de 24 pocillos (Costar). Con este sistema se impide la interacción física entre ambas poblaciones celulares, pero se permite el paso de factores solubles a un lado y otro de la membrana *nucleopore* de $0,4 \mu\text{m}$. En este segundo tipo de cocultivo también se retiró todo el sobrenadante de las CEs después de 24 h. de cultivo, se añadieron 600 μl . de M.C fresco, colocándose después la cámara transwell, sobre la que se añadieron $0,35 \times 10^6$ células de LLC-B en 100 μl . de M.C (la concentración de células de LLC-B en el pocillo fue la misma que en los cocultivos con células en contacto directo, es decir, $0,5 \times 10^6$ células/ml., ya que en el transwell el volumen total de M.C es de 700 μl . y en contacto directo es de 1 ml).

3. 2. 6. 2. Cultivos con medio condicionado procedente de células endoteliales

Los medios condicionados de las células HUVEC o de la línea de células endoteliales ECV-304 se recogieron a diferentes tiempos con el objeto de optimizar el tiempo de cultivo requerido para conseguir el mayor efecto anti-apoptótico sobre las células B CD5⁺ de la LLC-B. En todos los casos el medio condicionado crudo se utilizó al 100% en los cultivos.

3. 2. 6. 3. Cultivos con proteínas de matriz extracelular (ME) purificadas

Se realizaron cultivos de células de LLC-B, añadiendo éstas en placas de 24 pocillos con proteínas de ME previamente adheridas al fondo del pocillo a las concentraciones que a continuación se citan: colágeno tipo I ($30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), fibronectina (FN) de plasma humano, FN celular, y los fragmentos proteolíticos de FN de 30 y 70 kDa ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), vitronectina ($0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), y laminina ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

3. 2. 6. 4. Cultivos con la ME derivada de las células endoteliales: método de la lisis de la monocapa de las CEs con deoxicolato sódico

Se cultivaron células ECV-304 a 100.000/ml. En los días +1, +2 o +3 se procedió a la extracción del sobrenadante y a la posterior lisis de las CEs con deoxicolato sódico al 0,5%, según el método previamente descrito por Caverder y col.²⁷³ que mantiene intactas y

funcionales las diferentes proteínas de ME secretadas por diferentes tipos de células adherentes.

3. 2. 6. 5. Cocultivos con CEs fijadas. Métodos de fijación utilizados

En los cocultivos de LLC-B/CEs en contacto directo se fijaron las CEs para algunos experimentos. Las células ECV-304 se cultivaron en placas de 24 pocillos, a 100.000/ml., durante 3 días. Pasado este tiempo se comprobó la existencia de una monocapa de aproximadamente el 100% de la superficie y se retiró todo el sobrenadante. Se lavaron las células 3 veces con PBS y se procedió a la fijación de las células. Se emplearon tres métodos de fijación de células: 1) glutaraldehído 2% en PBS, durante 5 min, 2) paraformaldehído 1% en PBS, durante 45 min y 3) etanol 50%, durante 10 min. En los 3 métodos, después de la fijación, se lavaron las células dos veces al día con PBS, durante 3-7 días; comprobando diariamente la permanencia de la monocapa celular. Estos lavados exhaustivos se realizaron con el fin de eliminar cualquier cantidad residual de fijador que pudiera interferir en el ensayo del cocultivo con las células de la LLC-B.

3. 2. 7. Bloqueo de las interacciones celulares con anticuerpos anti-moléculas de adhesión

Se incubaron 10 µg. de AcMo por cada $1,5 \times 10^6$ células de LLC-B en 200 µl. de M.C, durante 30 min, a 4°C. Después se añadieron 2,8 ml. sobre los 200 µl. de células (sin realizar lavados) y las células se distribuyeron en 3 pocillos previamente preparados con CEs (como se indicó en el punto 3.2.6.1) para el cocultivo en contacto directo de LLC-B/CEs. Los diferentes AcMo se incubaron previamente con las células tumorales antes del cocultivo con las CEs con el fin de dar al anticuerpo tiempo necesario para interaccionar con su célula blanco antes de la iniciación de la interacción célula-célula.

3. 2. 8. Neutralización de la actividad del M.Cd de las células endoteliales con anticuerpos anti-citoquinas

Para neutralizar la actividad anti-apoptótica presente en el medio condicionado de las CEs, 1 ml. del sobrenadante de cultivo se incubó con diluciones seriadas de diferentes anticuerpos policlonales y monoclonales anti-citoquinas durante 2 h. a 37°C. El medio fue entonces añadido a las células de la LLC-B. Un suero pre-inmune de conejo, utilizado en cantidades idénticas a las descritas para el anticuerpo anti-IL-6 policlonal de conejo, fue empleado como control.

3. 2. 9. Métodos para la detección de apoptosis

3. 2. 9. 1. Método del marcaje con Anexina-V-FITC/Ioduro de propidio (IP) para citometría de flujo

Después de lavar las células, se resuspendieron en 0,5 ml. de tampón HEPES. El marcaje se realizó según las instrucciones de uso del kit (Annexin-V-FITC Kit. Boehringer Ingelheim); y del artículo de Vermes y col.²⁷⁴.

3. 2. 9. 2. Método del TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*: marcaje de los cortes finales con deoxiuridín trifosfato mediado por la deoxinucleotidil transferasa terminal) para citometría de flujo

Para la aplicación de esta técnica se utilizó el kit "In situ cell death detection kit, fluorescein" (Boehringer-Mannheim), siguiendo las instrucciones de uso del mismo.

3. 2. 9. 3. Método para el estudio del pico hipodiploide y del ciclo celular para citometría de flujo

Se resuspendieron 1×10^6 células en 2 ml. de etanol frío al 70 % y se incubó a -20°C durante 24 h. Pasado este tiempo, las células se centrifugaron 5 min. a 1.400 r.p.m, se retiró el sobrenadante y se lavaron 3 veces con PBS. Tras resuspender las células en 0,5 ml. de PBS, se añadieron RNasa e IP a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. y 20 $\mu\text{g/ml}$. respectivamente. Tras una incubación de 15 min. a temperatura ambiente y en oscuridad las células, sin lavados ulteriores, fueron adquiridas para su posterior análisis en el citómetro de flujo, o bien se guardaron a 4°C hasta el momento de la adquisición. Este método fue útil tanto para la cuantificación del pico hipodiploide (células apoptóticas) como para el análisis del ciclo celular, si bien en este último caso la adquisición de los datos incluyó, además del parámetro FL2-Height (pico) los parámetros FL2-Area y FL2-Width (anchura).

3. 2. 9. 4. Electroforesis del ADN en gel de agarosa

El análisis de la fragmentación de ADN en geles de agarosa se realizó según la metodología previamente descrita por Dancescu y col.²⁵².

3. 2. 10. Método para la detección por citometría de flujo (CMF) de la fagocitosis de linfocitos con TAMRA

El colorante TAMRA (5, 6-carboxitetrametilrodamina, succinimidil éster; Molecular Probes)

se utilizó según lo descrito en el artículo de Hess y col.²⁷⁵.

3. 2. 11. Análisis de los antígenos de membrana por citometría de flujo

3. 2. 11. 1. Inmunofluorescencia directa

El perfil fenotípico de los antígenos de membrana se realizó con una técnica de inmunofluorescencia directa utilizando simultáneamente anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC; FL1) y con ficoeritrina (PE; FL2). El marcaje sobre la sangre completa se realizó atendiendo a las instrucciones de uso de la solución lisante de hematíes FACS-lysing solution (Becton Dickinson). Las células separadas con un gradiente de densidad, con o sin posteriores pasos de purificación, se ajustaron a una concentración de 5×10^6 células/ml. y 100 μ l. de esta suspensión celular se incubaron con los AcMo deseados (1 μ g.) durante 30 min., a 4°C y en oscuridad. Tras dos lavados, las células se analizaron en el citómetro de flujo. En todos los casos se utilizaron AcMo irrelevantes de idéntico isotipo y conjugados con los mismos fluorocromos que los AcMo relevantes con el fin de establecer la fluorescencia celular inespecífica.

3. 2. 11. 2. Detección del receptor de la IL-6 (IL-6R, CD126) con IL-6-biotina

La detección del receptor de membrana para IL-6 (IL-6R, CD126) se realizó incubando las suspensiones celulares con IL-6-biotina y ulterior revelado con avidina-FITC, siguiendo las instrucciones de uso del kit Fluorokine (Human interleukin 6 biotin conjugate. R & D Systems). En el estudio de la expresión de este receptor en las células de manto folicular y centro germinal de amígdala, las células se incubaron conjuntamente con IL-6 biotina y los anticuerpos CD44-PE o CD38-PE o CD20-PE y CD19-PE-Cy5.

3. 2. 12. Análisis de antígenos intracitoplásmicos por citometría de flujo

Las células B tumorales purificadas frescas y cultivadas durante 24, 48 o 72 horas se permeabilizaron para la detección de los antígenos Bcl-2 y Bax utilizando exactamente las instrucciones del kit Fix and Perm (Caltag). Los controles negativos correspondientes (IgG1-FITC para Bcl-2-FITC y el anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado con FITC para Bax) sirvieron para establecer la fluorescencia celular inespecífica.

3. 2. 13. Citometría de flujo

Las suspensiones celulares se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA), cuyo láser de argón emite a 488 nm, longitud de onda que, junto a detectores

y filtros adecuados, 530/30 nm para FITC (verde), 585/42 nm para PE e ioduro de propidio (naranja/rojo) y 630/22 nm para PerCP (rojo), discrimina los fluorocromos utilizados. La fluorescencia inespecífica se determinó utilizando los AcMo de ratón o anticuerpos policlonales de conejo irrelevantes del mismo isotipo conjugados con FITC, PE o PerCP. El porcentaje de células positivas para cada marcaje resultó de restar a la emisión de fluorescencia total la fluorescencia inespecífica. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células positivas viene dada por unidades arbitrarias de fluorescencia. Atendiendo a las características de FSC y SSC se delimitaron las poblaciones que se deseaban analizar. Se adquirieron en cada caso ≥ 10.000 eventos. Los resultados se analizaron utilizando el programa LYSIS-II (Becton-Dickinson).

3. 2. 14. Enzimoinmunoensayo (ELISA) para la cuantificación de IL-6

Kit para la cuantificación de IL-6 mediante ELISA (Genzyme).

3. 2. 15. Concentración del medio condicionado

El M.Cd se concentró utilizando membranas de ultrafiltración DAFLO con puntos de corte de 10 kDa, PM10 (Amicon Corporation) y de 50 kDa, XM50 (Amicon Corporation). En este último caso, el M.Cd se concentró de 10 a 30 veces. En los estudios funcionales del concentrado de M.Cd en cultivos celulares se realizaron diluciones de dicho concentrado con M.C, para conseguir concentraciones finales en el pocillo 1X o 3X.

3. 2. 16. Cromatografía. Filtración sobre gel

La filtración sobre gel de los concentrados de M.Cd se realizó en una columna de sephacryl S-200 (Pharmacia) (matriz con capacidad para separar proteínas de 5-250 kDa.) de 2,5 cm.de diámetro x 100 cm.de altura, equilibrada en PBS. Se corrió a una velocidad constante de 60 ml/h. La columna se calibró con albúmina (67 kDa), HLA soluble (55 kDa) y β_2 -microglobulina (12 kDa). A continuación se filtraron por esta columna concentrados de M.Cd de células endoteliales y se recogieron fracciones de 5 ml. El volumen de la muestra filtrada nunca excedió el 1,5 % del volumen total del gel (este volumen está dentro del recomendado para obtener una buena resolución de los picos). Se midió la densidad óptica (O.D) a 280 nm. de cada fracción. Inmediatamente después se añadió a cada fracción STF hasta llegar a una concentración del 10%, y se congelaron todas a -20°C hasta su uso. El estudio funcional de las fracciones del S-200 en cultivos celulares, se realizó con 0,5 ml. de la fracción+0,5 ml. de

M.C.

La filtración sobre gel de la IL-6 recombinante de *E. coli* (PeproTech) se realizó en una columna de sephacryl S-200 (Pharmacia) de 0,8 cm. de diámetro x 40 cm. de altura, equilibrada en PBS. Se corrió a una velocidad constante de 5 ml/h.. La columna se calibró con ovoalbúmina (45 kDa) y con la cadena ligera λ (25 kDa). A continuación se filtraron por esta columna 20 μ g de IL-6r de *E. coli* (reconstituída) en 200 μ l de agua y se recogieron fracciones de 200 μ l. La concentración de IL-6 de cada fracción se cuantificó mediante ELISA (Precicta. Genzyme).

3. 2. 17. Marcaje metabólico con metionina-³⁵S e inmunoprecipitación

3. 2. 17. 1. Marcaje metabólico

El marcaje metabólico de CEs se realizó con metionina-³⁵S (ICN). Primero se cultivaron células ECV-304, a 100.000/ml, en placas de 24 pocillos, durante 48 h. Se retiró el sobrenadante (SN) y se realizaron 3 lavados de 1 ml/pocillo con DMEM sin glutamina y sin metionina (ICN)+L-glutamina 2 mM+STF 10% descomplementado y dializado. Después se añadieron 0,5 ml/pocillo del mismo medio sin metionina, incubándolo durante 1 h. Pasado este tiempo se añadieron 25 μ Ci/pocillo de metionina-³⁵S; y se incubó la placa en la estufa durante 16 h. Se recogieron los SNs ($\approx$ 2 ml.) y se añadieron inhibidores de proteasas (EDTA 2 mM; PMSF 200 μ M, pepstatina A 0,7 μ g/ml y leupeptina 0,5 μ g/ml). Las CEs se tripsinizaron (como en el punto 3.2.5); se lavaron 2 veces con PBS y se lisaron con tampón de lisis (Nonidet P-40 al 0,5% en Tris 50mM pH 7.4-7.6, EDTA 5 mM), añadiéndose los mismos inhibidores de proteasas que en el SN. Después de 5 min. de lisis a 4°C, se centrifugó 5 min. a 12.000 r.p.m, extrayéndose en otro tubo el sobrenadante correspondiente (equivalente al citosol de las CEs).

3. 2. 17. 2. Inmunoprecipitación de IL-6

Se llevó a cabo la inmunoprecipitación en dos muestras: 1) SN del cultivo de CEs y 2) citosol de las CEs. Ambas fueron tratadas de la forma que se describe a continuación.

Se realizaron 2 preaclerados consistentes en la incubación de cada una de las muestras con 10 μ l. de Proteína-G-Sepharosa (Pharmacia), durante 30 min. a 4°C, en agitación, seguida de centrifugación durante 1 min. a 12.000 r.p.m. El primer pellet se descartó y el segundo se dividió en dos alícuotas que se resuspendieron en 25 μ l. de tampón de muestra de SDS-PAGE

(electroforesis sobre geles de poliacrilamida en presencia de SDS) sin β -mercapto-etanol y con β -mercapto-etanol, respectivamente.

A los SNs obtenidos tras el último preaclorado se añadieron 10 μ g/ml. de anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-6 (Genzyme) y se incubó durante 3 h, en agitación, a 4°C. A continuación se añadieron 10 μ l. de Proteína-G-Sepharosa, y se incubó durante 1 h., en las mismas condiciones. Tras una centrifugación de 1 min a 12.000 r.p.m, se retiró el SN. El pellet (=inmunoprecipitado=IPr) se lavó 1 vez con cada una de las soluciones de lavado que a continuación se citan, y este orden. Solución 1: SDS 0,1%; deoxicolato sódico 0,5% y STF 1% en TNEN (Tris-Cl 20 mM pH 7,6; NaCl 0,1 M; EDTA 10 mM; NP-40 0,5%). Solución 2: NaCl 0,5 M y 10% TNEN. Solución 3: PBS.

Cada IPr se dividió en dos alícuotas que se resuspendieron en 25 μ l. de tampón de muestra de SDS-PAGE sin y con β -mercapto-etanol, respectivamente.

3. 2. 18. Electroforesis en SDS-PAGE y autorradiografía

Las muestras obtenidas de la inmunoprecipitación fueron sometidas a electroforesis sobre geles de SDS-PAGE. Se usaron geles con una concentración de acrilamida del 12%.

El gel se fijó primero en metanol 40% y ácido acético 10%, durante 30 min. Se retiró el fijador y se añadió un reactivo fluorográfico comercial para geles (*enhancer* Amplify. Amersham), incubándose otros 30 min. Después se secó el gel, y se dejó exponiendo en una placa para rayos X, a -70°C, durante 7 días. Pasado este tiempo se reveló la autorradiografía.

3. 2. 19. Análisis estadístico

Se han calculado medias aritméticas, desviaciones típicas y errores estandard. Se ha realizado contraste de medias para muestras no independientes mediante la aplicación de la t de Student. También se ha llevado a cabo el análisis de la varianza para muestras no independientes, con sus comparaciones posteriores correspondientes.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4. 1. LAS CELULAS ENDOTELIALES INHIBEN LA APOPTOSIS "IN VITRO" DE LAS CELULAS DE LA LLC-B

Son características fundamentales de la LLC-B (comentadas en la introducción) 1) la acumulación en diversos territorios del organismo de un *pool* de linfocitos B neoplásicos CD5⁺, con una vida media aumentada y, paradójicamente, 2) una muerte rápida por apoptosis *in vitro*. Estas diferencias en la muerte celular *in vivo* e *in vitro* podrían ser debidas a la ausencia de ciertos estímulos inhibidores de apoptosis cuando las células son cultivadas *in vitro* que, sin embargo, estarían presentes *in vivo*. Ya que un número elevado de las células B neoplásicas circulan en sangre periférica (SP), cabe suponer que su comportamiento biológico podría responder a factores mediados por células potencialmente capaces de interactuar con las células de la LLC-B, entre las que se encuentran las células endoteliales (CEs) de los vasos sanguíneos.

En este trabajo se han investigado las posibles interacciones entre las CEs y los linfocitos B de la LLC-B con implicaciones sobre la vida media de estas células neoplásicas *in vitro*; es decir, la existencia potencial de estímulos inhibidores de la apoptosis, originados en la CE, que consigan un aumento de la vida media de las células de la LLC-B tal y como sucede *in vivo*. En este trabajo se ha estudiado la influencia de los factores solubles secretados por las CEs y del contacto entre la célula de la LLC-B y la CE, así como de las proteínas de matriz extracelular producidas por estas últimas, sobre la apoptosis de la LLC-B *in vitro*.

4. 1. 1. Las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) y de la línea de células endoteliales ECV-304 inhiben la apoptosis espontánea *in vitro* de las células de la LLC-B

El estudio de la apoptosis *in vitro* de las células tumorales de la LLC-B se realizó siempre mediante cultivos celulares con células B purificadas.

Para el estudio del efecto de los factores solubles producidos por la CE sobre la apoptosis de las células de la LLC-B se realizaron cultivos en medio completo (M.C), como control de muerte basal *in vitro*, y en medio condicionado (M.Cd) obtenido del sobrenadante de los cultivos de HUVEC crecidas durante 7 días. El análisis de la muerte celular mediante marcaje con Anexina-V-FITC se realizó con 5 LLC-Bs cultivadas en ambos medios. En todos los casos

se detectó un porcentaje de células apoptóticas significativamente inferior en M.Cd con respecto al M.C, en los días +1, +2 y +3 de cultivo, tal y como se muestra en la Fig. 1A con un ejemplo representativo. A continuación exploramos la capacidad que el M.Cd de la línea de células endoteliales humanas de cordón ECV-304 pudiera tener en la inhibición de la apoptosis de las células leucémicas. Esta aproximación experimental era manifiestamente necesaria dada la conocida pérdida de funciones que acompaña al establecimiento de algunas líneas celulares. El M.Cd procedía de células ECV-304 crecidas durante 3 días y su efecto se comprobó de nuevo con 5 LLC-Bs. Como puede observarse en el ejemplo representativo de la Fig. 1B, dicho M.Cd mantuvo la viabilidad de la célula tumoral con al menos igual eficiencia que la mostrada por el M.Cd de las HUVEC frescas.

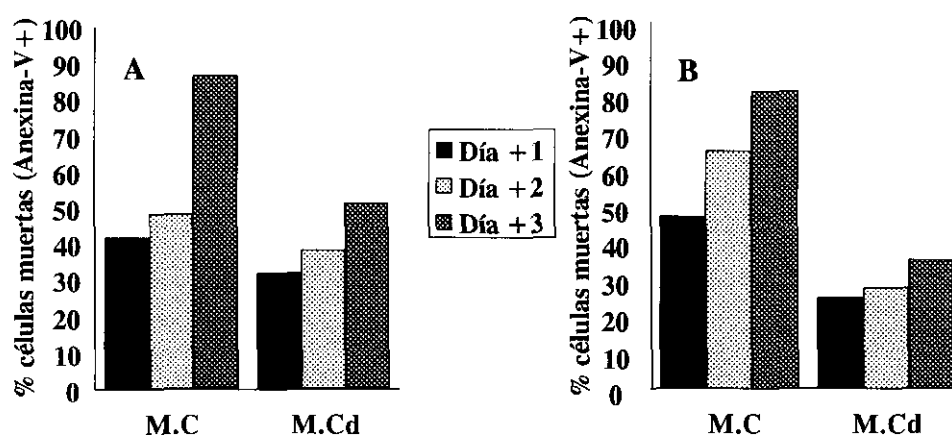


Fig. 1.- Estudio comparativo del efecto del medio condicionado (M.Cd) procedente de células endoteliales en la viabilidad de las células de la LLC-B. Ejemplo representativo de la inhibición de la apoptosis de las células leucémicas tras 1, 2 y 3 días de cultivo con M.Cd obtenido de células HUVEC frescas (A) o de la línea endotelial ECV-304 (B). El M.Cd de las células HUVEC y ECV-304 se recolectó tras 7 y 3 días de cultivo, respectivamente.

Estos resultados indicaban que la inhibición de la apoptosis de las células leucémicas estaba mediada por factores solubles producidos tanto por las células endoteliales humanas frescas de cordón umbilical (HUVEC) como por la línea celular ECV-304 (también procedente de CE de cordón umbilical humano).

Estos hallazgos permitieron realizar un cambio metodológico en el estudio del efecto de las CE sobre la apoptosis de la LLC-B ya que, a nivel experimental, el empleo de la línea ECV-304 aportaba importantes ventajas sobre las HUVEC en casi todos los experimentos que se han llevado a cabo a lo largo de este trabajo. Por una parte, las HUVEC necesitan factores de

crecimiento para mantenerse adecuadamente en cultivo, mientras que las ECV-304 se dividen autónomamente, sin necesidad de añadir factores solubles exógenos. Por otro lado, las HUVEC crecen mucho más lentamente que las ECV-304, por lo que la obtención de una monocapa de CEs en cultivo (unos 7-10 días para HUVEC y 2-3 días para ECV-304) o de sobrenadantes con actividad inductora de supervivencia fue mucho más lenta e irregular en las HUVEC que en las ECV-304. Por tanto, el uso de las ECV-304 permite obtener en menos tiempo un mayor volumen de M.Cd con actividad antiapoptótica, con la ventaja añadida de que tales M.Cd solían mostrar una actividad reproducible y constante.

La determinación del porcentaje de células tumorales apoptóticas se basó en la utilización de diferentes métodos citométricos con el objeto de comparar la cinética de apoptosis obtenida con cada uno de ellos. Si bien la técnica básica para todos los experimentos fue la del marcaje con Anexina-V-FITC/IP por motivos que se explicarán en breve, los otros tres métodos resultaron de gran utilidad puesto que reafirmaron las alteraciones celulares que acompañan al proceso apoptótico y que han sido descritas en multitud de sistemas experimentales.

1. Detección de células muertas por CMF por su tamaño (FSC) y granularidad (SSC).- Tal y como se muestra en la Fig. 2A y B, las células apoptóticas pierden tamaño con respecto a las células vivas y, también pueden incrementar su granularidad. La adquisición de las células se realizó siempre con un amplificador de FSC que permitiera la entrada en la ventana de FSC/SSC de la mayoría de las células muertas: las células en estadios iniciales de la apoptosis (células con tamaño igual o discretamente inferior al de las células vivas), células en estadios intermedios de la apoptosis (con un tamaño claramente inferior al de las células vivas) y células en estadios avanzados de la apoptosis, incluso cuerpos apoptóticos (eventos con un tamaño mucho más pequeño que las células en estadio intermedio de la apoptosis). El cálculo de las células apoptóticas se llevó a cabo mediante una región R1 que incluía todos los eventos excepto aquellos que mantenían los valores de tamaño y granularidad mostrados por las células frescas. El ejemplo presentado en la Fig. 2 muestra los resultados de una LLC-B cultivada durante 3 días en M.C y en M.Cd. Como puede observarse, las células cultivadas en M.Cd permanecían en su mayoría viables ya que quedaban excluidas de la región R1. Por el contrario, el porcentaje de células apoptóticas en M.C a día +3 es mucho mayor que el registrado con M.Cd: aunque resulta más difícil

la separación de las células en estadios precoces de la apoptosis con respecto a la población de células vivas, el análisis se realizó con idéntica región R1. Por lo tanto, en lo que respecta a este método, la detección de células muertas, atendiendo al FSC/SSC, demuestra una clara diferencia en la apoptosis *in vitro* de la LLC-B entre M.C y M.Cd.

2. Detección por CMF de células apoptóticas con Anexina-V-FITC/IP.- Permite la detección de células en un estadio precoz de apoptosis (Anexina-V⁺/IP⁻) y de las células en estadios más avanzados (Anexina-V⁺/IP⁺). En los estadios iniciales del proceso apoptótico, numerosos tipos celulares comienzan a translocar el fosfolípido de membrana fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana citoplásmica cuando aún mantienen la membrana impermeable a numerosos colorantes. La Anexina-V, que posee una elevada especificidad por dicho fosfolípido en presencia de iones Ca²⁺ reconoce, por lo tanto, células en estadios muy precoces de apoptosis. Según progresa la célula en las fases de la apoptosis, ésta se hace permeable al IP y, en este momento se marca doblemente. Además, otra característica de las células apoptóticas, la fragmentación del ADN, da lugar a una captación mayor de IP en células con más ADN (poca fragmentación) o a una captación menor en células con menos ADN (mucho fragmentación), lo que en CMF se traduce en dos intensidades de fluorescencia en el marcaje con IP: 1) las células con ADN intacto o escasamente fragmentado dan lugar a una señal de IP con IMF alta (Anexina-V⁺/IP⁺⁺) y 2) las células con ADN muy fragmentado y que, como consecuencia, han perdido buena parte del ácido nucleico, muestran un tamaño bastante inferior al de las células vivas y generan una señal con IP de IMF baja o intermedia (Anexina-V⁺/IP⁺); los elementos celulares que también se encuentran incluidos dentro de este grupo celular, con una cantidad de ADN muy reducida, son los cuerpos apoptóticos. En el ejemplo representado en la Fig. 2C y D pueden observarse todas estas características. En cuanto a la sensibilidad de la técnica, el marcaje con Anexina-V es el que presenta mayor sensibilidad de todos los que se han empleado, ya que permite la detección de todas las células apoptóticas, incluso las que se encuentran en fases muy iniciales caracterizadas, entre otras cosas, por tener un FSC/SSC prácticamente indistinguible de una célula viable (quedarían excluidas de la región R1 del método anterior). Por otra parte, las diferencias en el porcentaje de células muertas entre M.C y M.Cd son también muy evidentes utilizando este método.

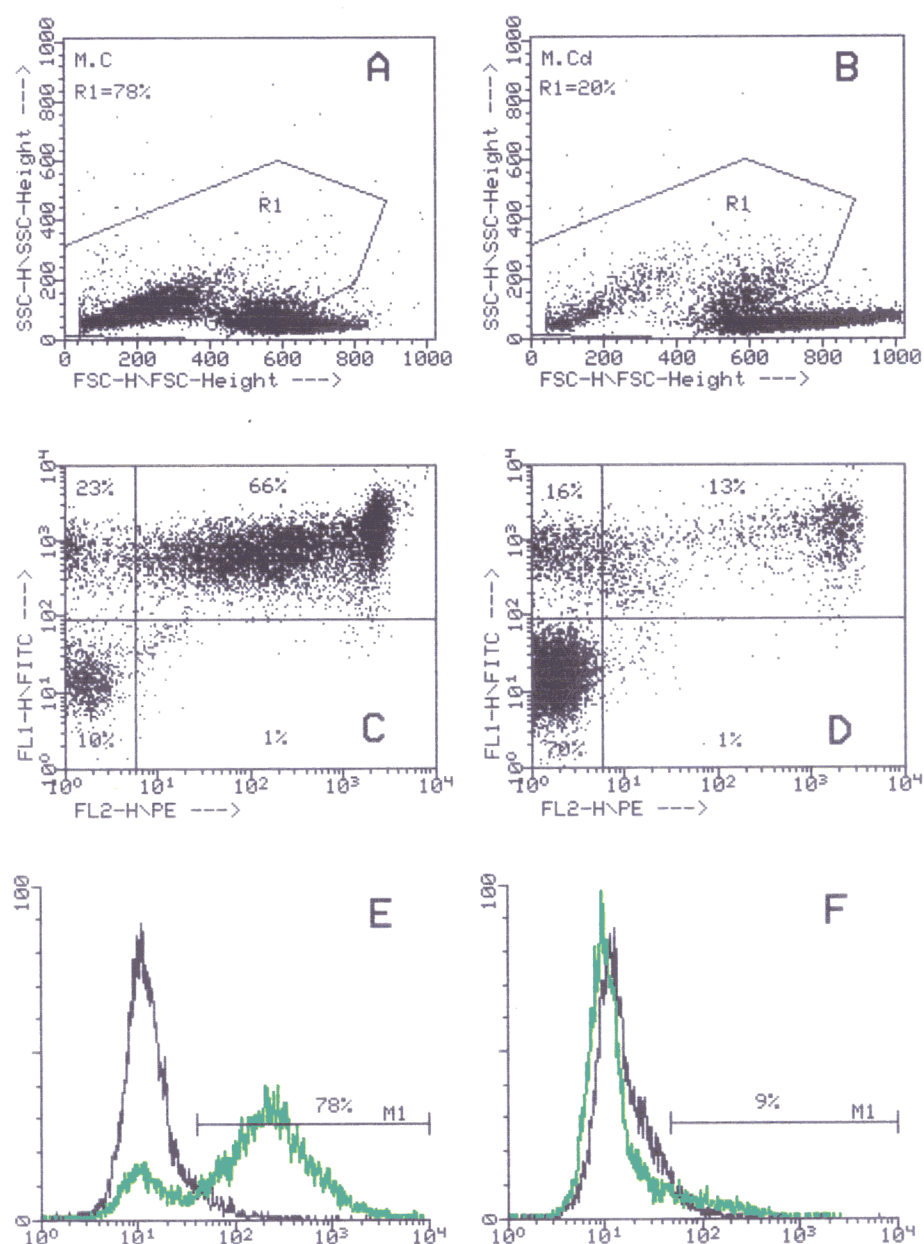


Fig. 2.- Diferentes métodos de CMF muestran resultados comparables en los porcentajes de células tumorales apoptóticas. Las células de la LLC-B fueron cultivadas con medio completo (M.C) o medio condicionado (M.Cd) y se extrajeron tras 3 días de cultivo. A y B: determinación de células no viables como porcentaje de eventos incluidos en la ventana R1 (bajo FSC; SSC superior a las células viables). C y D: determinación de células no viables como Annexina-V⁺ (células Annexina-V⁺/IP⁻ y células Annexina-V⁺/IP⁺). E y F: detección de la fragmentación del ADN mediante el método TUNEL; el marcador M1 indica el porcentaje de células TUNEL⁺. El control negativo (negro) se obtuvo eliminando de la mezcla de reacción el enzima TdT.

3. Método TUNEL y 4. Pico hipodiploide.- Estos dos métodos requieren permeabilización de las células e indican fragmentación del ADN, aunque utilizando dos aproximaciones experimentales distintas: el método TUNEL indica, de forma directa, cortes en el ADN; mientras que el pico hipodiploide registra pérdidas cuantitativas del ácido nucleico.
- Los resultados indicaban claramente que el porcentaje de células de la LLC-B TUNEL⁺ o hipodiploides se incrementaba progresivamente a lo largo del tiempo de cultivo (datos no mostrados). Los porcentajes de células apoptóticas determinadas utilizando estos dos métodos estuvieron siempre por debajo de los observados con nuestro método citométrico de referencia (Anexina-V/IP). En cualquier caso, ambos métodos registran de nuevo una diferencia significativa en cultivos de día +3 en el porcentaje de células apoptóticas en M.C y M.Cd (Fig. 2 y 3). La Fig. 3 muestra además que la magnitud en la inhibición de la apoptosis de los linfocitos de la LLC-B por el M.Cd de las células ECV-304 (Fig. 3C, F, I y L) se aproximaba a la registrada cuando los linfocitos tumorales fueron cultivados a 4°C (Fig. 3A, D, G y J), unas condiciones en las cuales la inhibición de la actividad metabólica es total y por lo tanto los mecanismos endógenos que disparan la apoptosis están paralizados. Estos resultados son indicativos de la elevada potencia del factor (es) de supervivencia presente en el M.Cd de las células endoteliales ECV-304.

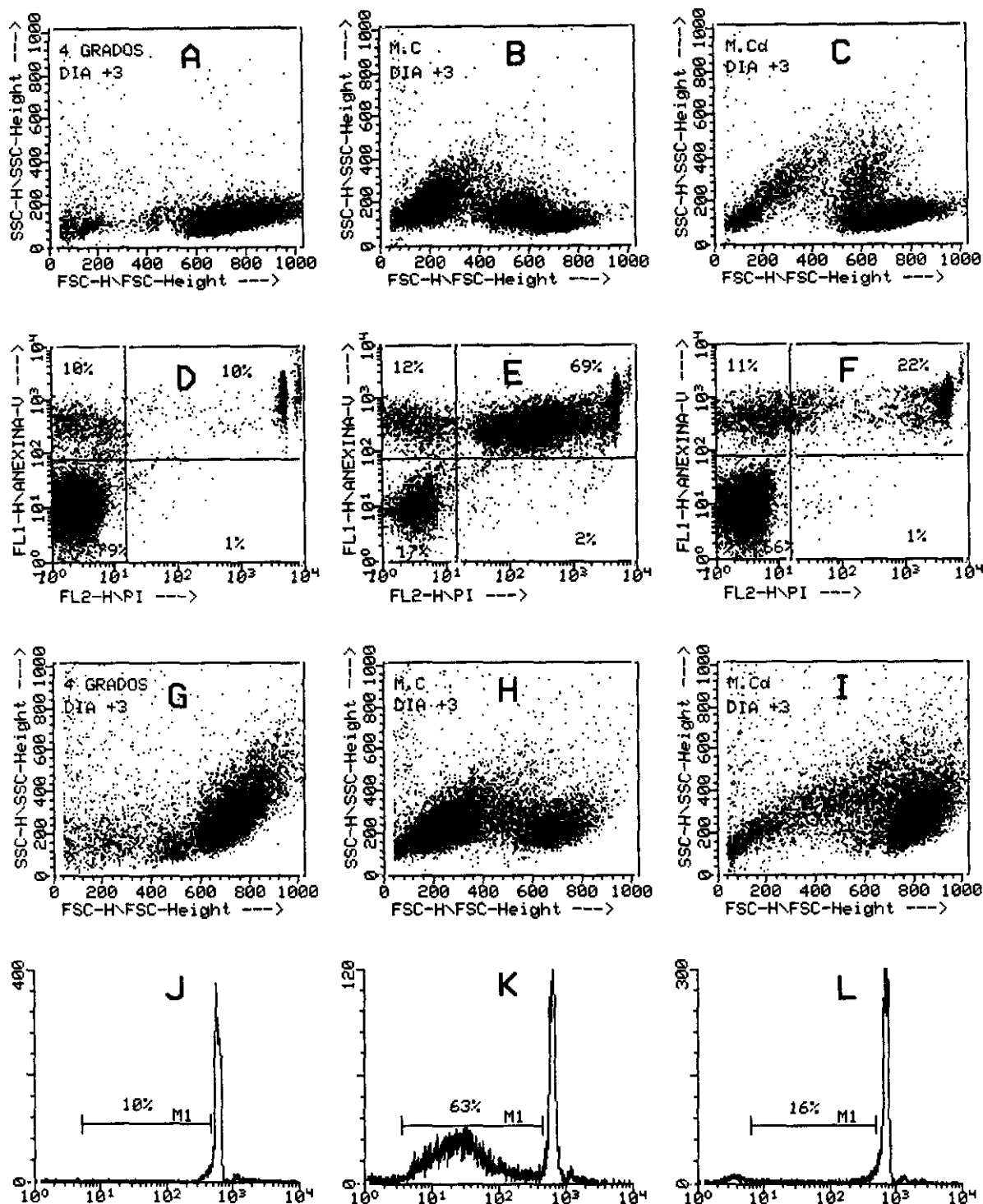


Fig. 3.- Determinación de células apoptóticas con los métodos del pico hipodiploide y el marcaje con Anexina-V/IP. Las células de la LLC-B fueron cultivadas durante 3 días a 4°C en M.C (D,J), a 37°C en M.C (E,K) o en M.Cd procedente de las células ECV-304 (F,L). Se muestra un ejemplo representativo. Para la determinación del pico hipodiploide, las características de *scatter* tras la permeabilización celular se modificaron (G-I) con respecto a las detectadas con el método de la Anexina-V/IP (A-C).

Por último, se analizó la fragmentación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa. En la Fig. 4 se muestra un ejemplo representativo de la fragmentación del ADN de las células de la LLC-B cultivadas con M.C y M.Cd. El gel no sólo muestra una mayor degradación de ADN en M.C con respecto al M.Cd, que se incrementa con el tiempo, sino también la ausencia casi absoluta de ADN intacto en las células cultivadas en M.C a día +3, en un tiempo en el que la gran mayoría del ADN aún no había sido fragmentado en las células en M.Cd.

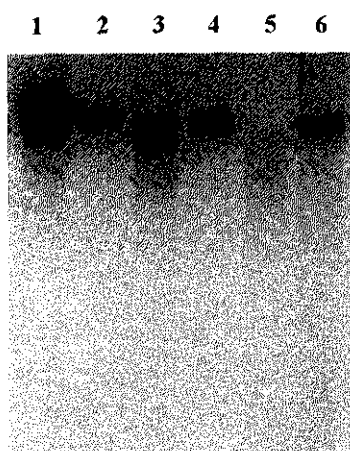


Fig. 4.- Detección de ADN por electroforesis en gel de agarosa de células de LLC-B en cultivo. 1) Células en M.C extraídas a día +1; 2) células en M.Cd, día +1; 3) células en M.C, día +2; 4) células en M.Cd, día +2; 5) células en M.C, día +3 y; 6) células en M.Cd, día +3. El porcentaje de células apoptóticas (Anexina-V+) fue de 34, 14, 70, 18, 97 y 47% para los carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

La elección del M.Cd obtenido tras 3 días de cultivo de las células ECV-304 respondió al hecho de que pasadas estas 72 horas de cultivo se conseguía la confluencia de las mismas. Para verificar si los 3 días de cultivo era el momento óptimo para la recogida del medio condicionado o, por el contrario, podíamos obtener un M.Cd con una actividad anti-apoptótica aún mayor, se recogió el sobrenadante de las células a 1, 2, 3, 4 y 5 días tras el inicio del cultivo. Como se observa en la Fig. 5, la actividad inhibidora de muerte celular es máxima en el M.Cd extraído a día +3.

Aunque no esté representado gráficamente, el medio condicionado recogido tras 4 o más días de cultivo presentó una actividad inferior a la encontrada en día +3. Después de obtener esta información, los cultivos se realizaron en todos los casos con M.Cd de ECV-304 de día +3 para el estudio comparativo de la cinética de apoptosis a días +1, +2 y +3 de varias LLC-Bs con respecto al medio completo (Fig. 6).

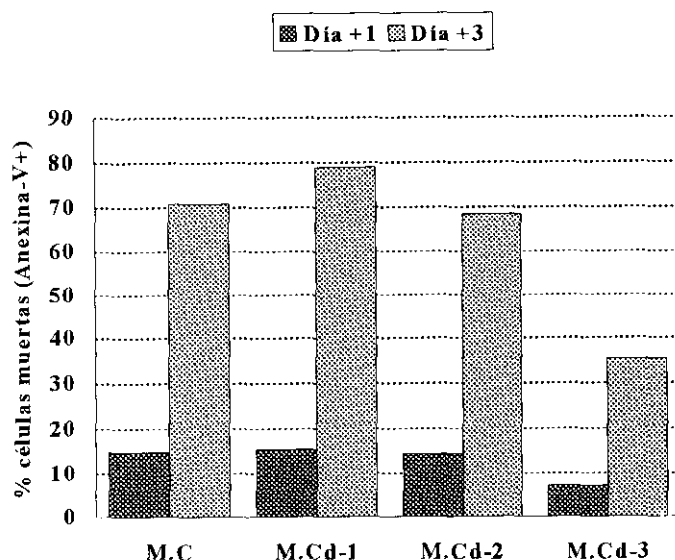


Fig. 5.- Actividad anti-apoptótica del M.Cd tras diferentes días de cultivo de las CE. Se cultivaron 10^5 células ECV-304/ml durante 1, 2 o 3 días y se recogieron los sobrenadantes. Se muestra un ejemplo representativo de una LLC-B cultivada durante 1 y 3 días en M.C o en M.Cd de día +1 (M.Cd-1), +2 (M.Cd-2) o +3 (M.Cd-3) de las células endoteliales (La inhibición de la apoptosis por el M.Cd-3 fue aproximadamente de un 50% con respecto al M.C).

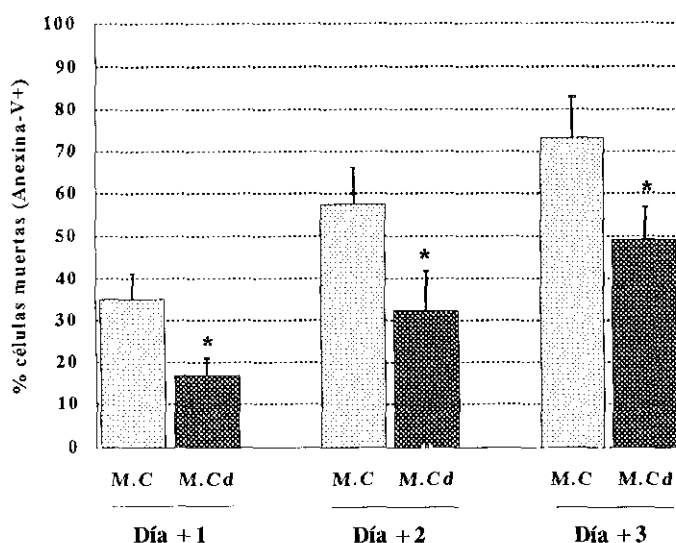


Fig. 6.- Inhibición de la apoptosis de las células de la LLC-B por el M.Cd de las células ECV-304. Representación de la media aritmética del porcentaje de células muertas (Anexina-V⁺) y del error estándar en M.C y M.Cd. Los resultados corresponden a los días +1 (n=30), +2 (n=30) y +3 (n=28). Las diferencias en la muerte celular entre LLC-Bs cultivadas en M.C y en M.Cd son estadísticamente significativas en día +1, +2 y +3 (* p<0.001).

La estadística básica de las 30 LLC-Bs analizadas a día +1 fue la siguiente:

Cultivo en...	Media aritm.	Desv. Típ.	Error est.	Mínimo	Máximo
M.C	34,9%	13,4	6,2	8,5%	61,2%
M.Cd	16,8%	9,9	4,6	2,6%	41,9%

La estadística básica de las 30 LLC-Bs analizadas a día +2 fue la siguiente:

Cultivo en...	Media aritm.	Desv. Típ.	Error est.	Mínimo	Máximo
M.C	57,2%	18,7	8,8	28,5%	93,0%
M.Cd	32,2%	18,7	8,8	8,1%	94,2%

La estadística básica de las 28 LLC-Bs analizadas a día +3 fue la siguiente:

Cultivo en...	Media aritm.	Desv. Típ.	Error est.	Mínimo	Máximo
M.C	73,0%	19,2	9,3	39,5%	98,9%
M.Cd	49,0%	18,6	9,1	22,5%	91%

Además, en el estudio comparativo de la apoptosis de la LLC-B en M.C y en M.Cd se obtuvieron los siguientes resultados:

- A. En día +1 se detectó inhibición de la apoptosis en M.Cd con respecto al M.C en las 30 LLC-Bs estudiadas. En 20/30 se detectó una inhibición $\geq 50\%$. En el contraste de medias mediante la aplicación de la t de Student se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de células muertas en M.C y M.Cd, con una $p < 0.001$ ($p = 0.0000001$).
- B. En día +2 se detectó inhibición de la apoptosis en M.Cd con respecto al M.C en 29/30 LLC-Bs. En 13/30 se detectó una inhibición $\geq 50\%$. En el contraste de medias mediante la aplicación de la t de Student se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de células muertas en M.C y M.Cd, con una $p < 0.001$ ($p = 0.000003$).
- C. En día +3 se detectó inhibición de la apoptosis en M.Cd con respecto al M.C en 21/28 LLC-Bs. En 9/28 se detectó una inhibición $\geq 50\%$. En el contraste de medias mediante la aplicación de la t de Student se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de células muertas en M.C y M.Cd, con una $p < 0.001$ ($p = 0.00001$).

De estos resultados se pueden extraer las siguientes conclusiones: 1) Existe una gran heterogeneidad en la cinética de muerte entre las diferentes LLC-Bs, dato que se deduce de los límites mínimo y máximo, y de las desviaciones típicas obtenidas. 2) La máxima actividad antiapoptótica del M.Cd se detectó a día +1, disminuyó a día +2 y fue aún menor a día +3. Sin embargo, las diferencias son estadísticamente significativas en los tres días, si bien la significación es mayor en día +1 ($p = 0.0000001$) que en día +3 ($p = 0.00001$).

Una vez conocido el efecto anti-apoptótico mediado por el M.Cd sobre las células de la LLC-B, lo comparamos con la inhibición de la apoptosis conseguida por la IL-4 (n=2), la citoquina con el mayor efecto antiapoptótico sobre la LLC-B descrito hasta ahora. Se observó un efecto equivalente entre M.Cd y 5 ng/ml de IL-4 en los días +1 y +2, mientras que a día +3 la inhibición de la apoptosis fue algo superior en las células cultivadas con IL-4 (Fig. 7).

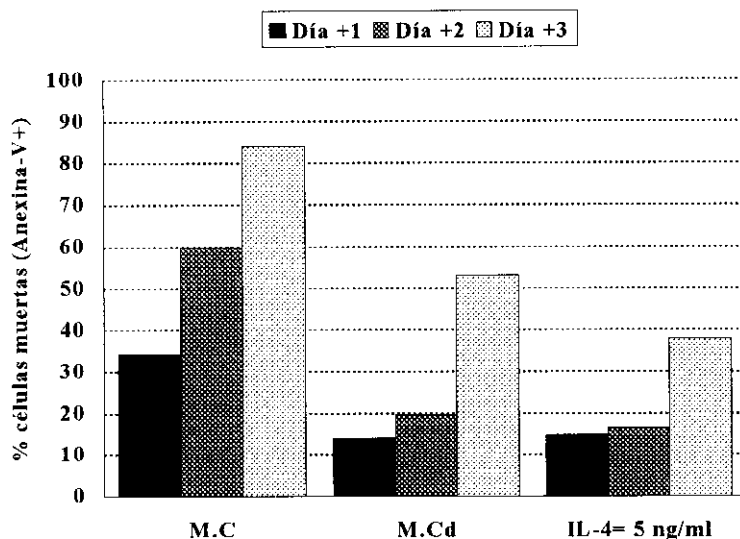


Fig. 7.- Estudio de la apoptosis de las células de la LLC-B cultivadas en M.Cd y con IL-4. Ejemplo representativo de la cinética de muerte celular de las células leucémicas cultivadas en M.C, M.Cd y con 5 ng/ml de IL-4 (en M.C).

4. 1. 2. La interacción física entre las células endoteliales y las células de la LLC-B no contribuye significativamente a la supervivencia de la célula tumoral

Una vez conocido el efecto inhibidor de apoptosis del M.Cd en la LLC-B, se estudió el posible papel del contacto directo entre la célula tumoral y el endotelio en el retraso de la muerte de las células de la LLC-B *in vitro*. Para ello se realizaron experimentos orientados a conocer si el contacto aportaba o no un efecto adicional a la inhibición de la apoptosis causada por el medio condicionado. En diversos experimentos se analizó la posible participación de moléculas de adhesión, proteínas de matriz extracelular o de, en general, antígenos de superficie existentes en el endotelio.

4. 1. 2. 1. Efecto del medio condicionado (M.Cd) y del contacto directo con la célula endotelial en la inhibición de la apoptosis de las células leucémicas

Se investigó la posible contribución en la inhibición de la apoptosis del contacto directo entre la CE y la célula de la LLC-B. Para estudiar este aspecto se llevaron a cabo dos tipos de

cocultivos: a) permitiendo el contacto directo (Cont. dir) entre ambas células, es decir, sin interponer ningún tipo de obstáculo entre ambas y, b) impidiendo el contacto directo entre ambas células, mediante la interposición de cámaras *transwell* (Transw) que, sin embargo, sí permiten que ambos tipos celulares compartan el mismo medio de cultivo.

En el análisis de las células de LLC-B recolectadas de los sobrenadantes de los cocultivos en contacto directo se detectó, tanto por microscopía óptica como en las imágenes del citómetro, la aparición de células que por tamaño (y granularidad) correspondían inequívocamente a CEs (que probablemente habían perdido su capacidad de adherencia al plástico). Por este motivo en el estudio por CMF se realizó una región de análisis para linfocitos que excluía las CEs contaminantes.

Se investigaron las diferencias en el porcentaje de células muertas en ambos tipos de cocultivo y estos resultados se compararon con los obtenidos en cultivos con M.C y M.Cd (Fig. 8). Estos experimentos se llevaron a cabo en 15 LLC-Bs en total, con estudio de cinética de apoptosis, variable entre los días +1 y +8 (en la mayoría de las leucemias se analizó la apoptosis en los días +1 y +3 de cultivo y, en algunos casos se analizaron también los días +2, +4, +5, +6 +7 y/o +8). En 14/15 la mortalidad celular fue mucho más baja en los cocultivos en contacto directo que en los realizados con *transwell*; sólo en 1 caso los resultados obtenidos en ambas formas de cocultivo fueron idénticos (en todos los días analizados: +1, +3, +6 y +8). En los cultivos de ≥ 4 días ($n=7$) el porcentaje más bajo de células muertas se detectó en todos los casos en Cont.dir. Es necesario indicar que los cocultivos en contacto directo de más de 5 días tienen una dificultad para el análisis correcto de los linfocitos apoptóticos, ya que después de este tiempo las células endoteliales comienzan a despegarse masivamente. Dado que gran parte de las CEs extraídas con el sobrenadante están muertas y por lo tanto muestran parámetros de *scatter* alterados (menor tamaño y granularidad), pueden entorpecer el análisis de la mortalidad de los linfocitos.

Del total de LLC-Bs ($n=15$) en las que se realizó el estudio comparativo de la apoptosis en M.C, M.Cd y en ambas formas de cocultivo (Transw y Cont.dir), se han llevado a cabo sendos análisis de la varianza con: a) un grupo de 11 LLC-Bs con resultados de muerte celular a día +1 y b) un subgrupo del grupo anterior, constituido por las mismas LLC-Bs excepto dos, es decir, en 9 LLC-Bs, en las que también se realizó análisis de la muerte celular en día +3.

La estadística básica de las 11 LLC-Bs de día +1 fue la siguiente:

Cultivo en...	Media aritm.	Desv. Típ.	Error est.	Mínimo	Máximo
M.C	34,8%	16,5	4,9	8,5	61,2
M.Cd	17,3%	9,9	3,0	2,6	34,8
Transw	34,4%	14,8	4,4	11,7	59,7
Cont.dir	19,8%	13,8	4,1	3,0	47,9

La estadística básica de las 9 LLC-Bs de día +3 fue la siguiente:

Cultivo en...	Media aritm.	Desv. Típ.	Error est.	Mínimo	Máximo
M.C	83,8%	12,4	4,1	59,12	95,9
M.Cd	49,4%	25,1	8,3	28,13	91
Transw	36,9%	17,7	5,9	7,6	64,9
Cont.dir	10,6%	6,9	2,3	4,6	25,98

Se aplicó un análisis de la varianza para muestras no independientes con punto de corte $p < 0.001$, seguido de las comparaciones posteriores (Prueba de Newman-Keuls) obteniéndose los resultados que se ilustran en la Fig. 8.

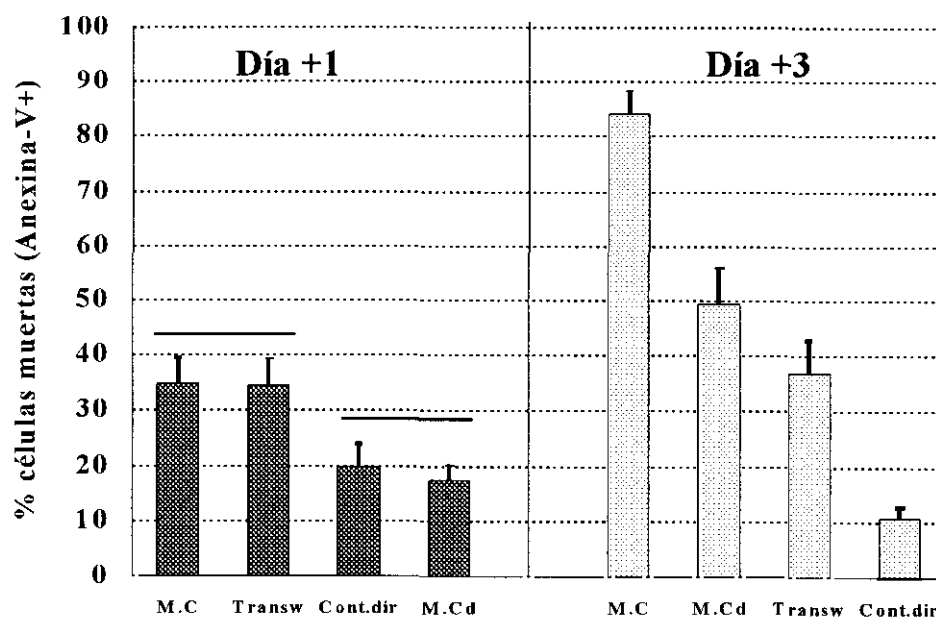


Fig. 8.- Porcentaje de células apoptóticas en cultivos de LLC-B en M.C, M.Cd, Transw y Cont.dir. Representación de la media aritmética y del error estándar en cada una de las condiciones de cultivo, en día +1 ($n=11$) y día +3 ($n=9$). Nivel de significación para el análisis de la varianza $p < 0.001$. En las comparaciones posteriores se obtuvo un nivel de significación $p < 0.01$, excepto en las indicadas con una línea horizontal sobre las barras (no significativo para M.C/Transw y Cont.dir/M.Cd en día +1) y en la comparación M.Cd/Transw de día +3 cuya significación estadística fue $p < 0.05$.

Como cabía esperar, se detectó inhibición de la apoptosis en los cocultivos con cámaras de difusión (*transwell*) mediada por los factores solubles producidos por la CE, de una manera similar, aunque no idéntica, a lo observado con el M.Cd. En general, la inhibición de la apoptosis en los primeros días del cultivo (días +1, +2 y, a veces, +3) fue superior en el M.Cd que en Transw. Estas y otras observaciones quedan reflejadas de forma más precisa en los resultados obtenidos con el análisis de la varianza: 1) En el día +1 la mortalidad celular es muy similar en M.C y en Transw, sin embargo, en los sucesivos días de cultivo la apoptosis se sigue incrementando en M.C (34,8% en día +1 y 83,8% en día +3) mientras que en Transw apenas se incrementa (34,4% en día +1 y 36,9% en día +3), lo que indica inhibición de apoptosis en los cocultivos con Transw. En realidad el porcentaje de células apoptóticas se mantiene estabilizado en Transw incluso en cultivos de 3 a 8 días (en la Fig. 9B se muestra un ejemplo representativo de esta cinética). 2) En día +1 hubo una mayor inhibición de la apoptosis en M.Cd que en Transw, mientras que esta tendencia se invirtió en día +3. Estos resultados son compatibles con los previamente obtenidos sobre la inhibición máxima de la apoptosis con M.Cd de día +3 (e inferior con M.Cd de día +1 y +2, Fig. 5), y con el hecho de la permanente producción de factor soluble (s) por las CEs del cocultivo con Transw (no así en las células de la LLC-B cultivadas en M.Cd). 3) En el estudio del componente contacto célula-célula, se observó una mortalidad de las células leucémicas mucho más baja (desde día +1 hasta día +8) en los cocultivos en los que existía contacto directo CE/LLC-B (la viabilidad fue del 80% tras 8 días de cocultivo) que en los cocultivos en los que este contacto no existía. Este último resultado es sugerente de la necesidad de contacto directo entre la célula endotelial y la célula de la LLC-B para que, junto a los factores solubles, se genere una señal óptima para la supervivencia de las células leucémicas.

4. 1. 2. 2. Anticuerpos anti-moléculas de adhesión no afectan a la inhibición de la muerte celular de las células de la LLC-B

Los resultados obtenidos en el estudio de la expresión de diversas moléculas de adhesión en 20 LLC-Bs fueron los siguientes: 1) un 38% de las LLC-B fueron CD49d⁺ (VLA-4⁺) y un 50% CD49e⁺ (VLA-5⁺), 2) el 100% fueron CD29⁺, 3) el 25% fueron CD11a⁺, 6% CD11b⁺ y 83% CD11c⁺, 4) el 77% fueron CD54⁺, 5) el 100% fueron CD62L⁺, 6) el 100% fueron CD44⁺. Una vez conocido el perfil de expresión de moléculas de adhesión en las células de la LLC-B,

se diseñaron experimentos para bloquear la adhesión de estas células con las células endoteliales, para así comprobar si estas moléculas estaban implicadas en la inhibición de la apoptosis previamente descrita en los cocultivos de contacto directo.

Se realizaron experimentos con 4 LLC-Bs en los que se utilizaron anticuerpos bloqueantes anti-CD18+anti-CD29, anti-CD62L y anti-CD44. Ya que CD29, CD62L y CD44 se expresaron en todas las LLC-Bs estudiadas y CD18 (cadena β común de las β_2 -integrinas), debería estar presente en aquellas LLC-Bs con expresión de CD11a, CD11b ó CD11c (es decir, prácticamente en el 100% de las LLC-Bs), cabría esperar que la adición de uno o varios de estos anticuerpos bloqueantes tuviera algún efecto sobre la viabilidad de las células leucémicas. Tal y como demuestra la Fig. 9, la adición a los cultivos de estos anticuerpos anti-moléculas de adhesión no tuvo efecto sobre la potente inhibición que el contacto directo ejercía en la apoptosis de las células de la LLC-B. Estos resultados sugieren que CD18, CD29, CD62L y CD44 no contribuyen significativamente al efecto protector que las CEs demuestran sobre las células leucémicas, si bien no excluyen que otras moléculas de adhesión, o un bloqueo con multitud de anticuerpos anti-moléculas de adhesión, pudieran tener cierta relevancia en este proceso.

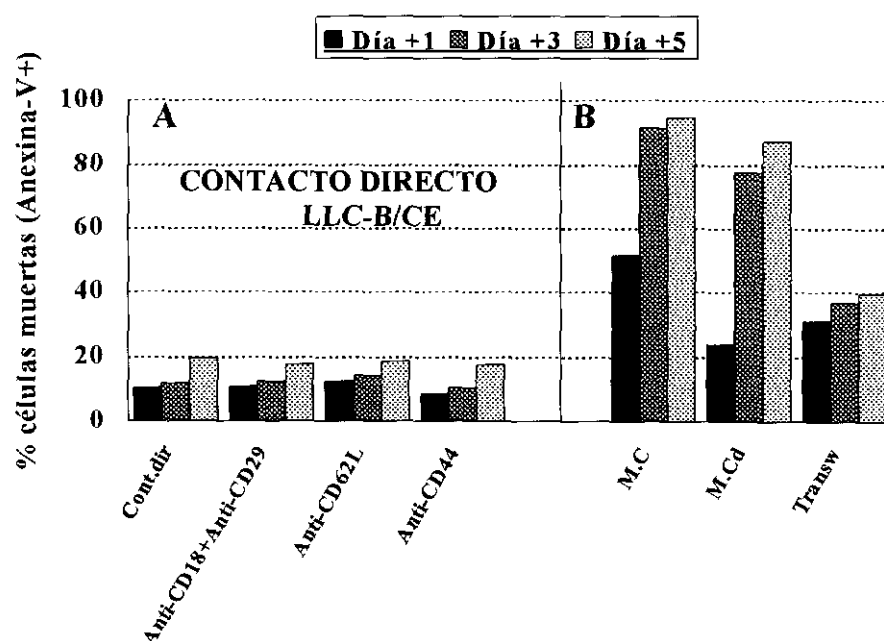


Fig. 9.- Efecto de anticuerpos bloqueantes anti-moléculas de adhesión en la inhibición de la apoptosis de la LLC-B. Las células leucémicas fueron incubadas previamente con los AcMo anti-CD18+anti-CD29, anti-CD62L o anti-CD44 (10 μ g/ml) y cultivadas en contacto directo con las CEs (A). Los resultados muestran un ejemplo representativo comparándolos con el porcentaje de células apoptóticas en M.C, M.Cd y Transw (B) tras 1, 3 y 5 días de cultivo.

4. 1. 2. 3. Proteínas purificadas de matriz extracelular (ME) o procedentes de CE no afectan a la viabilidad de la célula leucémica

Para investigar el posible papel inhibidor de apoptosis de otro elemento constitutivo del endotelio, como es la matriz extracelular, se realizaron varios experimentos: unos con proteínas purificadas adheridas al fondo del pocillo y otros en los que se preparaba una matriz extracelular de CEs antes de añadir las células de la LLC-B.

En los experimentos con proteínas purificadas, se pegaron en diferentes pocillos las siguientes proteínas: colágeno tipo I, fibronectina plasmática (FN plasma), FN celular, fragmento proteolítico de FN de 30 kDa, fragmento proteolítico de FN de 70 kDa, laminina y vitronectina. Después se añadieron las células de la LLC-B en M.C. Estos ensayos con proteínas de matriz purificadas se realizaron en 4 LLC-Bs y, en ningún caso se obtuvo diferencia, con ninguna de estas proteínas, en el porcentaje de células muertas con respecto al control de M.C (Fig. 10).

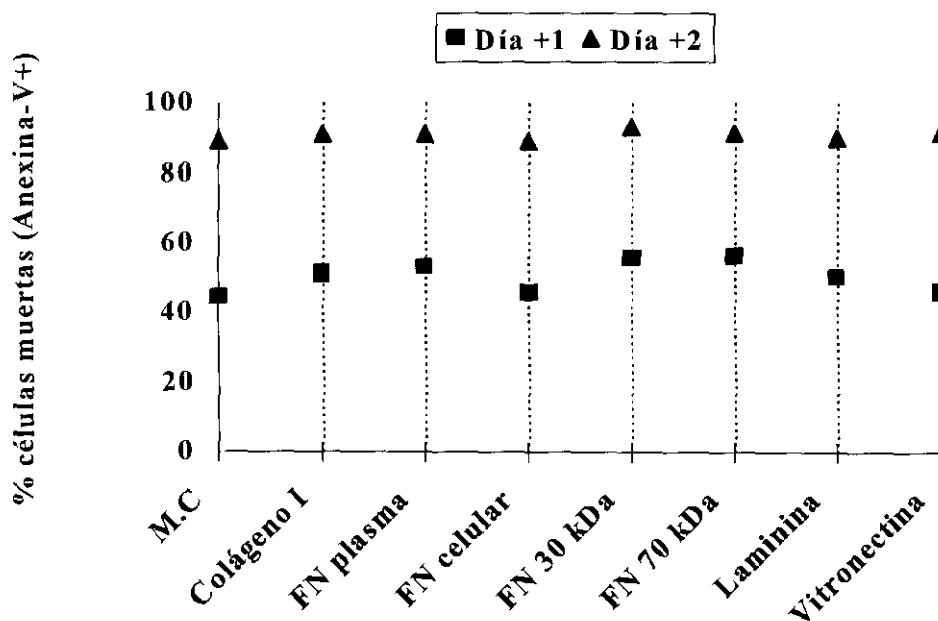


Fig. 10.- Efecto de diferentes proteínas de matriz extracelular en la apoptosis *in vitro* de las células de la LLC-B. Las células tumorales se cultivaron durante 1 y 2 días en M.C o en presencia de colágeno tipo I ($30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), FN plasmática ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), FN celular ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), FN 30 kDa ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), FN 70 kDa ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), laminina ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) o vitronectina ($0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Los valores son expresados como la media del porcentaje de células apoptóticas en cultivos realizados por duplicado y corresponden a uno de cuatro experimentos en los que se obtuvieron resultados comparables.

Los experimentos con matriz extracelular procedente de células endoteliales (ME-CE) se realizaron mediante una lisis de las CEs que mantiene intactas las proteínas de ME que están adheridas en el fondo del pocillo. Suponiendo que la concentración de proteínas de ME pudiera ser variable a lo largo del cultivo de las células endoteliales, se realizó la lisis de CEs a día +1, +2 y +3 (ME-CE+1, ME-CE+2 y ME-CE+3). Una vez preparado el pocillo con las proteínas de ME-CE se añadieron las células de la LLC-B a la concentración habitual en M.C y en M.Cd, para comparar la muerte celular en los dos medios con sus controles sin proteínas de matriz. El resultado obtenido en 4 LLC-Bs, al igual que en los ensayos con proteínas purificadas, mostraba que no existía ningún efecto sobre la apoptosis de las células de la LLC-B por parte de las proteínas de ME-CE (Fig. 11).

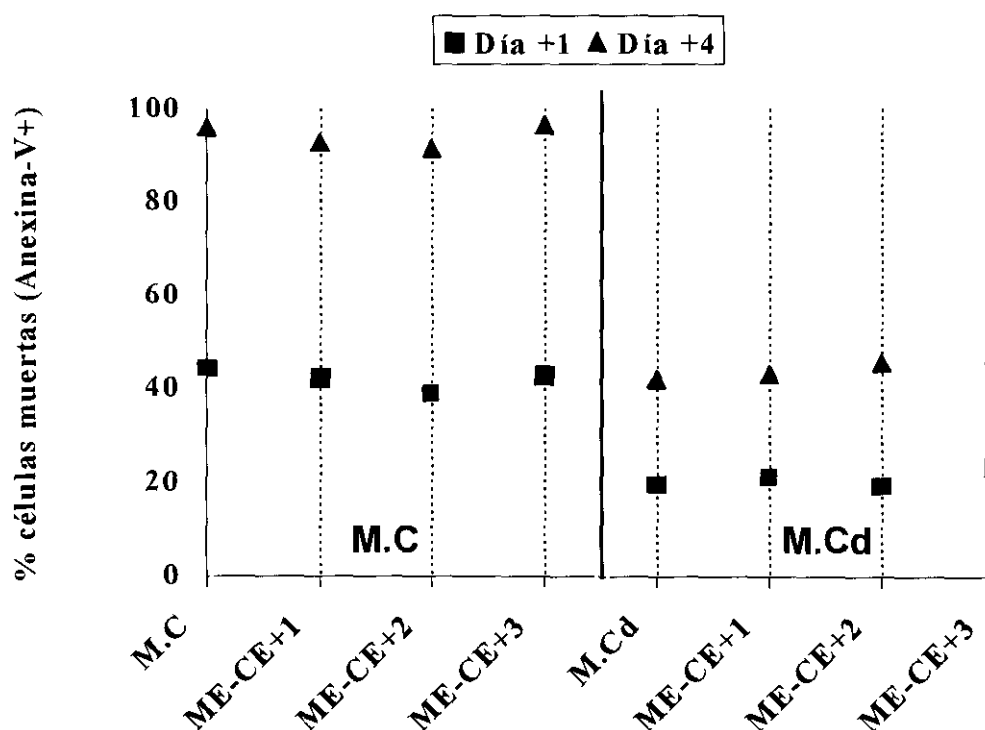


Fig. 11.- Efecto de las proteínas de ME procedentes de la CE en la apoptosis de las células leucémicas. Las CEs crecidas durante 1 (ME-CE+1), 2 (ME-CE+2) o 3 días (ME-CE+3) fueron lisadas y la ME resultante se utilizó para valorar su efecto sobre la viabilidad de las células de la LLC-B tras 1 y 4 días de cultivo en M.C o M.Cd. Los valores son expresados como la media del porcentaje de células apoptóticas en cultivos realizados por duplicado y corresponden a uno de cuatro experimentos en los que se obtuvieron resultados comparables.

4. 1. 2. 4. La fijación de la monocapa de las células endoteliales anula el efecto anti-apoptótico de las mismas sobre las células tumorales

Los anteriores experimentos suministraban una información contradictoria con respecto a los experimentos de contacto directo, por lo que diseñamos una nueva estrategia experimental con objeto de dilucidar la contribución real del contacto directo célula leucémica/CE en la viabilidad de las primeras. Para ello las CEs fueron fijadas con diferentes métodos de fijación celular, previamente descritos, que no alteran las estructuras básicas de la membrana citoplásmica. La fijación se realizó con paraformaldehído al 1 % (PFA 1%) (número de LLC-Bs estudiadas con este método, n=5), etanol al 50% (n=2) o glutaraldehído al 2% (n=6). Como muestra la Fig. 12, con células fijadas con PFA 1%, en ningún caso se consiguió un efecto inhibidor de apoptosis, ya que los resultados de la viabilidad celular en los cocultivos con células endoteliales fijadas (CE-Fij) eran iguales a sus respectivos controles (M.C o M.Cd) sin CEs en el fondo del pocillo. A diferencia del potente efecto inhibidor observado en los cocultivos en contacto directo con CEs no fijadas (Cont.dir), la fijación de las CEs hacía desaparecer totalmente el efecto atribuible al contacto directo. Además, un posible efecto sinérgico mediado por interacciones físicas y factores solubles fue descartado ya que la combinación de las CEs fijadas y el M.Cd previno la apoptosis *in vitro* de las células leucémicas de una manera similar a la observada con el M.Cd sólo. Resultados similares se obtuvieron cuando las CEs fueron fijadas con etanol o glutaraldehído (datos no mostrados).

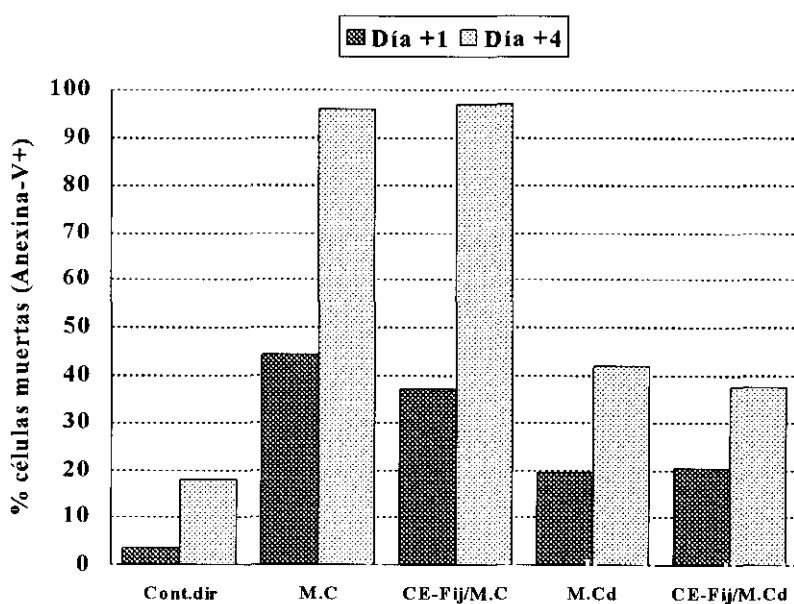


Fig. 12.- Efecto de la fijación de las CEs en la inhibición de la apoptosis de las células de la LLC-B. Las CEs crecidas durante 3 días fueron fijadas con PFA 1%. Las células leucémicas fueron cultivadas en M.C o M.Cd en ausencia o presencia de las CEs fijadas (CE-Fij) y los resultados se comparan con los obtenidos con el contacto directo (CE no fijadas). Los resultados corresponden a un ejemplo representativo.

4. 1. 2. 5. Las células endoteliales fagocitan las células apoptóticas de la LLC-B

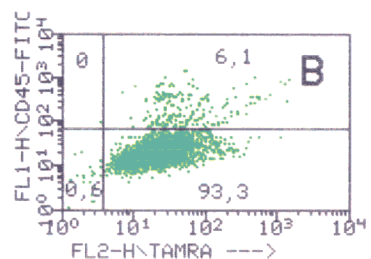
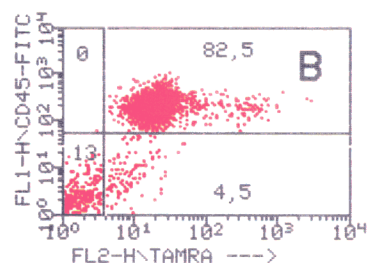
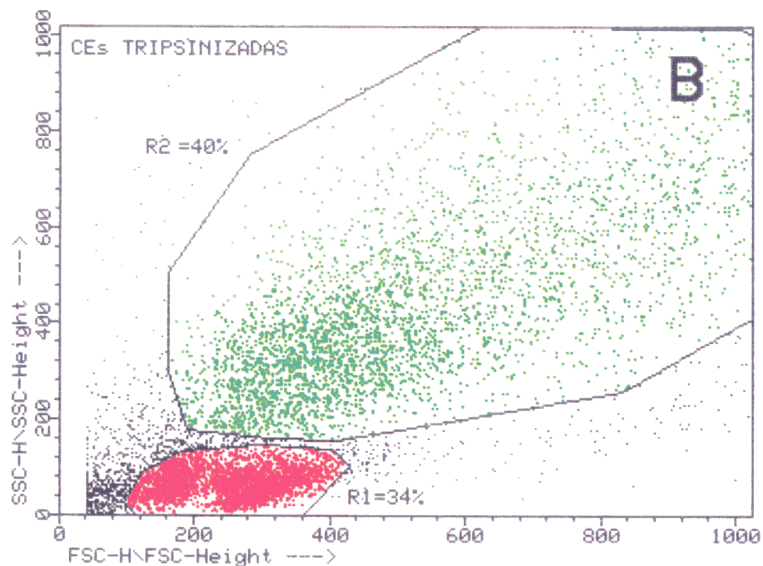
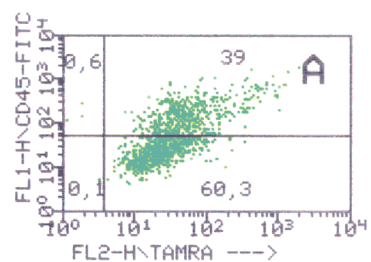
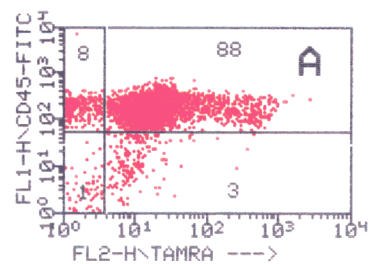
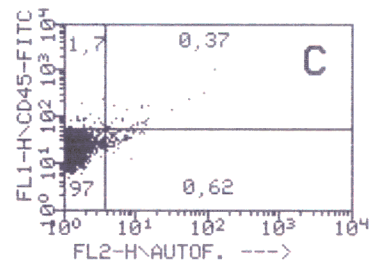
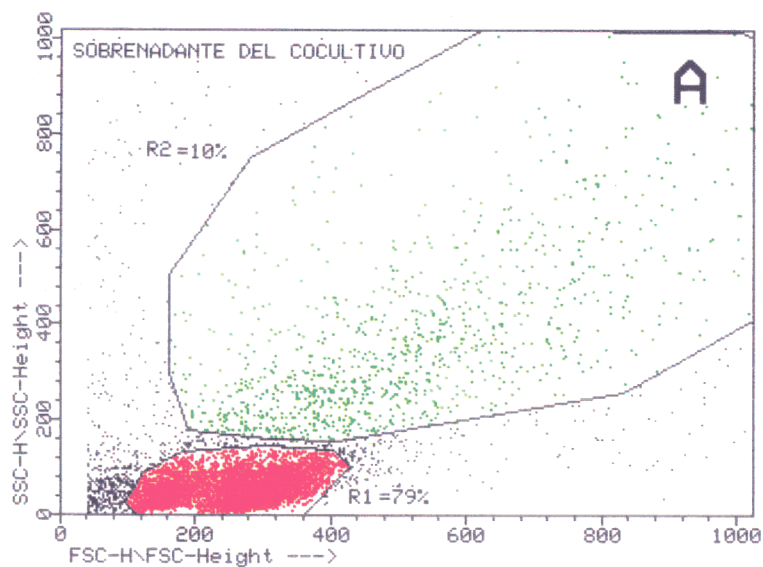
Todos los resultados obtenidos a lo largo del estudio del contacto celular en la inhibición de apoptosis (puntos 4.1.2.2 al 4.1.2.4) no justificaban la reducción tan extraordinaria y prolongada de la apoptosis en las células de la LLC-B descrita en los experimentos de contacto directo con CEs no fijadas. Por este motivo se planteó la posibilidad de una depuración selectiva de las células de LLC-B muertas en estos cocultivos y, como primer paso encaminado a clarificar esta hipótesis, se controlaron los tiempos de adquisición de 10.000 eventos en el citómetro por cada muestra obtenida de los cultivos de LLC-B (en todos los casos el número de células añadidas a tiempo cero fue de $0,5 \times 10^6$). Los tiempos de adquisición se muestran en este ejemplo representativo:

Día	Cont.dir	M.C	M.Cd
+1	1'	39''	37''
+2	1' 3''	34''	44''
+3	1' 20''	45''	37''

en el que se comprobó que el tiempo de adquisición era mayor en contacto directo que en M.C y M.Cd y que, además, en Cont.dir este tiempo se incrementaba con el paso de los días.

Debido a estos motivos, que hacían pensar en la fagocitosis por parte de las CEs de las células apoptóticas de la LLC-B, se procedió a detectar la fagocitosis mediante un método de CMF. Este método consiste en marcar los linfocitos (células diana) con un colorante denominado TAMRA que emite en el segundo canal de fluorescencia (FL-2). Posteriormente, las células leucémicas “cargadas” con TAMRA se añadieron al cocultivo con CEs. En los diferentes días de cocultivo se extrajeron las células presentes en el sobrenadante y las CEs tras su tripsinización. Tanto las células del sobrenadante, como las tripsinizadas se marcaron posteriormente con AcMo anti-CD45-FITC. La gran mayoría de las células recogidas en los sobrenadantes fueron linfocitos, como quedó claramente demostrado por sus características de FSC/SSC, así como por su doble positividad $CD45^+/TAMRA^+$. Por el contrario, en la fracción de células tripsinizadas la gran mayoría mostraban características de FSC/SSC compatibles con células endoteliales, si bien se detectaba también una fracción de linfocitos. Estos datos permitieron dibujar dos regiones claramente delimitadas alrededor de ambas poblaciones, tal y como se describe en la Fig. 13. En lo que respecta a la región dibujada alrededor de las CEs (R2), aquellos eventos $CD45^-/TAMRA^+$ indicaron fagocitosis (ingestión) del linfocito, mientras que los eventos $CD45^+/TAMRA^+$ indicaban linfocitos unidos (pero no fagocitados) a la CE.

Fig. 13.- Capacidad de fagocitosis de las CEs: impacto sobre la inhibición de la apoptosis de las células de la LLC-B. Las células leucémicas se marcaron con el colorante TAMRA en el día 0. Tras 3 días de cocultivo con las CEs, se determinó el porcentaje de CEs que habían adquirido este colorante, tanto en el sobrenadante (A) del cocultivo como en la monocapa previamente tripsinizada (B). Se muestra la autofluorescencia en FL2 y la señal dada por el AcMo anti-CD45-FITC en las CEs de día +3 para determinar los valores basales de ambas fluorescencias (C). R1 (rojo) y R2 (verde) definen las poblaciones de linfocitos y CEs, respectivamente, atendiendo a sus características de FSC y SSC. Los números en cada cuadrante de los dot plots de doble fluorescencia indican el porcentaje de células positivas.



La Fig. 14 muestra además la cinética de fagocitosis de las células leucémicas ($n=4$) por las CEs con respecto al tiempo y la determinación paralela de los porcentajes de células apoptóticas en contacto directo, M.Cd y M.C. En dicha figura queda claramente explicitado el incremento sustancial de linfocitos fagocitados con respecto a los días de cocultivo.

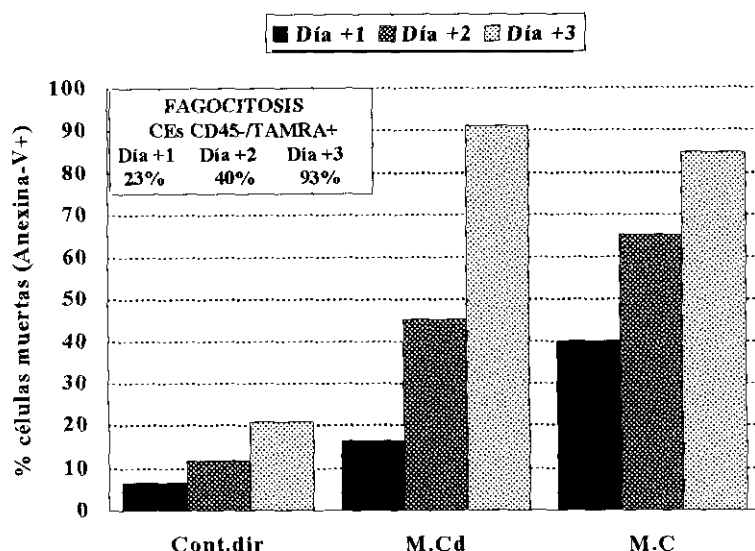


Fig. 14.- Cinética de la fagocitosis de las células leucémicas por las CEs. Los porcentajes de CEs CD45/TAMRA⁺ (CEs que han fagocitado células tumorales) se determinaron según se explicó en la Fig. 13 tras 1, 2 y 3 días de cocultivo. En este ejemplo representativo también se muestra el porcentaje de células Annexin-V⁺ detectadas en el sobrenadante de los mismos cocultivos (Cont.dir), así como en M.C y M.Cd.

Estos datos demuestran que las células leucémicas apoptóticas fueron internalizadas por las CEs, por lo que la aparente contribución del contacto directo en la supervivencia de los linfocitos B tumorales es inexistente o, al menos, irrelevante.

4. 2. LA SEÑAL MEDIADA POR LA CELULA ENDOTELIAL NO INDUCE PROLIFERACION NI DIFERENCIACION DE LA CELULA TUMORAL

El siguiente objetivo fue investigar si el efecto inhibitorio de apoptosis del M.Cd de las CEs sobre las células de la LLC-B estaba mediado o no por una señal proliferativa. Para ello, junto a la viabilidad estudiamos el ciclo celular de las células leucémicas que habían sido cultivadas con el M.Cd tras diferentes intervalos de tiempo en comparación con el de las células tumorales frescas (día 0). Como se observa en la Fig. 15, los linfocitos B CD5⁺ monoclonales rescatados del proceso apoptótico tras 1 y 2 días de cultivo con M.Cd fueron casi en su totalidad células que no habían entrado en ciclo, con una fase G0/G1 $\geq 99\%$ ($n=11$), equivalente a la de las células en fresco. Por lo tanto, la persistente viabilidad de las células tumorales cultivadas en M.Cd no estuvo mediada por un aumento de la proliferación celular.

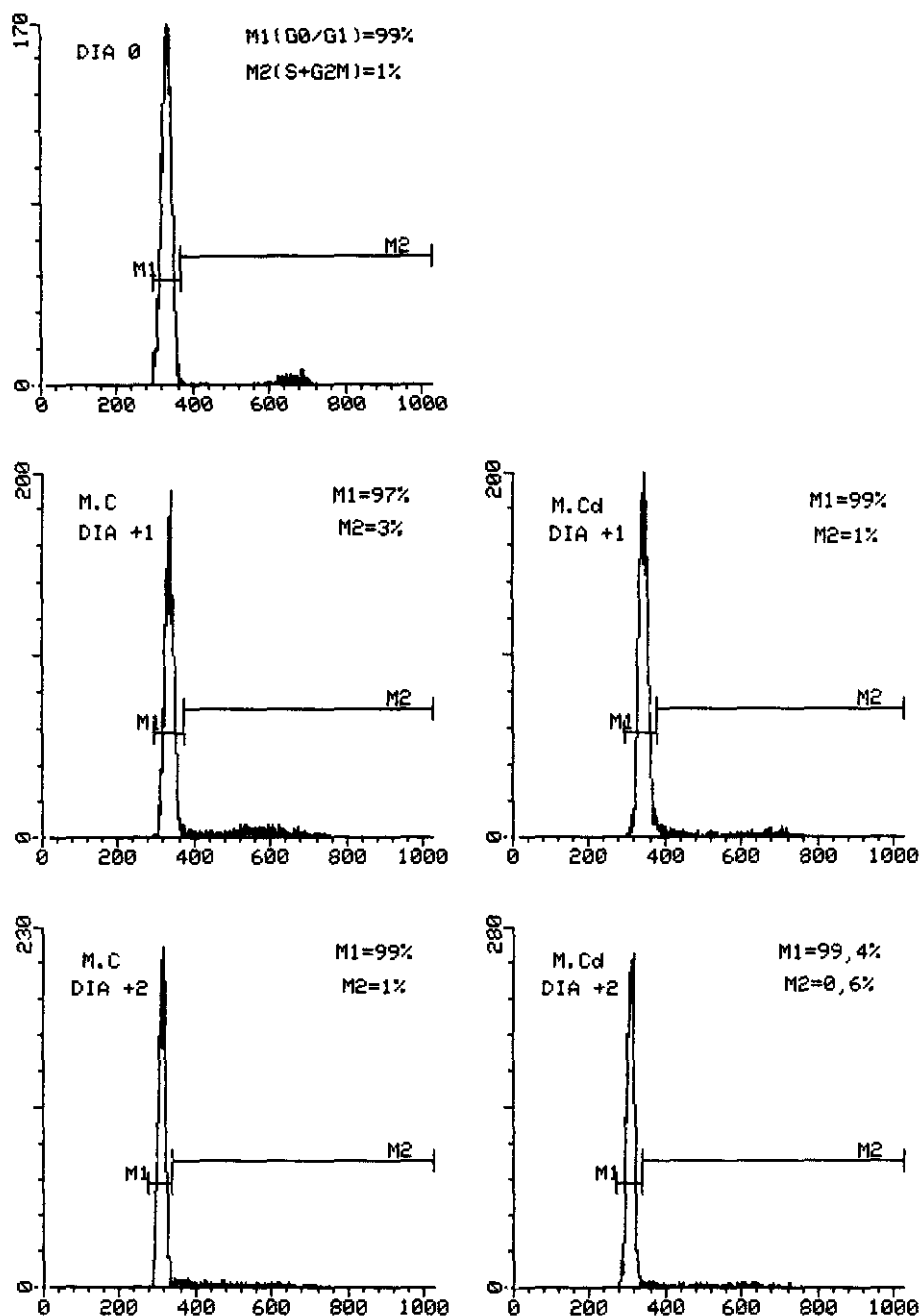


Fig. 15.- Análisis del ciclo celular de las células de la LLC-B en M.C y M.Cd. Ejemplo representativo, de 11 realizados, del ciclo celular de las células tumorales cultivadas en M.C o M.Cd en comparación con las células frescas (día 0). El análisis de células en fase S/G2M se evaluó tras 1 o 2 días de cultivo utilizando marcaje con IP de las células permeabilizadas con etanol. El análisis se realizó exclusivamente sobre las células viables.

El otro motivo de retraso de la muerte celular por el M.Cd en la LLC-B a descartar era la posible diferenciación celular. Para ello se realizó un marcaje de diversos antígenos de membrana a tiempo 0 que pueden servir de guía en el seguimiento de la célula B de LLC-B en cultivo, como son el CD5 y el CD23; y de otros que pueden servir para detectar la diferenciación de la célula B, como son CD20 (descenso de su expresión), CD38 (aumento de IMF), aparición de CD138 o cambios en la inmunoglobulina de superficie (Igs: su pérdida puede indicar diferenciación hacia célula plasmática). El estudio de estos antígenos en días sucesivos permitió asegurar que tampoco existía una señal de diferenciación por parte de los factores presentes en el M.Cd que diera lugar a un retraso en la muerte celular de la LLC-B, ya que ni los porcentajes de células positivas, ni la densidad de antígeno, se modificó significativamente tras 1, 2 y 3 días de cultivo (Tabla I).

		M.Cd	M.C	M.Cd	M.C	M.Cd	M.C
CD5	96 %	98 %	97 %	98 %	95 %	90 %	93 %
	(229)	(279)	(237)	(279)	(364)	(231)	(267)
CD23	78 %	77 %	72 %	95 %	82 %	90 %	62 %
	(109)	(101)	(47)	(195)	(63)	(236)	(64)
CD20	74 %	51 %	57 %	82 %	67 %	80 %	54 %
	(39)	(33)	(26)	(35)	(25)	(36)	(29)
CD38	22 %	24 %	29 %	28 %	21 %	24 %	14 %
	(32)	(36)	(31)	(35)	(29)	(38)	(35)
CD138	0,8 %	1,3 %	8 %	1,8 %	3,5 %	1,6 %	2,7 %
	(48)	(68)	(51)	(33)	(39)	(17)	(36)
Igs	96 %	96 %	96 %	96 %	95 %	94 %	95 %
	(38)	(38)	(43)	(44)	(40)	(48)	(31)
	Día 0	Día +1		Día +2		Día +3	

TABLA I.- Expresión de antígenos de superficie en las células tumorales cultivadas en M.Cd. Se muestran los resultados del porcentaje de células positivas para cada uno de los antígenos, así como la intensidad media de fluorescencia de los mismos (IMF; entre paréntesis), de un ejemplo representativo. Los controles isotópicos irrelevantes fueron siempre <2%. Los resultados comparan el perfil fenotípico tras 1, 2 y 3 días de cultivo en M.Cd con las células en fresco (día 0). El análisis se realizó por citometría de flujo adquiriendo exclusivamente las células viables.

4. 3. LA SEÑAL MEDIADA POR EL M.Cd DE LAS CE_s ES ESPECIFICA PARA LAS CELULAS DE LA LLC-B

Para mostrar la especificidad del efecto antiapoptótico del M.Cd de la CE se realizaron experimentos equivalentes a los realizados con células de LLC-B con otros tipos celulares en cierto modo relacionados con esta célula B neoplásica. Por una parte se estudió el efecto sobre linfocitos normales, y por otra sobre otros tipos de célula B neoplásica.

4. 3. 1. Efecto sobre los linfocitos de SP de individuos sanos

Se realizaron cultivos de linfocitos de SP procedentes de cuatro controles sanos. Para ello se utilizaron las células mononucleares totales, cultivándolas en M.C y en M.Cd, y se extrajeron en días sucesivos. En ningún caso se detectaron diferencias en el porcentaje de células muertas entre los linfocitos cultivados en M.C y en M.Cd (Fig. 16). Estos resultados muestran que el M.Cd no tiene efecto antiapoptótico sobre los linfocitos normales de SP.

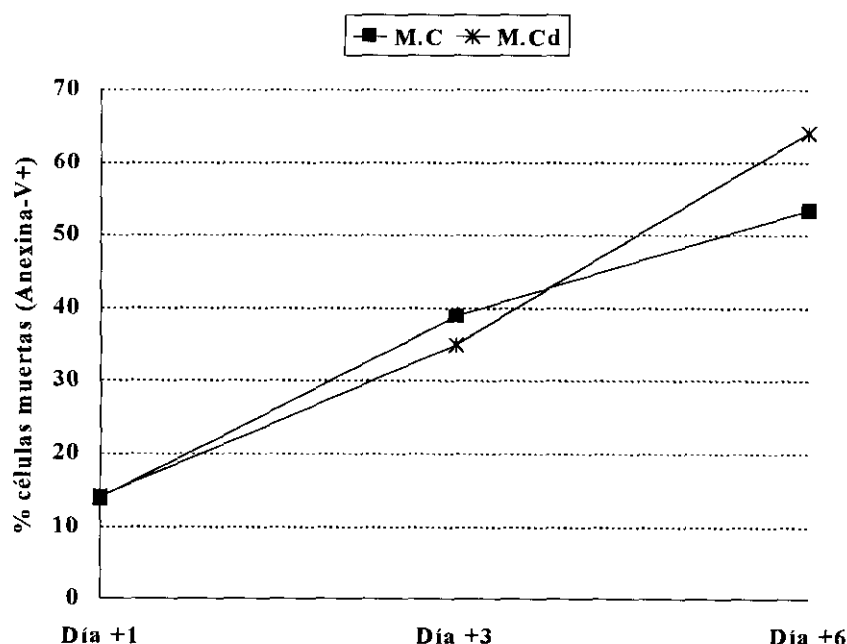


Fig. 16.- Efecto del M.Cd sobre los linfocitos de SP de controles sanos.
Ejemplo representativo de la mortalidad celular en los días +1, +3 y +6 en M.C y en M.Cd de PBLs cultivados a $0,5 \times 10^6$ células/ml.

4. 3. 2. Efecto sobre las células B de centro germinal y manto folicular de amígdala

Inicialmente se comprobó el efecto del M.Cd sobre células B totales de amígdala ($> 99\%$ de células B; $n=2$). Los cultivos se realizaron a tiempos cortos (1, 2.5 y 16 horas). Tal y como

se muestra en la Fig. 17, no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de células muertas entre M.C y M.Cd.

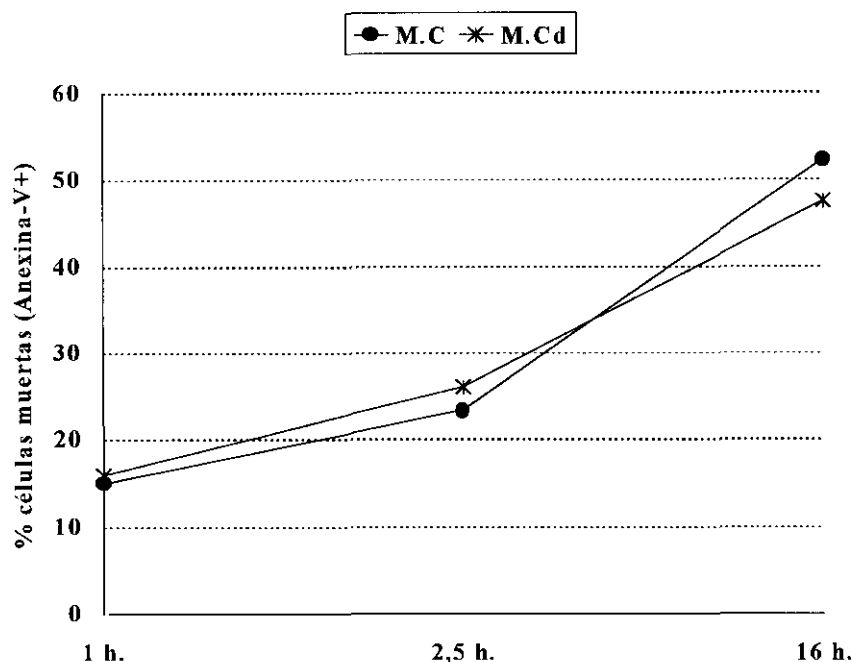


Fig. 17.- Efecto del M.Cd sobre la célula B de amígdala. Ejemplo representativo de la mortalidad de la población de linfocitos B a 1, 2.5 y 16 horas de cultivo en M.C y M.Cd.

Paralelamente se realizaron experimentos con las dos poblaciones de linfocitos B mayoritarias en este órgano: células B de centro germinal (CG) y células B de manto folicular (MF). La purificación de ambas poblaciones se inició con la depleción de la población de células T (>99,5% de células B) para después proceder a la separación en células de CG y MF atendiendo a la expresión de CD44 en su superficie celular. Las células B de CG son CD44⁻ y se obtuvieron por depleción negativa y, las células B de MF son CD44⁺ y se obtuvieron por selección positiva, seguida de la eliminación de las microesferas inmunomagnéticas mediante adición de DNasa. El grado de purificación de estas dos poblaciones fue superior al 99% en ambas fracciones. En los cultivos de células B tanto de CG como de MF no se observaron diferencias en la muerte celular entre las células cultivadas en M.C y en M.Cd (Fig.18). Por lo tanto, el M.Cd de las CEs no tiene efecto inhibitor de apoptosis en las células B totales de

amígdala en general, ni en sus principales subpoblaciones, las células de CG y MF.

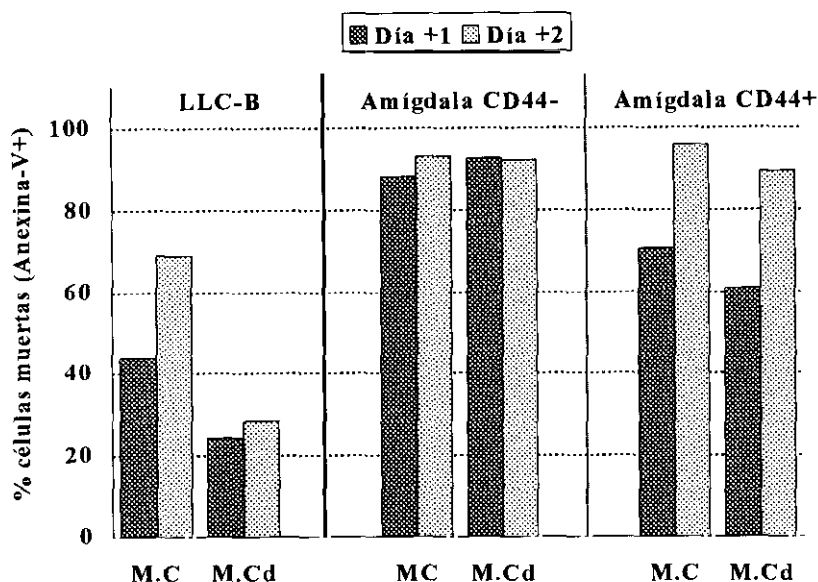


Fig. 18.- Efecto del M. Cd sobre las diferentes subpoblaciones de linfocitos B de amígdala. Células B de CG (CD44⁻) o de MF (CD44⁺) parcialmente purificadas fueron cultivadas en M.C o M.Cd durante 1 o 2 días. El análisis de las células apoptóticas en este ejemplo representativo se realizó con el método de Anexina-V/IP.

4. 3. 3. Efecto sobre otras células B neoplásicas distintas a la de la LLC-B

El estudio del efecto del M.Cd de las CE se ha comprobado sobre un caso de linfoma de manto leucemizado y sobre otro caso diagnosticado de leucemia prolinfocítica B (LPL-B).

Se utilizaron células B de SP de un linfoma de manto leucemizado que fueron cultivadas en M.C y en M.Cd. Se observó una inhibición de la apoptosis del 37% en M.Cd con respecto al M.C en el día +1. En día +2 ya no existía prácticamente diferencia en la viabilidad celular entre los dos medios.

El mismo experimento se realizó con un caso de LPL-B y se obtuvo una inhibición de la apoptosis del 32% a día +1 y del 37% a día +2 en M.Cd con respecto al M.C.

En estos dos ejemplos parece existir un discreto efecto inhibitor de la apoptosis por el M.Cd en el día +1 en el caso del linfoma de manto y en los días +1 y +2 en la LPL-B.

4. 4. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DEL FACTOR SOLUBLE CONTENIDO EN EL MEDIO CONDICIONADO

4. 4. 1. Termoestabilidad

El M.Cd mantuvo su actividad inhibidora de apoptosis de las células de la LLC-B después de 24 h. a 4°C. Además, el M.Cd congelado a -20°C mantuvo la actividad tras la descongelación.

El efecto promotor de supervivencia se siguió manteniendo tras varias descongelaciones (comprobado hasta 3 descongelaciones).

Por otra parte, cuando el M.Cd se sometió a diferentes temperaturas, 37°C, 56°C y 90°C durante 15 min. la actividad anti-apoptótica fue equivalente a la del medio almacenado a -20°C y descongelado.

Por lo tanto, el factor(es) soluble del M.Cd con actividad antiapoptótica mostró una elevada termoestabilidad.

4. 4. 2. Peso molecular

Para la determinación del peso molecular del factor soluble se llevó a cabo un estudio preliminar mediante la filtración del M.Cd a través de membranas de ultrafiltración con diferentes tamaños de poro. Una vez determinada la fracción en la que se retenía la actividad antiapoptótica (retenido o filtrado) se fraccionó el M.Cd en diferentes pesos moleculares a través de una columna de filtración sobre gel.

4. 4. 2. 1. La actividad anti-apoptótica es retenida en el concentrado de una membrana de ultrafiltración con un poro para 50 kDa (XM50)

El fraccionamiento inicial por peso molecular consistió en la filtración a través de un XM50 de un volumen conocido de M.Cd. El retenido de esta membrana está constituido mayoritariamente por moléculas > 50 kDa, aunque, debido al propio proceso de concentración en estas membranas, *parte de las moléculas de <50 kDa pueden quedar retenidas en el concentrado del XM50.*

Después de esta fase, el filtrado del XM50 se volvió a filtrar en un PM10, quedando en el retenido moléculas entre 10-50 kDa, mayoritariamente.

Se realizaron estudios funcionales con 10 LLC-Bs en los que se ensayó la actividad anti-apoptótica de: 1) retenido del XM50, 2) filtrado del XM50, 3) retenido del PM10 del filtrado del XM50 y 4) filtrado del PM10. Los retenidos se utilizaron en los ensayos funcionales a una concentración conocida, entre 1X y 3X (realizando la dilución en M.C) y en los filtrados se añadió un 10% de STF con el objeto de restaurar la concentración de proteínas totales original, ya que la proteína mayoritaria del M.Cd, la albúmina, queda retenida en el concentrado del XM50. Los resultados obtenidos en estos ensayos mostraron que la actividad anti-apoptótica quedaba retenida en el concentrado del XM50, y que dicha actividad desaparecía en el filtrado

del mismo (Fig. 19).

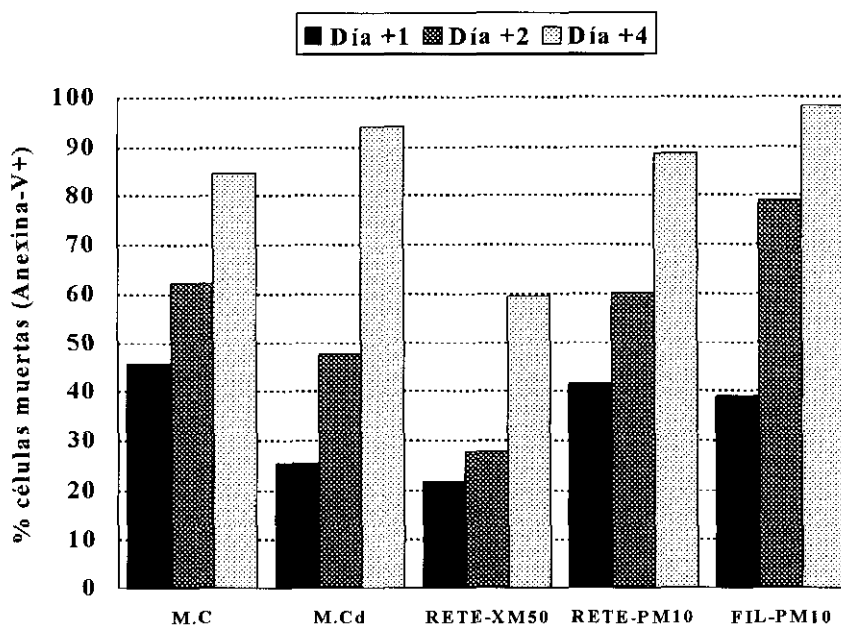


Fig. 19.- Efecto de los retenidos y filtrados de XM50 y PM10 en la apoptosis de las células de la LLC-B. Los retenidos del XM50 y del PM10 se probaron en el estudio funcional a una concentración 3X. Los resultados pertenecen a un caso representativo. Los valores de mortalidad en M.C y M.Cd se utilizaron como controles positivo y negativo de apoptosis, respectivamente.

4. 4. 2. 2. El factor anti-apoptótico eluye en las fracciones de 40-60 kDa de un S-200

El retenido del XM50 se sometió a filtración sobre gel en una columna de sephacryl S-200, equilibrada en PBS y previamente calibrada con proteínas de peso molecular conocido: albúmina (67 kDa), HLA soluble (55 kDa) y β_2 -microglobulina (12 kDa).

En primer lugar, se aplicaron a la columna 5 ml. de un retenido de XM50 concentrado 10 veces (10X). Los ensayos funcionales de las fracciones obtenidas se realizaron con un 50% de la fracción+50% medio completo. Las fracciones fueron probadas a nivel funcional en 2 LLC-B (en una se probaron las fracciones pares y en otra las impares). En la Fig. 20 se muestra un ejemplo, utilizando las fracciones pares, en el que se detectó una inhibición de la apoptosis entre las fracciones 26 y 30, ambas inclusive. En la otra LLC-B se probaron las fracciones impares, detectándose una inhibición de la apoptosis entre las fracciones 27 y 31, ambas inclusive (imagen no mostrada).

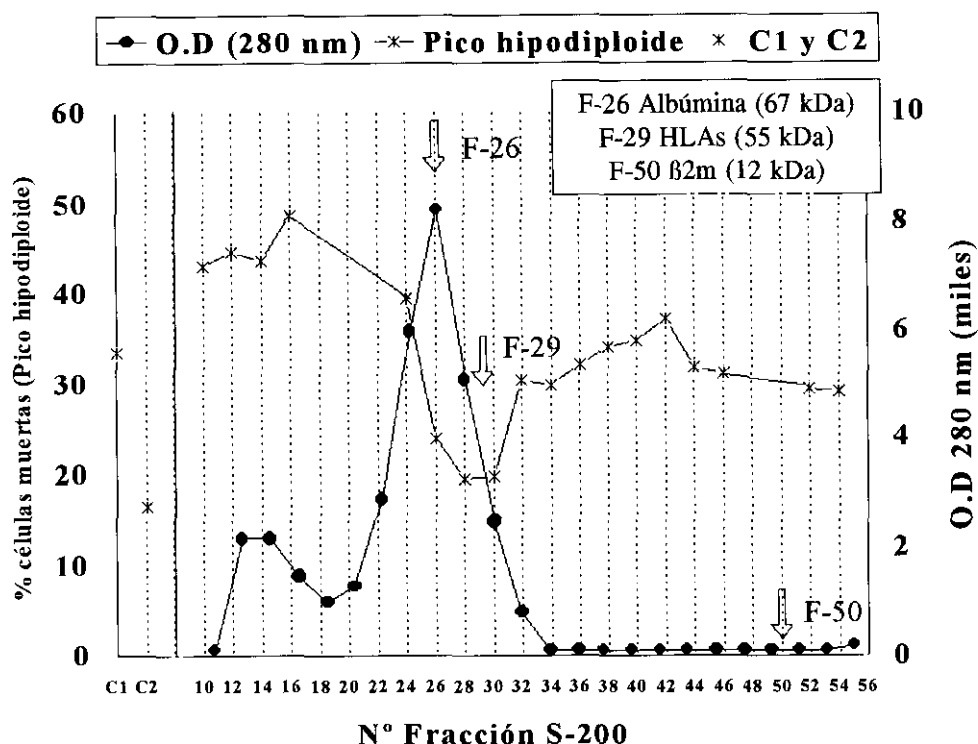


Fig. 20.- Fraccionamiento del M.Cd y actividad inhibidora de la apoptosis en las células de la LLC-B de las diferentes fracciones. El M.Cd (10X) se fraccionó en una columna de exclusión molecular S-200. Las diferentes fracciones fueron ensayadas en su capacidad de promover la supervivencia de las células leucémicas. Si el factor soluble eluyera en 7 fracciones, éste estaría $\approx 1,4X$ en cada fracción y $0,7X$ en el pocillo. El volumen final por pocillo fue 1 ml (0,5 ml de cada fracción + 0,5 ml de M.C). C1: 0,5 ml PBS + 0,5 ml M.C; C2: retenido sin fraccionar 1X del XM50. Las flechas indican los picos de O.D máxima de las proteínas utilizadas para calibrar la columna. Los resultados del porcentaje de células muertas se obtuvieron a día +2 de cultivo.

En una segunda filtración sobre la misma columna de sephacryl S-200, y con el fin de obtener una concentración mayor del factor antiapoptótico en las fracciones, se corrió una columna en idénticas condiciones, aplicando a la misma 5 ml de retenido del XM50 de M.Cd concentrado 30X. El ensayo funcional de las fracciones se realizó tal y como se describió en el experimento correspondiente a la Fig. 20. La diferencia de este S-200 con el primero sólo estriba en la concentración de la muestra de partida. Esto hace que, si suponemos que el factor soluble que nos interesa eluyera en 7 fracciones, en el primer S-200 el factor estaría aproximadamente en cada fracción a una concentración $1,4X$, es decir, a una concentración $0,7X$ en el cultivo. Con las mismas premisas que en el caso anterior, en el segundo S-200 el factor estaría

aproximadamente en cada fracción a una concentración 4,3X, y en el pocillo a 2,1X.

En este segundo S-200 se ensayaron funcionalmente las fracciones en 4 LLC-Bs. En 2 se probaron las fracciones pares y en 2 las impares, obteniéndose resultados muy parecidos a los encontrados en el primer S-200: se detectó una actividad antiapoptótica entre las fracciones 26 y 30, ambas inclusive, para las LLC-Bs ensayadas con fracciones pares (imágenes no mostradas); y entre las fracciones 27 y 31, ambas inclusive, para las LLC-Bs ensayadas con fracciones impares (Fig. 21).

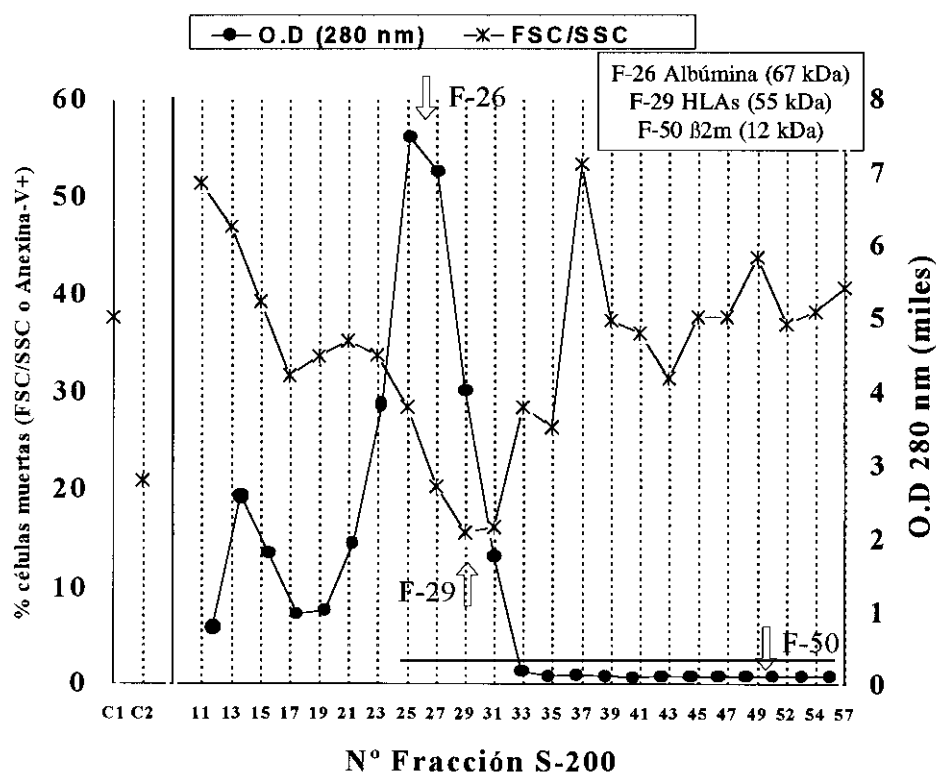


Fig. 21.- Fraccionamiento del M.Cd y actividad inhibidora de la apoptosis de las células de la LLC-B de las diferentes fracciones determinada por la determinación de los parámetros de *scatter*. El M.Cd concentrado (30X) en un XM50 se fraccionó en una columna de sephacryl S-200. Si el factor soluble eluyera en 7 fracciones, éste estaría $\approx$ 4,3X en cada fracción, y 2,14X en el pocillo. Los resultados de % mortalidad se obtuvieron a día +3 de cultivo. C1: 0,5 ml. M.C + 0,5 ml. PBS, y C2: retenido 3X sin fraccionar del XM50. Las flechas indican los picos de O.D máxima de las proteínas utilizadas para calibrar la columna.

Las proteínas incluidas entre las fracciones 26 y 31, atendiendo al calibrado de la columna, corresponderían a moléculas con pesos moleculares comprendidos entre 40-60 kDa.

4. 5. IL-6 ES EL FACTOR ANTI-APOPTOTICO CONTENIDO EN EL MEDIO CONDICIONADO

4. 5. 1. Anticuerpos neutralizantes anti-IL-6 bloquean el efecto anti-apoptótico del medio condicionado

El paso siguiente para la caracterización del factor(es) soluble inhibidor de la apoptosis de la LLC-B se realizó con el M.Cd en crudo. Se utilizaron diversos anticuerpos anti-citoquinas y se analizó la muerte celular. Se eligieron anticuerpos frente a citoquinas que se sabe pueden ser secretadas por células endoteliales como GM-CSF, IL-6 e IL-8, y otras que, aunque en principio no estaban descritas como citoquinas secretadas por CEs, habían sido estudiadas en relación a la apoptosis de la LLC-B como IFN γ , IL-4, IL-5, IL-7, IL-10 e IL-13. Se llevó a cabo un *screening* en 5 LLC-Bs utilizando las concentraciones de anticuerpo capaces de neutralizar las siguientes concentraciones de citoquina: 50 μ g/ml de anticuerpo policlonal anti-IFN γ , bloquean 10 ng/ml de IFN γ ; 20 μ g/ml de policlonal anti-GM-CSF, bloquean 40 ng/ml de GM-CSF; 8 μ g/ml de policlonal anti-IL-4, bloquean 2 ng/ml de IL-4; 20 μ g/ml de monoclonal anti-IL-5, bloquean 20 ng/ml de IL-5; 200 μ g/ml de policlonal anti-IL-6, bloquean 10 ng/ml de IL-6; 20 μ g/ml de monoclonal anti-IL-7, bloquean 40 ng/ml de IL-7; 4 μ g/ml de monoclonal anti-IL-8, bloquean 34 ng/ml de IL-8; 50 μ g/ml de policlonal anti-IL-10, bloquean 20 ng/ml de IL-10 y 10 μ g/ml de policlonal anti-IL-13 bloquean 4 ng/ml de IL-13. Todos los anticuerpos se preincubaron 2 h. a 37° con el M.Cd a las concentraciones indicadas.

Los anticuerpos anti-IFN γ , anti-IL-10 y anti-IL13 produjeron un aumento no significativo de la mortalidad celular en 2/5 LLC-Bs y ningún efecto en 3/5 (Fig. 22). El único anticuerpo anti-citoquina que produjo un claro bloqueo del efecto anti-apoptótico del M.Cd en las 5 LLC-Bs estudiadas, tal y como se muestra en la Fig. 22, fue el anticuerpo policlonal anti-IL6. En todas las LLC-Bs estudiadas la incubación con el anticuerpo policlonal anti-IL-6 generó un porcentaje de células apoptóticas superior al M.Cd y muy parecido al del M.C, superando incluso a éste en las concentraciones más elevadas de anticuerpo anti-citoquina. Estos resultados fueron corroborados con 7 LLC-Bs más, con el resultado final de 12/12 LLC-Bs claramente susceptibles al efecto de los anticuerpos anti-IL-6.

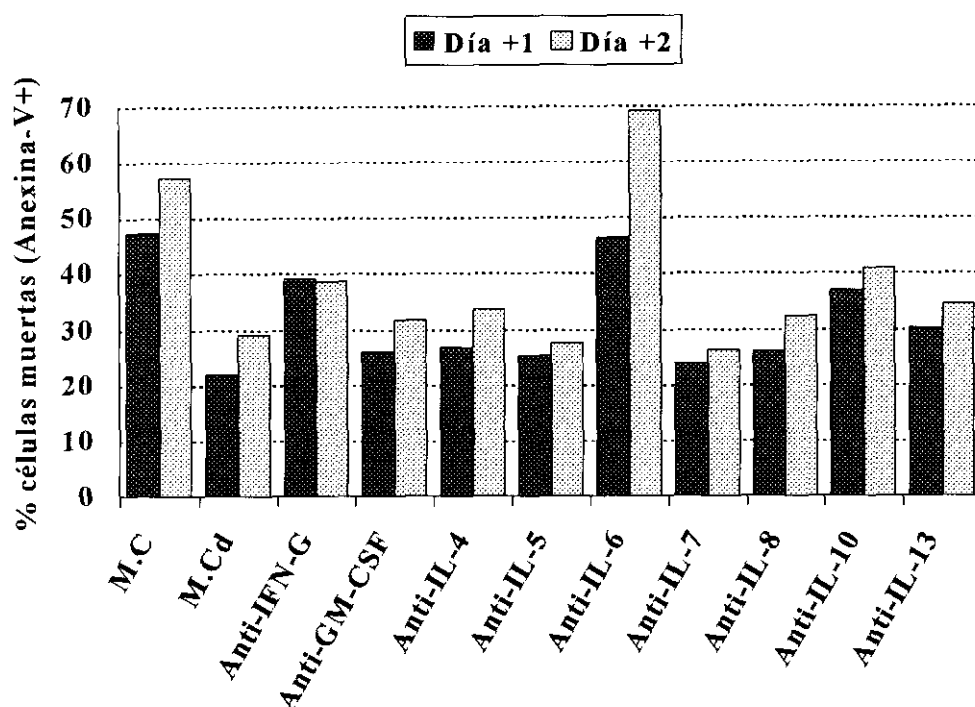


Fig. 22.- Efecto de diversos anticuerpos anti-citoquinas sobre la actividad anti-apoptótica del medio condicionado. El M.Cd se incubó previamente durante 2 horas con los anticuerpos neutralizantes anti-citoquinas a las concentraciones referidas en los resultados. Este diagrama de barras ilustra los resultados de un experimento representativo en el que las células de la LLC-B fueron cultivadas durante 1 y 2 días.

También se realizaron ensayos del efecto de dosis-respuesta con diferentes concentraciones de anticuerpo policlonal anti-IL-6 en 3 LLC-B, desde 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (que neutralizan 0,625 ng/ml. de IL-6) hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ (que neutralizan 5 ng/ml. de IL-6) (Fig. 23). En 2 LLC-Bs el efecto bloqueante se detectó a partir de la concentración más baja de anti-IL-6 ensayada (12,5 $\mu\text{g/ml}$), y este efecto fue mayor a medida que se incrementaba la concentración de anticuerpo, aunque con discretas diferencias en la curva dosis-respuesta entre una LLC-B y otra. En la tercera LLC-B estudiada el efecto bloqueante no se evidenció hasta una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. En todos los casos se objetivó una respuesta dependiente de la concentración.

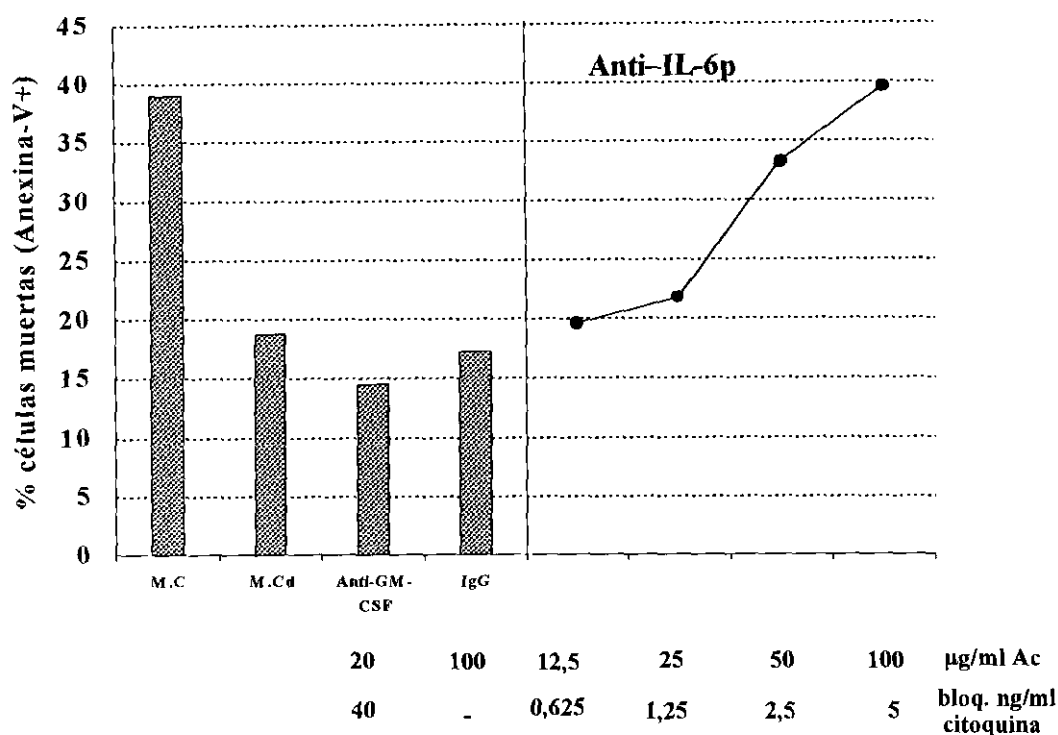


Fig. 23.- Efecto dependiente de dosis de los anticuerpos anti-IL-6 bloqueantes de la actividad anti-apoptótica del M.Cd. Los anticuerpos anti-citoquinas se utilizaron siguiendo un protocolo idéntico al descrito en la Fig. 22. Como control negativo se utilizó IgG de un suero preimmune de conejo. El gráfico muestra la cantidad de Ac policlonal utilizado y su capacidad para bloquear diferentes cantidades de citoquina, en un ejemplo representativo analizado a día +1.

En cualquier caso, la conclusión de estos experimentos es clara: los anticuerpos anti-IL6 son capaces de neutralizar el efecto del M.Cd. Así pues, ¿será la IL-6 el factor soluble, contenido en el medio condicionado, responsable del efecto anti-apoptótico de éste?

4. 5. 2. Las células de la LLC-B expresan el receptor de IL-6 (CD126) en su membrana

Una vez constatado el efecto de los anticuerpos neutralizantes anti-IL-6 sobre el efecto inductor de supervivencia del M.Cd, se estudió la expresión del receptor de membrana para la citoquina IL-6 (IL-6R o CD126) en diferentes LLC-Bs. Inicialmente utilizamos un AcMo anti-CD126-PE por considerar que el conjugado con PE podría darnos una señal de fluorescencia claramente discriminable de la obtenida con el anticuerpo irrelevante. El marcaje con dicho AcMo se realizó con la sangre completa (y posterior lisis de los hematíes) (n=6) y/o con células mononucleares tras la separación con Ficoll (n=7), obteniéndose los siguientes resultados: en sangre completa, el $23 \pm 22,9\%$ de las células CD19⁺ expresaban CD126 (lím. mín=2%, lím.

máx=66%), mientras que en la fracción de las células mononucleares el $6\% \pm 8\%$ de las células CD19⁺ expresaron niveles de IL-6R suficientes para ser detectados en el citómetro de flujo (lím. mín=0%, lím. máx=18%). En 4 LLC-Bs donde se determinaron los niveles en membrana del antígeno CD126 tanto en sangre total como en las células separadas con Ficoll, el porcentaje de células positivas se redujo (Fig. 24) en las células obtenidas tras el gradiente de densidad con respecto a los porcentajes de positividad para las células en la SP completa. Ya que ni nuestros resultados experimentales ni la poca literatura existente al respecto eran comparables con los datos antes mostrados sobre la expresión de CD126, la detección de este antígeno se determinó mediante un método amplificado de fluorescencia: incubación inicial con IL-6-biotina y revelado con avidina-FITC. Este tipo de marcaje se realizó en 9 LLC-Bs, obteniéndose los siguientes resultados: media aritmética=77%; desviación típica=12,8; lím. mín=57% y lím. máx=97%. De estos datos se deduce que las células de todas las LLC-Bs estudiadas (9/9) unían de manera efectiva IL-6 (se muestra un ejemplo representativo en la Fig. 24). La especificidad de la unión se confirmó incubando previamente las células con un anticuerpo bloqueante de la unión IL-6/IL-6R que condujo a una casi total inhibición (>99%) en la unión de la IL-6 biotina.

También se investigó la expresión del co-receptor de CD126, la glicoproteína gp130 o CD130. En este caso sólo se realizó marcaje directo con anticuerpos monoclonales anti-CD130-PE en 7 LLC-Bs, tanto en sangre completa como en células mononucleares. En sangre completa se obtuvieron los siguientes resultados: media aritmética=6,4%; desviación típica=5,6; lím. mín=0,7% y lím. máx=24%. En células separadas los resultados fueron: media aritmética=2,8%; desviación típica=5,7; lím. mín=0% y lím. máx=15,6%. Como se puede deducir de estos datos, la detección de CD130 por CMF, mediante marcaje directo, probablemente presente el mismo problema de baja sensibilidad que se ha comentado anteriormente para CD126 (Fig. 25).

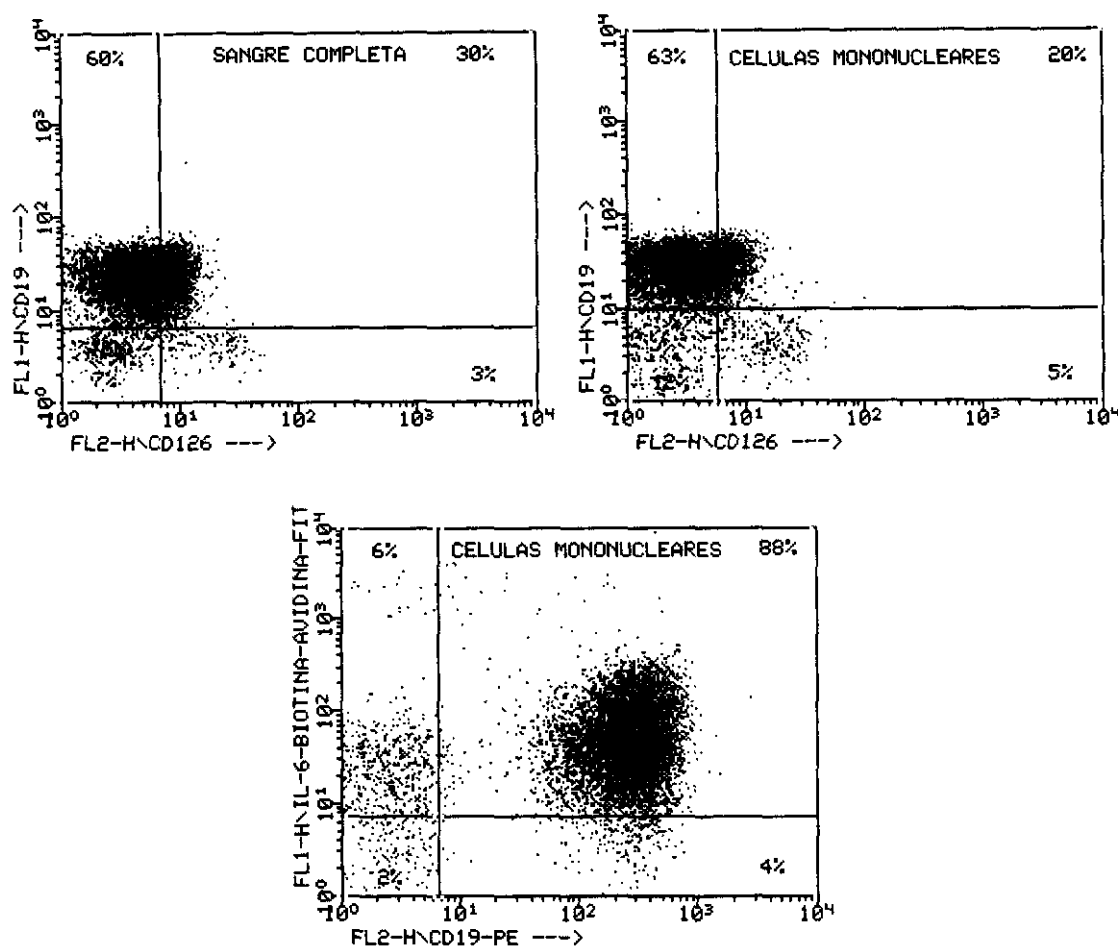


Fig. 24.- Expresión del receptor de IL-6 (IL-6R o CD126) en las células de la LLC-B. En los *dot plots* superiores se muestran los resultados del marcaje directo con anticuerpos monoclonales anti-CD126-PE, en sangre completa y en células mononucleares. En el *dot plot* inferior se muestra el marcaje con IL-6-biotina. Los cuadrantes de las imágenes superiores se colocaron atendiendo a sus controles isotípicos respectivos y en la imagen inferior atendiendo a su control negativo (proteína biotinilada, incluida en el kit para IL-6-biotina, que no se une específicamente a ningún receptor linfocitario). Se muestran los resultados de los tres tipos de marcaje en un ejemplo representativo.

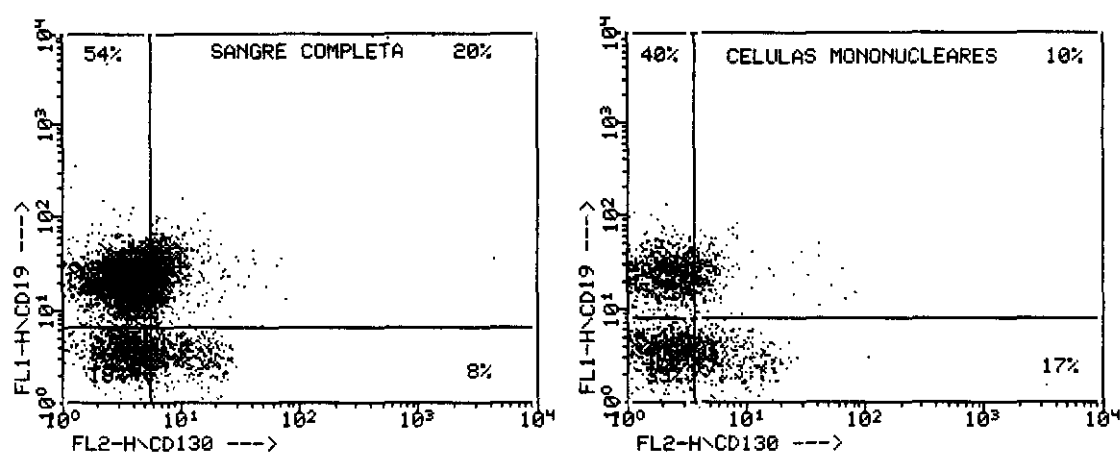


Fig. 25.- Expresión del antígeno CD130 en la membrana de las células de la LLC-B. Las células en sangre completa o tras la separación con Ficoll (células mononucleares) se incubaron con cantidades saturantes de AcMo anti-CD130-PE y anti-CD19-FITC. Los resultados de este ejemplo representativo fueron obtenidos sobre una ventana dibujada alrededor de los linfocitos. Los cuadrantes se colocaron atendiendo a sus controles isotópicos respectivos.

4. 5. 3. La IL-6 del medio condicionado de la CE tiene un peso molecular de 40-60 kDa

El hecho de que anticuerpos neutralizantes anti-IL-6 bloqueen completamente el efecto inductor de supervivencia del M.Cd en las células tumorales (Fig. 23) y, por otro lado, que los resultados del fraccionamiento del M.Cd indiquen que el factor(es) soluble posee un peso molecular aparente de 40-60 kDa (Fig. 20 y 21) aportaba dos informaciones aparentemente contradictorias: la IL-6, una proteína con un peso molecular de aproximadamente 25-32 kDa, eluye con un peso molecular aparente que dobla el esperado. Con objeto de aclarar estos datos, se cuantificaron los niveles de IL-6 en todas las fracciones del S-200 obteniéndose los siguientes resultados (Fig. 26):

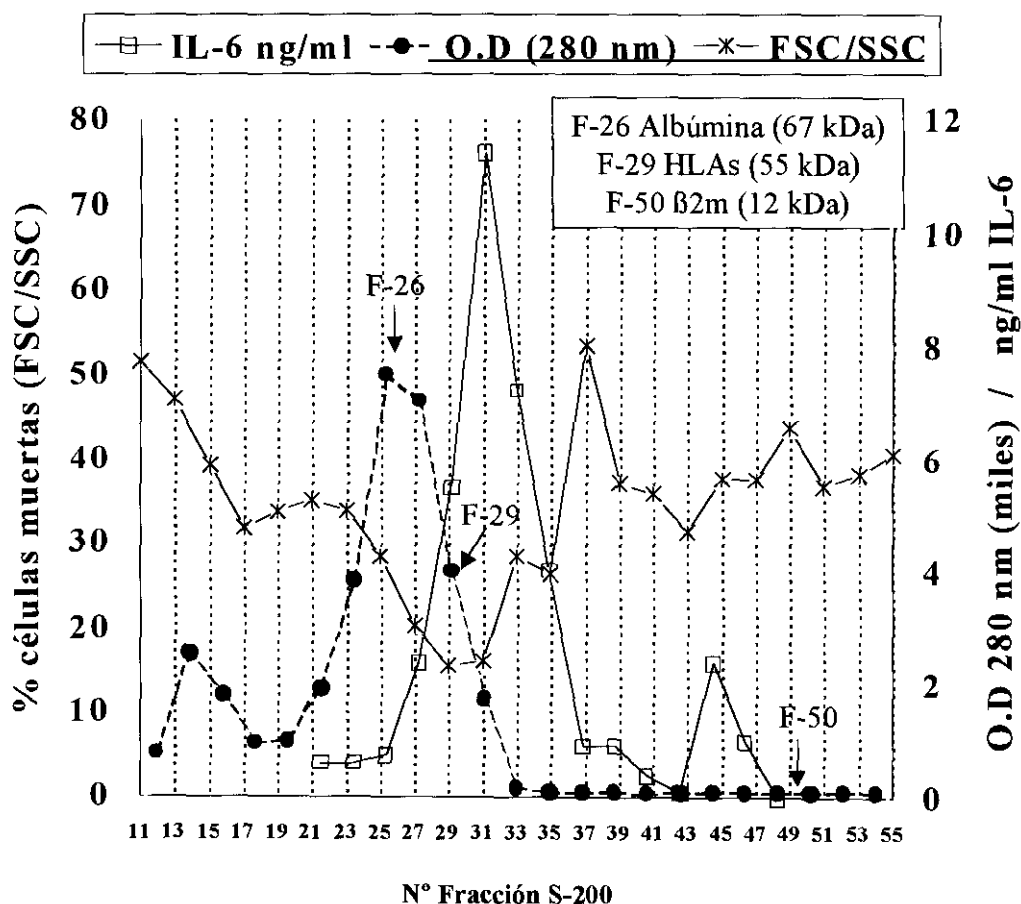


Fig. 26.- Cuantificación de IL-6 en las fracciones impares del perfil de elución del S-200. Los niveles de IL-6 de las fracciones impares se cuantificaron con un ELISA para IL-6. Los resultados de este experimento representativo expresan el porcentaje de células apoptóticas atendiendo a los parámetros de *scatter*. Las flechas indican la fracción de O.D máxima de las proteínas utilizadas para calibrar la columna.

- 1) IL-6 inferior a 1 ng/ml o no detectable, entre las fracciones 1-25, ambas inclusive
- 2) detección de IL-6 entre las fracciones 26-35, ambas inclusive, con una elución en forma de pico, siendo la fracción de máxima concentración de IL-6 la número 31 (11,44 ng/ml), detectándose en los dos extremos del pico de elución 1,6 ng/ml (fracción 26) y 4 ng/ml. (fracción 35), respectivamente
- 3) detección de otro pico de IL-6 entre las fracciones 45 y 47, ambas inclusive, con un pico máximo de 2,4 ng/ml en la fracción número 45
- 4) IL-6 inferior a 1 ng/ml o no detectable, entre las fracciones 36-44 y entre 48-51.

Por lo tanto el fraccionamiento del M.Cd por peso molecular realizado en el S-200 muestra un patrón de elución de 2 picos de IL-6, uno entre 40-60 kDa y otro en torno a los 25 kDa. Además, si se correlacionan estos picos con el pico de máxima inhibición de apoptosis, se observa que éste coincide con el pico de elución de IL-6 de 40-60 kDa (Fig. 26). No se detectan indicios de inhibición a nivel del pico de IL-6 de 25 kDa (fracción 45) utilizada a una concentración idéntica (1,2 ng/ml en el pocillo) a la IL-6 de 40-60 kDa que sí inhibía la apoptosis de la LLC-B (fracción 27).

La proporción aproximada de IL-6 de 40-60 kDa y de 25 kDa se ha calculado considerando varios datos. Por una parte se ha cuantificado la IL-6 mediante ELISA en el retenido del M.Cd en un XM-50 a una concentración 30X, que fue de 180 ng/ml, es decir, 6 ng/ml a una concentración 1X; y también se ha cuantificado la IL-6 contenida en el retenido de un PM-10 concentrado 15X a partir del filtrado obtenido del XM-50, y contenía 35 pg/ml, es decir, 2.4 pg/ml a una concentración 1X. Esto significa que hay 2.500 veces más IL-6 en el retenido del XM-50 que en el filtrado. Así pues, la IL-6 quedó mayoritariamente retenida en el XM-50 cuando se concentró el M.Cd (30X) en esta membrana, con cantidades prácticamente vestigiales de esta citoquina en el filtrado. Por otra parte, sabemos que la concentración de IL-6 de 40-60 kDa tras fraccionar el retenido del XM-50 en un S-200 es aproximadamente 10 veces superior a la IL-6 de 25 kDa. Por tanto, si despreciamos la insignificante cantidad de IL-6 que pasa la membrana del XM-50, la proporción entre IL-6 de 40-60 kDa y de 25 kDa es de aproximadamente 10:1.

En resumen, se puede concluir que la IL-6 derivada de las células endoteliales con capacidad inhibidora de la apoptosis de la LLC-B, tiene un peso molecular comprendido entre 40-60 kDa.

4. 5. 4. Marcaje metabólico e inmunoprecipitación de la IL-6 del medio condicionado

Para una caracterización más completa de la IL-6 producida por las células endoteliales (puesto que el peso molecular de la IL-6 descrito en la literatura es de 25-32 kDa) se realizó un marcaje metabólico con metionina-³⁵S de las proteínas sintetizadas *de novo* por las CEs. Se recolectaron tanto el sobrenadante (SN) como las CEs (después de la tripsinización). Las células se lisaron y, tras centrifugación, se recogió la fracción correspondiente al citosol. La inmunoprecipitación del SN y del citosol se realizó con un anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-6. Los inmunoprecipitados (IPr) tanto del SN como del citosol se resuspendieron en dos tipos de tampón de muestra: 1) sin β -mercapto-etanol, para mantener la muestra en condiciones no reductoras y 2) con β -mercapto-etanol, es decir, bajo condiciones reductoras. Las muestras se corrieron en un SDS-PAGE al 12 % (Fig. 27).

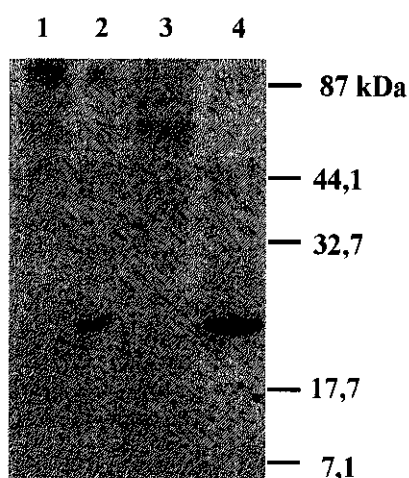


Fig. 27.- Detección de la IL-6 contenida en el M.Cd mediante marcaje metabólico e inmunoprecipitación. Las células ECV-304 fueron cultivadas durante 16 h. con [³⁵ S] Metionina y el sobrenadante fue inmunoprecipitado con un Ac policlonal anti-IL-6 de conejo en ausencia (1 y 2) o en presencia (3 y 4) de β -mercaptoetanol. Los carriles 1 y 3 se corresponden con el último preaclarado y los carriles 2 y 4 con los inmunoprecipitados. Las muestras fueron corridas en SDS-PAGE 12 % y analizadas tras autorradiografía. A la derecha se indican los pesos moleculares de los marcadores estándar.

Este tipo de experimento (marcaje, inmunoprecipitación y electroforesis en SDS-PAGE) se realizó en tres ocasiones y en todas los resultados fueron los siguientes: 1) en las muestras del IPr del sobrenadante aparece una única banda, que es específica, de aproximadamente 25 kDa. Esta banda es más intensa en la muestra con β -mercapto-etanol que en la que no lo tiene (Fig. 27) y 2) en las muestras de IPr del citosol aparecen numerosas bandas si bien ninguna de ellas parece ser específica, puesto que también se detectaban en mayor o en menor medida en el correspondiente preaclarado (imágenes no mostradas).

Por lo tanto, estos resultados sugieren fuertemente que la IL-6 de 40-60 kDa detectada por

métodos cromatográficos no es resistente a las condiciones desnaturalizantes del SDS-PAGE. En cualquier caso, la nitidez de la única banda de 25 kDa prácticamente excluye la posibilidad de que la IL-6 interaccione con otro tipo de proteína sintetizada *de novo* por la CE y contenida en el M.Cd.

4. 5. 5. Comparación del efecto anti-apoptótico de la IL-6 del M.Cd de la célula endotelial y de otra IL-6 natural

También se comprobó el efecto inhibidor de la apoptosis de una IL-6 natural, no recombinante, producida por células de osteosarcoma. Se estudió su actividad en 6 LLC-Bs, utilizando concentraciones entre 7-400 ng/ml añadidas al M.C. En 1/6 LLC-B ninguna concentración tuvo actividad inhibidora. En las otras 5 LLC-Bs se observaron resultados similares a los que aparecen en la Fig. 28; es decir, inhibición de apoptosis a partir de 15 ng/ml, consiguiendo una inhibición máxima en 200 ng/ml (concentraciones superiores no consiguen un mayor efecto), equivalente a la conseguida por un M.Cd de CEs con 7 ng/ml. de IL-6 (Fig. 28).

Por lo tanto, se observa que la IL-6 natural de células de osteosarcoma consigue en la mayoría de los casos (5/6) retrasar la apoptosis de la LLC-B, si bien las concentraciones necesarias para alcanzar el mismo efecto que el M.Cd de CEs son muy superiores (≈ 28 veces) a las de la IL-6 de dicho M.Cd.

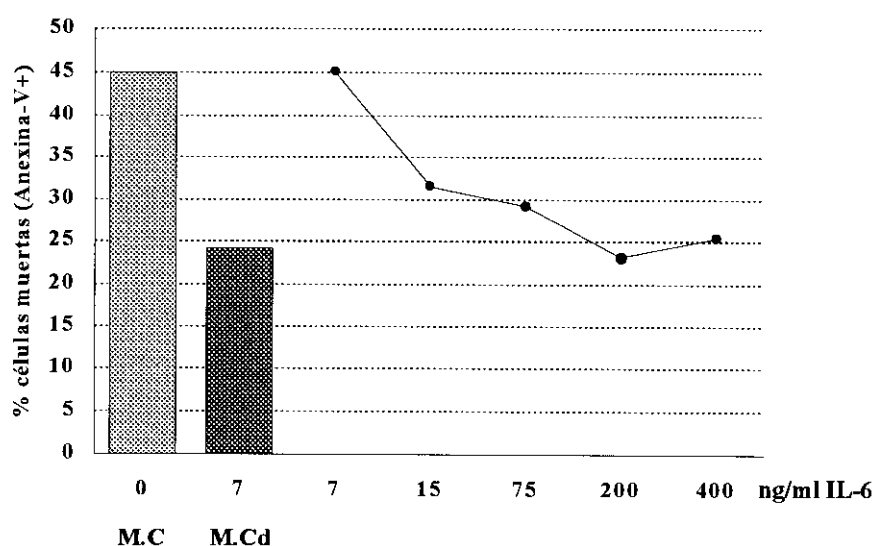


Fig. 28.- Curva dosis-respuesta del efecto anti-apoptótico de la IL-6 natural procedente de células de osteosarcoma. Se muestra un ejemplo representativo del análisis de la apoptosis a día +1 en células de LLC-B cultivadas con diferentes concentraciones de IL-6 natural de osteosarcoma, desde 7 a 400 ng/ml. Estos resultados se comparan con la apoptosis en M.C y en un M.Cd de CEs con 7 ng/ml de IL-6.

4. 5. 6. Efecto de diferentes IL-6 recombinantes en la viabilidad de las células leucémicas: correlación con la formación de dímeros

Una vez determinado el efecto anti-apoptótico mediado por la IL-6 natural contenida en el M.Cd de las CEs y de células de osteosarcoma, pasamos a comprobar si diferentes IL-6 recombinantes mostraban capacidad de inhibición de la apoptosis *in vitro* de las células de la LLC-B. Se ensayaron tres IL-6r de fuentes diferentes: levadura (IL-6r-Lev), células CHO (IL-6r-CHO) y E. coli.

Se emplearon estos tres tipos de IL-6r por los siguientes motivos: 1) La IL-6r procedente de levadura y de células CHO son formas recombinantes glicosiladas de la citoquina y la IL-6r de E. coli, no. Esto nos permitiría analizar posibles diferencias de actividad anti-apoptótica relacionadas con la glicosilación, ya que la IL-6 natural producida por las células endoteliales cabe suponer que está, al menos en parte, glicosilada y 2) Por otra parte, está descrito en la literatura³³⁴ que existe una forma dimérica de IL-6r de E. coli de aproximadamente unos 45 kD de peso molecular. Dicha molécula es, en cuanto a su peso molecular, parecida a la IL-6 procedente de CEs con actividad anti-apoptótica descrita en este trabajo (40-60 kDa). Los estudios funcionales de esta IL-6 nos permitirían corroborar la importancia del peso molecular de la IL-6 en la actividad anti-apoptótica sobre la LLC-B, si bien esta IL-6 recombinante tiene una procedencia distinta, que conlleva la ausencia de glicosilación (y tal vez otras diferencias no conocidas).

En primer lugar se realizaron estudios funcionales añadiendo al M.C diferentes concentraciones de IL-6r de levadura (n=9) y de CHO (n=6), desde 10 ng/ml hasta 200 ng/ml. En estos experimentos no se detectó inhibición en ninguna LLC-B con ninguna de estas dos IL-6 recombinantes (Fig. 29).

En los cultivos con IL-6r de E. coli (n=2) se detectó un efecto anti-apoptótico muy discreto comparado con el del M.Cd (imágenes no mostradas). Concretamente, se ensayaron desde 0,1 ng/ml hasta 200 ng/ml de IL-6r de E.coli, cuantificando la apoptosis a día +1. A partir de 2 ng/ml se detectó una ligera inhibición (13% con respecto al M.C), sin embargo, el incremento de la concentración no mejoró de manera importante la respuesta: en concentraciones de 50, 100 y 200 ng/ml se detectó una inhibición del 17% con respecto al M.C (obteniéndose una inhibición de la apoptosis > 50% en las mismas células cultivadas en M.Cd).

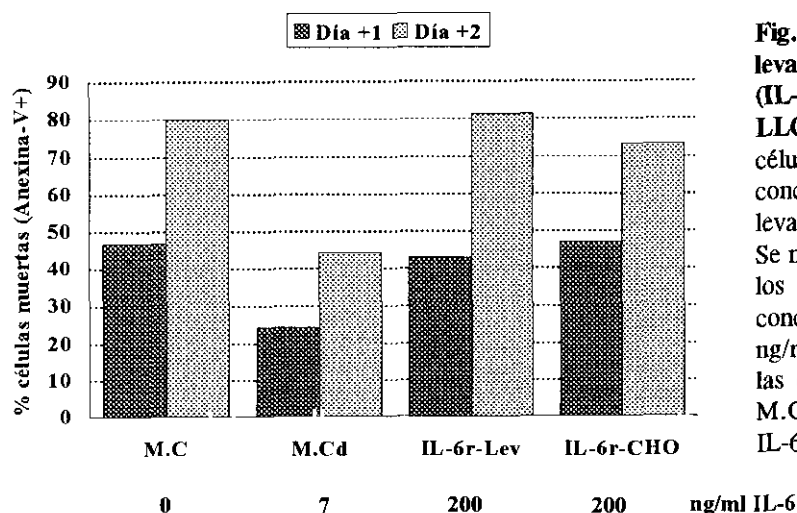


Fig. 29.- Efecto de la IL-6r derivada de levadura (IL-6r-Lev) y de células CHO (IL-6r-CHO) sobre la apoptosis de la LLC-B. Se añadieron a los cultivos de células de LLC-B en M.C concentraciones crecientes de IL-6r de levadura y de CHO, entre 10-200 ng/ml. Se muestra un ejemplo representativo de los resultados obtenidos en la concentración máxima ensayada (200 ng/ml), junto a la mortalidad obtenida en las células cultivadas en M.C y en un M.Cd de CEs que contenía 7 ng/ml de IL-6.

Una vez detectado este discreto efecto anti-apoptótico promovido por la IL-6r de *E. coli*, bastante inferior al de la IL-6 del M.Cd, comprobamos si nuestra IL-6r de *E. coli* contenía formas diméricas, tal y como describe la literatura. Para ello la IL-6r de *E. coli* se fraccionó con idéntica metodología a la descrita para la IL-6 secretada por las células ECV-304: fraccionamiento en una columna de sephacryl S-200. Como se muestra en la Fig. 30A, la IL-6r derivada de *E. coli* mostró un patrón de elución que incluyó un primer pico mayoritario (80% de la IL-6 recuperada tras la elución) de IL-6 con un peso molecular cercano a 45-50 kDa y otro minoritario (20%) con un peso molecular de aproximadamente 20-25 kDa, resultados compatibles con la presencia de dímeros (IL-6_D) y monómeros de IL-6 (IL-6_M), respectivamente. Ambas formas de IL-6 se compararon con la IL-6 contenida en el M.Cd de las CEs en su capacidad de promover la supervivencia *in vitro* de las células tumorales de 3 LLC-Bs en día +1. Como muestra la Fig. 30B, sólo la IL-6 dimérica de *E. coli* demostró efecto anti-apoptótico, con una respuesta dependiente de la concentración: se detectó una reducción de la muerte celular a partir de 0,05 ng/ml (15% de inhibición) que fue dependiente de la concentración, hasta llegar a 5 y 10 ng/ml, donde se detectó una inhibición máxima del 30%, que se mantuvo hasta una concentración de 80 ng/ml de IL-6 dimérica (datos no mostrados). Estos resultados de inhibición de la apoptosis con IL-6_D de *E. coli* indicaban una mayor actividad que la conseguida con la misma IL-6r antes de su separación en las fracciones monomérica y dimérica: 10 ng/ml de IL-6r de *E. coli* sin fraccionar inhibieron la apoptosis de

la LLC-B aproximadamente un 14%, y la misma concentración de IL-6_D de *E. coli* consiguió un 30% de inhibición. Sin embargo, el porcentaje de inhibición alcanzado por la IL-6_D de *E. coli* fue inferior al de la IL-6 del M.Cd de CEs (>50%)(Fig. 30B). Además, por otro lado, la IL-6 monomérica demostró no tener efecto inhibitor de la apoptosis de la LLC-B (Fig. 30B).

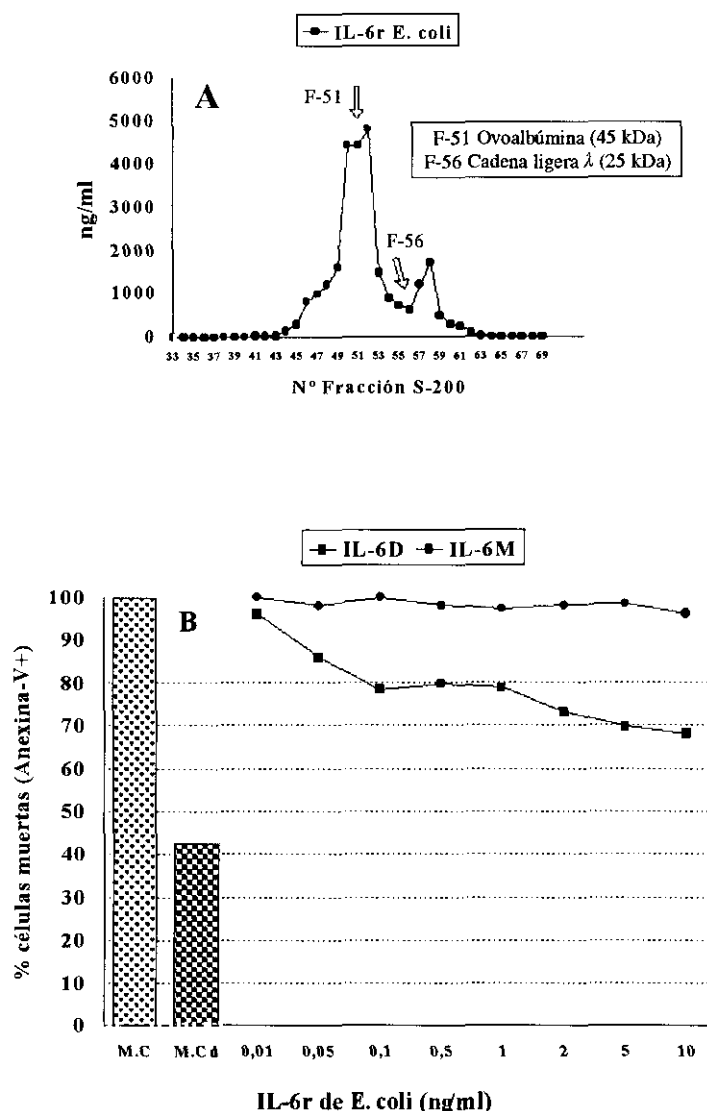


Fig. 30.- Perfil de elución de la IL-6r de *E. coli* fraccionada en una columna de sephacryl S-200 y actividad anti-apoptótica de la misma. (A) Se corrieron 20 μ g de IL-6r de *E. coli* en una columna de sephacryl S-200, recogiendo fracciones de 200 μ l. Las cantidades de IL-6 en cada fracción fueron cuantificadas mediante técnica ELISA. Las flechas indican la fracción que contiene la O.D máxima de las proteínas utilizadas para calibrar la columna. **(B)** Actividad anti-apoptótica de la IL-6r dimérica (IL-6_D) y monomérica (IL-6_M) de *E. coli*. Se muestran los resultados de un experimento representativo de un cultivo de LLC-B de 24 horas. Los porcentajes de inhibición de apoptosis han sido calculados considerando el porcentaje de muerte celular en M.C como el 100%.

4. 6. LAS PROTEÍNAS Bcl-2 Y Bax DE LA CELULA DE LA LLC-B NO ESTAN IMPLICADAS EN EL EFECTO ANTI-APOPTOTICO DE LA IL-6 PRODUCIDA POR EL ENDOTELIO

Con el objeto de investigar los mecanismos moleculares que subyacen en la inhibición de la apoptosis de las células de la LLC-B en respuesta a la IL-6 dimérica, la cinética de expresión de dos proteínas de la familia bcl-2 fue analizada por citometría de flujo: Bcl-2, una proteína descrita en numerosos sistemas como inductora de supervivencia, y Bax, que promueve apoptosis en multitud de tipos celulares.

Bcl-2 se determinó utilizando un marcaje directo con AcMo anti-Bcl-2-FITC (n=6). Tal y como muestra la Fig. 31, prácticamente el 100% de células expresaron este antígeno a tiempo cero (porcentaje de células positivas: $95,6 \pm 3,2\%$; IMF: $31,2 \pm 5,1$).

Los primeros cambios significativos en los niveles de expresión de Bcl-2 habitualmente se establecían a las 48 horas de cultivo, motivo por el cual se han elegido imágenes de 2 días de cultivo en el ejemplo representativo mostrado en la Fig. 31. Paradójicamente no se observaron diferencias significativas ni en el porcentaje de células positivas ($91,3 \pm 1,7\%$ versus $91,6 \pm 1,5\%$) ni en la IMF ($45 \pm 5,1$ vs $46,2 \pm 3,4$) del antígeno Bcl-2, independientemente de que las células leucémicas fueran cultivadas en M.C ($60,1 \pm 19,4\%$ de células Anexina-V⁺) o M.Cd ($35,4 \pm 18,3\%$ de células Anexina-V⁺).

Para la detección del antígeno Bax (n=2) se utilizó una técnica de marcaje indirecto, tal y como se describe en Material y Métodos. A tiempo cero, entre el 50-60% de las células tumorales expresaban dicha proteína (IMF:33). De manera inesperada, el porcentaje de células Bax positivas se incrementó más en M.Cd (86%) que en M.C (65%), a pesar de existir mayor viabilidad en las células cultivadas en M.Cd que en M.C; si bien en ambos casos la IMF descendió con respecto a las células frescas (Fig. 31).

De estos resultados se deduce que no existe una clara correlación entre los niveles de expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax y el efecto anti-apoptótico descrito para la IL-6 contenida en el M.Cd.

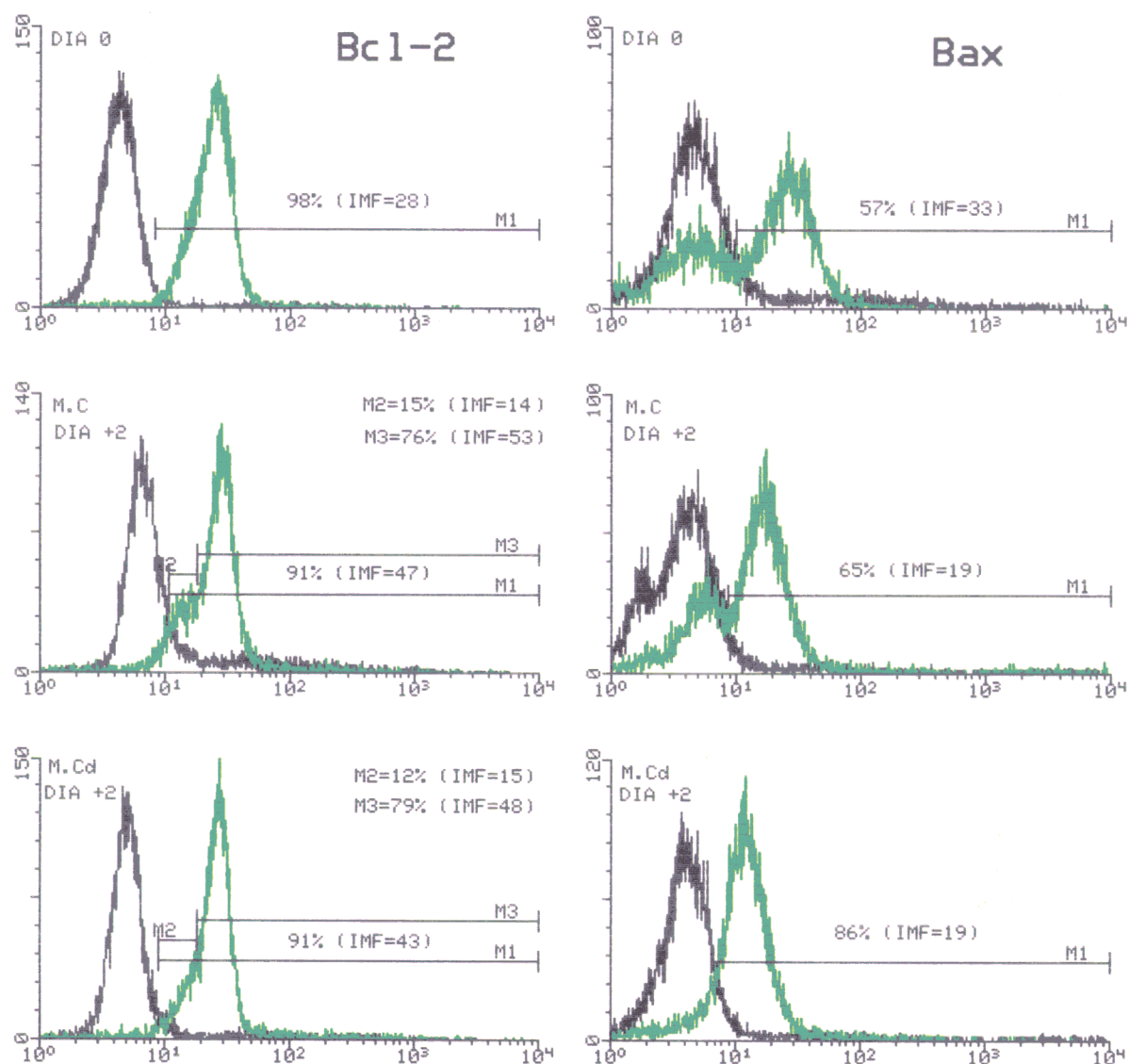


Fig. 31.- Expresión de las proteínas intracelulares Bcl-2 y Bax en las células de la LLC-B. Los niveles de expresión se determinaron sobre las células permeabilizadas marcadas con un AcMo anti-Bcl-2-FITC o un Ac policlonal anti-Bax de conejo revelado con un Ac de cabra anti-conejo-FITC. Los controles isotípicos correspondientes están representados en negro. Se muestran tanto los porcentajes de células positivas como la IMF de las células de LLC-B cultivadas durante 2 días en M.C o M.Cd en comparación con los valores obtenidos a tiempo 0.

DISCUSSION

5.- DISCUSION

Como ya se mencionó en la introducción, la LLC-B es un síndrome linfoproliferativo crónico caracterizado por la acumulación de células B monoclonales de larga vida media²³³ y en estado de reposo²³², ya que más del 95 % de las células B neoplásicas se encuentran en la fase G0/G1 del ciclo celular^{205, 230, 231}. Paradójicamente, estas células mueren rápidamente *in vitro* por apoptosis^{230, 234}, sugiriendo que la muerte celular programada de los linfocitos B monoclonales en cultivo es el resultado de la ausencia de factores solubles y/o celulares que, sin embargo, sí están presentes *in vivo*.

En el presente trabajo partimos de la hipótesis de que las señales anti-apoptóticas que recibe la célula de la LLC-B *in vivo* pudieran proceder de otras células cercanas físicamente a la célula tumoral. Estas células podrían ser de origen hematopoyético o bien podrían ser células de estructuras como la íntima de los vasos sanguíneos o las células del estroma de la médula ósea, con las cuales también existe una proximidad física. En este sentido, y conocida la capacidad migratoria de las células tumorales de la LLC-B así como su facilidad para colonizar diferentes órganos o tejidos¹⁹⁷ (médula ósea, bazo, ganglios linfáticos), consideramos que las CEs pudieran comportarse como auténticas células “accesorias” responsables de la elevada vida media de las células de la LLC-B.

Nuestros resultados indican que el M.Cd procedente de las CEs obtenidas de cordón umbilical inhibe claramente la apoptosis *in vitro* de las células de la LLC-B. De igual manera, el M.Cd procedente de la línea ECV-304 manifestó una fuerte actividad anti-apoptótica sobre las células leucémicas. Las células de la línea ECV-304 crecen rápidamente, no requieren de factores de crecimiento exógenos²⁷⁶ y generan M.Cds con actividad promotora de supervivencia de una manera reproducible y constante tras varios pases. Estas propiedades nos permitieron utilizar esta línea celular como fuente continua de M.Cd. Dicho M.Cd retrasaba la muerte por apoptosis de las células de la LLC-B con respecto al M.C durante los tres primeros días de cultivo. Después de este tiempo, los porcentajes de células apoptóticas (próximos al 100%, en general) se igualaban en ambos medios, lo que claramente indica el consumo del factor (es) soluble contenido en el M.Cd. Además, se detectó el efecto anti-apoptótico del M.Cd procedente de las CEs en todas las LLC-Bs estudiadas al diagnóstico ($p < 0.001$, en los días +1, +2 y +3), independientemente de la velocidad en la muerte celular de cada LLC-B en

M.C. La heterogeneidad en la muerte celular *in vitro* de la LLC-B ha sido descrita reiteradas veces^{54, 235, 236}, por lo que la respuesta homogénea de todas las LLC-Bs en M.Cd sugiere que el factor (es) contenido en dicho medio puede jugar un papel esencial en la vida media larga que, *in vivo*, muestran estas células. A nuestro juicio, el presente trabajo describe por primera vez un efecto inhibidor de apoptosis en las células tumorales CD19⁺CD5⁺ de un factor (es) soluble secretado por CEs. De hecho, el único antecedente descrito en la literatura a este respecto sugiere que el M.Cd de la línea de CEs EA.hy926 no muestra actividad inductora de supervivencia en las células de la LLC-B²⁶⁰. Esta diferencia puede ser atribuible a la distinta naturaleza de las dos líneas celulares, ya que ECV-304 es una línea transformada espontáneamente²⁷⁶, mientras que EA.hy926 es un híbrido de célula endotelial y de la célula de carcinoma A549/8²⁶⁰. En cualquier caso, los autores de este trabajo no indican el tiempo en el que fue recolectado el M.Cd procedente de esta línea celular, por lo que no puede descartarse que, bajo ciertas condiciones y tiempos de cultivo, dicho M.Cd pudiera tener actividad anti-apoptótica.

La determinación del porcentaje de células leucémicas apoptóticas cultivadas en M.Cd o en M.C se realizó utilizando cuatro diferentes métodos de citometría de flujo: marcaje con Anexina-V/IP, cambios en los parámetros de tamaño y granularidad (FSC/SSC), detección de células con escisiones en su ADN (método del TUNEL) y de células con un contenido de ADN inferior al de células viables (pico hipodiploide). Los cuatro métodos mostraron cinéticas de muerte celular equivalentes, que se incrementaban progresivamente a lo largo de los tres días de cultivo. De esta forma confirmamos que la célula de la LLC-B apoptótica sigue patrones de comportamiento similares a los descritos en multitud de tipos celulares: pérdida de tamaño e incremento discreto de la granularidad²⁷⁷, cortes en las cadenas de ADN²⁷⁸ y pérdida cuantitativa y/o diferente empaquetamiento del mismo²⁷⁹, así como exposición de la fosfatidil-serina en la cara externa de la membrana plasmática^{274, 280}. Los cuatro métodos permitieron seguir las diferencias en el porcentaje de células leucémicas viables cultivadas en M.C y M.Cd. Sin embargo, el porcentaje de células apoptóticas detectadas fue siempre superior con el método de la Anexina-V/IP que con los otros tres. Este hecho es debido a que las células en los estadios iniciales de la apoptosis ya expresan fosfatidil-serina en la cara externa de la

membrana citoplasmática (Anexina-V⁺/IP⁻), cuando aún las células mantienen casi íntegramente sus características de tamaño y granularidad, así como su contenido de ADN. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios descritos en la literatura^{274, 280}. Además, hemos podido objetivar con el método de la Anexina-V/IP una característica que, hasta el momento, sólo había sido descrita en células marcadas con 7-amino-actinomicina-D (7-AAD)²⁸¹: la determinación de células en estadios intermedios de apoptosis. Estas células se caracterizan por una discreta, pero cuantificable, pérdida de tamaño así como por la captación espontánea (membrana citoplásmica permeable) del IP (células Anexina-V⁺/IP⁺⁺). En las células en estadios finales de apoptosis se objetiva una pérdida notable de tamaño y una menor captación de IP, lo que genera una señal de fluorescencia inferior (células Anexina-V⁺/IP⁺). Estas últimas células, denominadas células necróticas secundarias por Vermes y col.²⁸², probablemente no solo contengan células que ya han perdido una gran cantidad de ADN, sino también cuerpos apoptóticos. La detección de los mismos probablemente sea debido a que nuestras condiciones de análisis incluían una amplificación elevada para el parámetro FSC, de tal manera que incluimos eventos de pequeño tamaño, de forma similar a Swat y col.²⁷⁷, los cuales no son determinados habitualmente por otros autores²⁵⁹.

El estudio de la viabilidad celular con el colorante vital azul tripán y posterior análisis por microscopía óptica nos condujo a varias conclusiones. En primer lugar, que este método no puede detectar células en estadios iniciales de la apoptosis (células azul tripán negativas). En segundo lugar, el análisis es muy subjetivo ya que en los estadios de apoptosis en los que la célula aún mantiene sus dimensiones se reconoce fácilmente si la célula está viva o muerta, pero en fases de la apoptosis con pérdida importante de tamaño resulta bastante aleatorio resolver si un elemento visto al microscopio es una célula o si es un resto celular o un cuerpo apoptótico, ya que la resolución de la microscopía óptica no permite asegurarlo. Debido a estos motivos hemos valorado con gran cautela ciertos resultados presentes en la literatura en los que se utiliza este método para el análisis de la apoptosis en la LLC-B.

Los resultados obtenidos con la citometría de flujo fueron corroborados mediante la electroforesis de ADN en geles de agarosa: este método cualitativo/semi-cuantitativo permitió objetivar diferencias manifiestas en el contenido de ADN intacto y ADN fragmentado (patrón en escalera) cuando las células de la LLC-B fueron cultivadas en M.Cd y en M.C. Sin

embargo, este método perdió sensibilidad en muestras en las que los linfocitos se encontraban en estadios muy avanzados de apoptosis, llegando incluso hasta la desaparición del patrón en escalera, como han descrito anteriormente Koopman y col.²⁸³.

Una vez comprobado el efecto anti-apoptótico del M.Cd derivado de las CEs, se investigó si el contacto directo CE/célula leucémica jugaba también un papel relevante en la inhibición de la apoptosis de las células de la LLC-B. Para ello se realizaron experimentos en los que se permitió la interacción física de ambos tipos celulares o se impidió insertando cámaras *transwell*. Además, en estos experimentos también se incluyeron células de LLC-B cultivadas en M.C y en M.Cd. En el análisis de la varianza de la muerte celular de la LLC-B en las cuatro condiciones de cultivo (M.C, M.Cd, Cont.dir y Tranw) se encontraron diferencias significativas ($p < 0.001$) en los días estudiados (+1 y +3). En las comparaciones posteriores se obtuvieron resultados que sirven para describir la cinética de la muerte celular a lo largo del tiempo: ascendente en M.C y M.Cd, y mortalidad estable (forma de meseta) en ambos tipos de cocultivo. Esta cinética de los cocultivos se mantenía en aquellos experimentos con estudio de apoptosis *in vitro* superior a 3 días. Esta aproximación experimental mostró un efecto anti-apoptótico muy potente derivado del contacto entre las CEs y las células de la LLC-B, ya que la viabilidad de estas últimas superaba el 80% tras incluso 8 días de cultivo. En los cocultivos con *transwell* apenas se incrementaba la muerte celular desde el día +1 hasta el día +8, si bien el porcentaje de células apoptóticas siempre fue superior al de los cocultivos en contacto directo. De estos datos se deducía que las interacciones célula-célula favorecen un retraso aún mayor en la muerte celular programada de las células de la LLC-B que el detectado con el factor (es) soluble contenido en el M.Cd, coincidiendo además con los resultados mostrados por Long y col.²⁶⁰, que describen la inhibición de la apoptosis dependiente de contacto de las células de la LLC-B con la línea de células endoteliales EA.hy926, y con los resultados descritos por Jewell y col.²⁸⁴ en los cocultivos de LLC-B con células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) y con células endoteliales obtenidas de médula ósea. Estos hallazgos son también coherentes con los mostrados por Panayiotidis y col.²⁵⁹ o Lagneaux y col.¹⁸⁰, quienes muestran que las células de la LLC-B sobreviven en cultivo cuando interaccionan con células del estroma medular. En este sentido, la supervivencia en cultivo de las células leucémicas de

linaje B con respecto al contacto directo con células estromales parece ser independiente del estadio madurativo, ya que, tal y como se ha descrito, las LLAs de linfocitos B mantienen su viabilidad durante largos periodos de tiempo cuando son cocultivadas con fibroblastos del estroma²²¹⁻²²⁵. La necesidad de contacto directo entre células de estroma y células B CD5⁺ para la supervivencia de estas últimas también ha sido establecida en ratón, donde la población mayoritaria B CD5⁺ peritoneal mantiene su viabilidad en cocultivo con las células estromales del peritoneo²⁸⁵. Fuimos, sin embargo, incapaces de bloquear el efecto anti-apoptótico mediado hipotéticamente por contactos célula-célula, incluso utilizando varios AcMo anti-moléculas de adhesión conjuntamente, todos ellos de naturaleza bloqueante. En este sentido Long y col.²⁶⁰ sugieren que el efecto anti-apoptótico podría estar mediado, al menos en parte, por la β_2 -integrina CD11b. Sin embargo, estos autores no han publicado resultados al respecto posteriormente. Sorprende así mismo que Lagneaux y col.¹⁸⁰ observando el efecto bloqueante de adhesión con varios anticuerpos anti-moléculas de adhesión (CD54, CD106, CD11a, CD18 y CD49d), no indiquen en ningún momento el efecto que dicho bloqueo tiene sobre la apoptosis. Si bien ya ha sido descrita la capacidad que tienen las células de la LLC-B para adherirse a diferentes proteínas de ME²⁸⁶, como consecuencia lógica de su patrón de expresión de moléculas de adhesión^{284, 287, 288}, también fuimos incapaces de inhibir la apoptosis *in vitro* de las células de la LLC-B, bien utilizando proteínas purificadas (colágeno, laminina, vitronectina y fibronectina) o la compleja red de proteínas de ME obtenidas tras la lisis de las CEs.

La utilización de CEs fijadas con métodos tales como PFA, glutaraldehído o etanol, todos ellos previamente descritos por mantener intactas las propiedades estructurales y funcionales de las moléculas de adhesión²⁸⁹⁻²⁹¹ eliminó el hipotético efecto anti-apoptótico mediado por el contacto célula-célula, descartándose además un posible efecto sinérgico entre el factor (es) soluble contenido en el M.Cd y las interacciones célula-célula. Paralelamente fuimos comprobando que los tiempos de adquisición de un número de eventos fijo en el citómetro de flujo, eran mayores (doble o triple) para las muestras procedentes de cocultivo en contacto directo que para las procedentes de M.C y M.Cd. Todos estos hallazgos nos llevaron a pensar en la posibilidad de fagocitosis de las células leucémicas apoptóticas por las CEs en los cocultivos en contacto directo. Esta sospecha finalmente fue confirmada mediante la detección por CMF de células leucémicas fagocitadas (previamente marcadas con TAMRA) en el interior de las CEs. Por

tanto, en nuestro sistema experimental, el retraso de la apoptosis observado en los cocultivos en contacto directo fue debido al aclaramiento de células apoptóticas llevado a cabo por las CEs. La capacidad fagocítica de las células endoteliales y de los fibroblastos^{32-35, 275} ya ha sido descrita. Buena parte de los datos publicados que confieren a células con capacidad adherente un efecto anti-apoptótico sobre células leucémicas, pertenecientes o no al linaje B, tras establecer contacto físico con ellas, carecen de aproximaciones experimentales que excluyan, de manera directa o indirecta, la fagocitosis de la célula tumoral. Es probable, por lo tanto, que se haya sobrevalorado sistemáticamente la contribución del contacto directo en la supervivencia de numerosos tipos celulares.

El proceso de malignización celular puede inducirse ya sea por una activación descontrolada de la proliferación celular y/o tras inhibición de las vías metabólicas que regulan la muerte celular programada²⁶. Tal y como se ha descrito²⁰⁵, las células de la LLC-B son, en su mayoría, células no proliferantes, por lo que establecer una clara disociación entre apoptosis y proliferación es esencial para valorar adecuadamente la relevancia patofisiológica del factor que contribuye a la supervivencia *in vitro* de las células leucémicas. Paradójicamente, muchos de los trabajos que describen factores solubles capaces de inhibir la apoptosis de las células de la LLC-B no indican su efecto en la proliferación de las mismas^{235, 249, 251, 252}. En este estudio hemos comprobado que el M.Cd tenía un efecto anti-apoptótico no mediado por proliferación y/o diferenciación. Confirmamos que las células de la LLC-B cultivadas en M.Cd mantenían un porcentaje de células en fase S+G₂M equivalente al del día 0, por lo que se descartó la inducción de proliferación celular. Por otro lado, se comprobó que las células cultivadas también mantenían sus características inmunofenotípicas, sin alteraciones en los antígenos directamente relacionados con la diferenciación de la célula B como CD20, CD38, CD138 o Igs. Está descrito que la interacción de una citoquina con su receptor puede desencadenar una señal de proliferación, diferenciación o apoptosis/anti-apoptosis celular²⁹², dependiendo del tipo celular y su estado madurativo, así como de la presencia o ausencia de otros factores en el medio. Atendiendo a estas premisas, el factor (es) soluble contenido en el M.Cd derivado de las CEs supone un excelente modelo experimental para estudiar como las células de la LLC-B son capaces de mantenerse viables *in vitro* sin promover proliferación o diferenciación celular. De hecho, y hasta el momento, en muy pocos sistemas experimentales se ha descrito el efecto

anti-apoptótico de una citoquina disociado de un posible efecto proliferativo²⁹². En este sentido, es esencial incluir diferentes abordajes experimentales que muestren inequívocamente que la señal mediada por el factor soluble se integra en vías metabólicas de supervivencia y no de proliferación y diferenciación, al menos en tipos celulares que, como la LLC-B, muestran una prolongada vida media *in vivo* con un índice proliferativo muy bajo. Por lo tanto, todo aquel estudio que describa un factor de supervivencia sin descartar un estímulo proliferativo o, en el caso de que la señal anti-apoptótica requiera el contacto directo con la célula “feeder”, un proceso fagocítico, ha de ser valorado con ciertas reservas.

El factor contenido en el M.Cd derivado de las CEs con capacidad anti-apoptótica sobre las células de la LLC-B demostró ser la IL-6, ya que: a) la actividad anti-apoptótica del M.Cd fue bloqueada con anticuerpos neutralizantes anti-IL-6 y b) el factor promotor de la supervivencia de las células leucémicas eluyó en las fracciones comprendidas entre 40 y 60 kDa en una filtración sobre gel en S-200, fracciones que, por ELISA, contuvieron cantidades notables de IL-6. Por lo tanto, este trabajo describe por vez primera el efecto inhibidor de apoptosis de una citoquina natural (no recombinante) sobre las células de la LLC-B. Es interesante recalcar que en las concentraciones más elevadas de anticuerpos anti-IL-6 que utilizamos no sólo se bloqueó totalmente el efecto anti-apoptótico del M.Cd, sino que, en estas condiciones, el porcentaje de células leucémicas apoptóticas fue superior al registrado en M.C. Además, pudimos observar (datos no mostrados) que en 5/5 LLC-B la mortalidad basal en M.C se incrementaba entre 10-20% cuando se añadían al cultivo anticuerpos policlonales de conejo anti-IL-6 (150 µg/ml), lo que parecía indicar un posible efecto autocrino de una IL-6 producida por la propia célula leucémica. Integrando estos resultados, la adición de anticuerpos anti-IL-6 al M.Cd bloquearía no sólo la IL-6 del M.Cd, sino también el posible efecto anti-apoptótico de la IL-6 producida por la propia célula leucémica. Obviamente, la secreción espontánea de IL-6 autocrina en ningún caso es suficiente para inhibir la apoptosis de la LLC-B, como indica la muerte rápida *in vitro* que caracteriza a las células de esta leucemia. De hecho, se ha descrito que la IL-6 es sintetizada por las células de la LLC-B, así como por las células B normales activadas²⁹³. La célula B de la LLC-B expresa constitutivamente el gen de la IL-6 y produce esta citoquina en ausencia de estímulos exógenos (≈ 57 pg/ml) en concentraciones significativamente más altas

que la célula B de controles sanos^{257, 294}. Además, en las células de la LLC-B puede inducirse una mayor producción de esta citoquina tras estimulación con PMA²⁹⁵ o TNF α ²⁵³. En el caso de los pacientes de LLC-B con patología autoinmune asociada, la producción de IL-6 por las células leucémicas *in vitro* es significativamente superior a la de los pacientes sin patología autoinmune²⁹⁴.

De las citoquinas inhibitoras de apoptosis de las células de la LLC-B descritas hasta el momento, sólo en dos de ellas se ha sugerido qué célula podría ser la fuente de producción: una es la IL-6 secretada por la propia célula leucémica, aunque sin experimentos que apoyen tal aseveración²⁵³; la otra es la IL-8, cuyo efecto anti-apoptótico se conseguiría con las concentraciones que se alcanzan una vez que la propia célula leucémica la libera constitutivamente^{254, 258}. Estos trabajos sobre el efecto anti-apoptótico de la IL-8 no han considerado otra posible fuente que no sea la propia célula leucémica. Sin embargo, la IL-8 también es una citoquina producida por las células endoteliales²⁹⁶. En nuestro estudio descartamos que el factor soluble inhibidor de apoptosis en la LLC-B presente en el M.Cd de las CEs fuera la IL-8, ya que anticuerpos neutralizantes anti-IL-8 no bloquearon el efecto anti-apoptótico del M.Cd. Para el resto de citoquinas inhibitoras de la apoptosis en la LLC-B no se han aportado resultados en la literatura que orienten sobre el origen celular ni, por lo tanto, del posible mecanismo fisiológico que indique su potencial papel en la acumulación de células B monoclonales *in vivo*.

Lagneaux y col.¹⁸⁰ describen que el medio condicionado de día +2 producido por las células de estroma medular no sólo no inhibe apoptosis, sino que la incrementa. En este sobrenadante detectan niveles de IL-6 bastante parecidos a los que nosotros hemos detectado en el sobrenadante de las CEs a día +3 (>5 ng/ml). Estos hallazgos hacen pensar en al menos dos explicaciones: 1) que la IL-6 producida por las células de estroma es diferente a la producida por las CEs o 2) que en el medio condicionado de las células de estroma haya otros factores solubles inductores de apoptosis que, o no existen o están presentes en menor proporción en el M.Cd de las CEs. De hecho, estos autores¹⁸⁰ cuantifican paralelamente la concentración de IL-10 en el medio condicionado de día +2 de las células de estroma (aproximadamente 1 ng/ml). Ya que esta citoquina ha sido descrita por algunos autores como inductora de apoptosis en la LLC-B²⁴², el efecto inductor de apoptosis del M.Cd procedente de las células de estroma

quizá pueda deberse a la presencia de esta citoquina.

En lo que respecta a las posibles peculiaridades estructurales de la IL-6 natural sintetizada por las CEs que le confieran su propiedad anti-apoptótica sobre la célula B de la LLC-B, en el presente trabajo hemos llegado a determinar que existe una forma de IL-6 producida por estas células con un peso molecular de 40-60 kDa, aproximadamente el doble al descrito para esta citoquina (20-30 kDa)²⁹⁷. Además, nuestros resultados indican que la forma mayoritaria de la IL-6 secretada por las CEs corresponde a la de más alto peso molecular (40-60 kDa), en una relación molar aproximada de 10:1 con respecto a la IL-6 de ≈ 25 kDa, claramente minoritaria. Aún más interesante, fracciones del S-200 con cantidades equivalentes de IL-6, ya sea de 40-60 kDa o de ≈ 25 kDa (F-27 y F-45, respectivamente de la Fig. 25), mostraron efectos marcadamente distintos: la IL-6 de 40-60 kDa inhibió la apoptosis de las células leucémicas, mientras que la IL-6 de ≈ 25 kDa no tuvo efecto.

La descripción de una IL-6 que, utilizando filtración sobre gel, muestre un peso molecular manifiestamente superior al descrito clásicamente para esta citoquina (20-30 kDa)²⁹⁷ tiene numerosos antecedentes en la literatura. Así, por ejemplo, May y col.²⁹⁸ utilizan medio condicionado procedente de cultivos de fibroblastos FS-4 como fuente de IL-6 natural: tras la separación en una columna de Sephadex G-200, detectan IL-6 con pesos moleculares que oscilan entre 20 y 85 kDa, comprobando que el complejo de IL-6 de aproximadamente 85 kDa está constituido por monómeros de 23-25 kDa O-glicosilados y de 28-30 kDa N y O-glicosilados, y que los complejos entre 45-70 kDa están constituidos por especies monoméricas de 23-25 kDa O-glicosiladas. Por otro lado, Wijdenes y col.²⁹⁹, en este caso partiendo de un IL-6r de *E. coli*, describen una IL-6 de 46 kDa y otra de 23 kDa. Hallazgos similares han sido registrados por Ward y col.^{300, 301} con la IL-6r de *E. coli*, describiendo en este caso una IL-6 de aproximadamente 40 kDa a la que denominan IL-6 dimérica (IL-6_D) y otra de unos 20 kDa o IL-6 monomérica (IL-6_M).

Dos de estos grupos han realizado estudios de actividad biológica de la IL-6 de diferente Pm. En el caso de la IL-6 procedente de fibroblastos²⁹⁸ las fracciones de 20-45 kDa demostraron mayor actividad que las de 50-70 kDa sobre el crecimiento del hibridoma B9, mientras que en el ensayo de estimulación de hepatocitos Hep3B las diferentes formas de IL-6 tuvieron una

actividad muy similar. De los dos grupos que han separado IL-6_D e IL-6_M de *E. coli*, sólo uno ha comparado la actividad biológica de ambas³⁰¹, detectando una menor actividad biológica en la IL-6_D que en la IL-6_M, tanto en el bioensayo sobre hepatocitos HepG2 como en el ensayo del hibridoma 7TD1. Así mismo, la forma dimérica de IL-6 no es un hecho aislado en el conjunto de factores solubles, ya que se han descrito formas multiméricas en gran cantidad de citoquinas: dímeros de IL-5³⁰², IL-10³⁰³, IFN β ³⁰⁴, IFN γ ³⁰⁵ y de las quimioquinas IL-8³⁰⁶ y RANTES³⁰⁷; dímeros y trímeros de MIF (*macrophage migration inhibitory factor*)³⁰⁸; y trímeros de TNF³⁰⁹. Se ha comprobado la mayor actividad biológica de las formas diméricas con respecto a las monoméricas en IL-5³¹⁰, IL-10³⁰³ e IL-8³¹¹, y en la forma trimérica de TNF³¹². De todos estos datos se deduce que las interacciones proteína-proteína, que pueden conducir o homo- o heterodimerización de las mismas, son esenciales en muchos procesos biológicos. El hecho de que la literatura describa, hasta el momento, efectos biológicos de la IL-6 dimérica similares o menos potentes a la IL-6 monomérica puede ser debido a la elección de ensayos biológicos utilizando líneas celulares, no necesariamente representativos de la posible respuesta de una célula normal o tumoral (en nuestro caso, las células leucémicas de la LLC-B).

La determinación del Pm aparente de la IL-6 en su forma nativa, utilizando filtración sobre gel en un S-200 nos permitió determinar la actividad anti-apoptótica de las fracciones obtenidas sobre las células de la LLC-B. Sin embargo, el marcaje metabólico con metionina-³⁵S de las CEs y posterior inmunoprecipitación de la IL-6 del sobrenadante mostró una única banda específica de IL-6 de $\approx$ 25 kDa en SDS-PAGE: es decir, la IL-6 nativa de 40-60 kDa detectada mediante filtración sobre gel, en condiciones desnaturalizantes (con o sin condiciones reductoras) se escinde en IL-6 de $\approx$ 25 kDa. Estos datos sugieren que la IL-6 de 40-60 kDa secretada por las CEs es un dímero de IL-6 formado por la asociación no covalente de dos monómeros.

La detección de la forma dimérica de IL-6 en geles de SDS-PAGE, ya sea IL-6 recombinante de *E. coli*, IL-6 natural producida por fibroblastos o por células endoteliales, o IL-6 sérica (o de otros fluidos corporales humanos), aporta resultados muy dispares. Así, Wijdenes y col.²⁹⁹ en el análisis en SDS-PAGE de la IL-6r de *E. coli* detectan, tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras, una banda de alto Pm de 40-45 kDa (IL-6_D) y otra de 20-24 kDa (IL-6_M),

lo que indica que la IL-6_D no es disociada en condiciones desnaturalizantes o reductoras. Sin embargo, Ward y col.³⁰¹, en un estudio de nuevo con una IL-6r de *E. coli*, detectan en SDS-PAGE, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, una única banda de aproximadamente 23 kDa, lo que indica que la IL6_D se disocia en condiciones desnaturalizantes. Entre ambos trabajos se advierte una diferencia metodológica en la separación de la IL-6 dimérica y monomérica: el grupo que detecta en SDS-PAGE la IL-6 de alto Pm²⁹⁹ utiliza, como paso previo a la filtración en gel una columna de S-Sepharosa en la que se eluye la IL-6 (dimérica y monomérica) con acetato amónico 1 M, mientras que Ward y col.³⁰¹, que no detectan IL-6 de alto Pm en SDS-PAGE, separan directamente mediante filtración sobre gel ambas IL-6 en PBS (dimérica y monomérica) en una columna equilibrada con el mismo tampón, es decir, utilizando una metodología que, aún partiendo de fuentes de IL-6 diferentes, se asemeja en gran medida a la utilizada por nosotros. Con respecto a la IL-6 natural producida por fibroblastos, la gran mayoría de los trabajos publicados coinciden en señalar que la IL-6 dimérica no es estable bajo condiciones desnaturalizantes. May y col.²⁹⁸ estudian la IL-6 secretada por fibroblastos crecidos en medio con metionina-³⁵S, la separan en una filtración sobre gel, e inmunoprecipitan la IL-6 obtenida en cada una de las fracciones del G-200. Tras SDS-PAGE y autorradiografía, todas las fracciones de IL-6 con pesos moleculares comprendidos entre 45 y 85 kDa en el G-200 dieron lugar a bandas de 23-30 kDa, equivalentes a la forma monomérica de la citoquina. De igual manera, el medio condicionado procedente de fibroblastos estimulados con IL-1 β y marcados con metionina-³⁵S, sólo detectó especies de 24-29 kDa³¹³. Van Damme y col.³¹⁴, con una cromatografía de afinidad previa a la filtración sobre gel, detectan una sola banda de IL-6 de 24 kDa bajo condiciones reductoras. Sorprendentemente, Santhanam y col.³¹⁵, pertenecientes al mismo laboratorio que May y col.²⁹⁸, detectan especies de IL-6 de 45 kDa inmunoprecipitando directamente la IL-6 marcada con metionina-³⁵S del medio condicionado en crudo procedente de los fibroblastos. En lo referente a la IL-6 natural producida por las células endoteliales (HUVEC) la literatura disponible indica que CEs no estimuladas o estimuladas con LPS³¹⁶, estimuladas con IL-1 β ³¹³, o con IL-4 y/o IFN γ ³¹⁷ muestran bandas de IL-6 de 23 a 29 kDa en geles de SDS-PAGE. Todos estos trabajos desarrollan una metodología común: marcaje metabólico con metionina-³⁵S e inmunoprecipitación. De nuevo es el grupo de May y col.³¹⁸ quien es capaz de detectar tras

SDS-PAGE tanto la IL-6 monomérica (formas de 23-25 y 27-30 kDa) como dimérica (45 kDa) en inmunoblot. Estos autores realizan una inmunoafinidad previa al M.Cd procedente de las CEs (con una elución a pH 2), por lo que no es descartable que el pH extremo que acompaña a la elución de la proteína pueda estabilizar la estructura molecular del dímero. Por lo tanto, la IL-6 de 45-60 kDa producida por las CEs en nuestro sistema experimental, disociable bajo condiciones desnaturalizantes, coincide en sus propiedades con la práctica totalidad de lo publicado con IL6 diméricas obtenidas de diferentes fuentes celulares. La posibilidad de que la IL6 de 45-60 kDa no sea un homodímero procedente de la unión no covalente de dos monómeros de 23-30 kDa, sino un heterodímero constituido por un monómero de IL-6 y una segunda proteína de un peso molecular equivalente secretada a su vez por la CE es altamente improbable, ya que la banda de 25 kDa detectada por SDS-PAGE es única, sin ningún atisbo de desdoblamiento.

La relevancia fisiopatológica de nuestros hallazgos viene dada, como ya se ha dicho, en la detección de una citoquina de origen natural, no recombinante, producida por CEs, un tipo celular con el que, muy probablemente, interacciona de manera constante la célula B leucémica *in vivo*. Las peculiares características que acompañan a esta IL-6 (Pm de 40-60 kDa), junto a los niveles séricos elevados de esta citoquina en los enfermos con LLC-B^{257, 294} harían muy interesante la determinación de esta forma dimérica de IL-6 en el suero de estos pacientes. De hecho, se sabe que ciertos estímulos, como el TNF o la endotoxina, son capaces de inducir la producción de IL-6 *in vivo* en humanos, si bien la fuente de esta IL-6 no ha sido determinada. La caracterización de la IL-6 en suero de pacientes tratados con TNF³¹⁹ y en controles sanos tratados con endotoxina (LPS)³²⁰ mediante columnas de afinidad, SDS-PAGE e inmunoblot, ha mostrado una IL-6 mayoritaria de 45 kDa. En ambos artículos refieren que esta molécula de IL-6, a la que llaman IL-6 polimérica de 45 kDa, se disocia espontáneamente en especies monoméricas de 25 a 30 kDa después de permanecer almacenada a 4°C (tiempo no especificado). También se han detectado niveles elevados de IL-6 en suero de enfermos con bacteriemia³²¹, así como en los fluidos de compartimentos con infección localizada como en meningitis (líquido cefalorraquídeo)³²¹, en pacientes con artritis reumatoide o postraumática³²², y en infección intraamniótica³²³. Con la excepción de la corioamnionitis infecciosa, donde sólo

se detectan formas monoméricas de IL-6 (23-30 kDa), en el resto de las patologías descritas son detectadas formas monoméricas (23-30 kDa), diméricas (45 kDa), e incluso de pesos moleculares más altos (60-70 kDa). Resulta de especial interés la detección de una IL-6 de 45 kDa en humanos tratados con $TNF\alpha$ ³¹⁹, ya que es bien conocido el hecho de que los niveles de $TNF\alpha$ están elevados en el suero de los pacientes con LLC-B³²⁴.

Para comprobar la especificidad del efecto anti-apoptótico de la IL-6 de CEs sobre la LLC-B estudiamos, por una parte, la expresión del receptor de IL-6 (CD126) en las células leucémicas y, por otra, la actividad de la IL-6 secretada por las CEs sobre la apoptosis de otros linfocitos. En el presente estudio, el método más sensible para la detección del CD126 en las células B de la LLC-B fue el marcaje con IL-6-biotina, encontrándose una expresión del receptor en todas las leucemias estudiadas (9/9), con un intervalo de positividad según los casos entre 57-97%. Otros autores, mediante el marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD126 conjugados con biotina, han descrito de igual manera la expresión en membrana de CD126 en la mayoría de las LLC-Bs, así como un aumento significativo en la concentración de la forma soluble de CD126 (CD126s) en el suero de los enfermos con LLC-B con respecto a los controles sanos³²⁵. La expresión de CD126 en la célula B normal de sangre periférica sin estimular es nula^{325, 326} o muy escasa³²⁷. Por el contrario, las células B activadas sí expresan CD126³²⁶. Nuestros ensayos demuestran que el M.Cd de las CEs no inhibió la apoptosis de los linfocitos totales de sangre periférica procedentes de individuos sanos. Si tenemos en cuenta que un alto porcentaje de estos linfocitos son células T, y recordamos que una parte importante de estas células expresan el receptor para IL-6 (CD126) en su membrana^{325, 327}, parece evidente que la IL-6 del M.Cd no tiene actividad anti-apoptótica sobre los linfocitos normales de sangre periférica, a pesar de que muchos de ellos expresan en su membrana el receptor para esta citoquina. También hemos comprobado que el M.Cd de las CEs no retrasa la apoptosis de las células B totales de amígdala, ni tampoco de las células B de CG y de MF parcialmente purificadas. Hasta el momento se ha descrito que una parte de las células B de CG expresan CD126³²⁸. Nuestros resultados experimentales indican que CD126 se expresa en una parte de las células de CG y en una parte de las células de MF (datos no mostrados). Sin embargo, a pesar de la expresión parcial de CD126, no se detecta un retraso en la muerte de las células B de CG y MF

cultivadas con M.Cd. Nuestros hallazgos sugieren claramente que una forma funcionalmente activa del receptor, más que su presencia o ausencia, puede ser el factor limitante para explicar el efecto biológico de la IL-6 de 40-60 kDa procedente de las CEs.

El efecto del M.Cd de las CEs en la viabilidad de las células tumorales de otros síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPC) muestra un efecto inferior, pero detectable, en un caso de linfoma de manto y otro de LPL-B, con respecto a lo registrado en las células de la LLC-B. Por lo tanto, no se puede descartar un posible efecto inhibidor de la IL-6 secretada por la CE en la apoptosis de estas células tumorales. Aún cuando hay pocos datos funcionales sobre la apoptosis de otros SLPC distintos a la LLC-B, en un trabajo reciente se describe que 4/7 linfomas centrocíticos en fase leucémica expresan CD126 en su membrana y, al igual que en la LLC-B, los niveles de CD126s en suero son significativamente superiores a los detectados en controles sanos³²⁵, dato que también deja una puerta abierta a la posibilidad de inhibición de la apoptosis por IL-6 a través de su receptor.

El receptor para la IL-6 está constituido por dos polipéptidos: la cadena α (IL-6R o CD126), una glicoproteína transmembrana de 80 kDa que se une a la IL-6 con baja afinidad y sin capacidad para transducir ningún tipo de señal, y una cadena β (gp130 o CD130), también una glicoproteína transmembrana de 120 kDa, que se une al heterodímero IL-6-IL-6R para formar el complejo de transducción de señal de alta afinidad³²⁹. Concretamente, es la homodimerización de dos moléculas de gp130 a través de un puente disulfuro, tras la unión previa de la IL-6 con IL-6R, lo que estimula a una actividad tirosín-quinasa³³⁰. Mediante estudios cromatográficos de filtración en gel y equilibrio de sedimentación se ha determinado que la IL-6 se une al dominio extracelular de IL-6R, formando un heterodímero³⁰⁰. Además, en presencia del dominio extracelular de gp130, se podría formar un complejo hexamérico compuesto por 2 moléculas de IL-6+2 moléculas de IL-6R+2 moléculas de gp130^{300, 301, 331}. El modelo de la interacción de la IL-6 dimérica o monomérica recombinante de *E. coli* por su receptor soluble (IL-6Rs o CD126s) sugiere que la IL-6_M se une a una sola molécula de IL-6Rs, mientras que la IL-6_D se une a dos moléculas de IL-6Rs^{299, 301, 332}. Estos resultados indican, según los autores, una mayor afinidad de IL-6_D por su receptor que la IL-6_M. Si estas características de afinidad se mantuvieran para el receptor de membrana (no soluble), la IL-6_D producida por las CEs se uniría a dos IL-6R, lo que podría inducir una señal, en este caso anti-apoptótica, más potente

que la IL-6_M.

Se ha descrito recientemente un modelo tridimensional del complejo hexamérico para el receptor de la IL-6³³³ basándose en observaciones previas aportadas en estudios de mutagénesis, datos bioquímicos y estructura del complejo hGH-hGHR (complejo de la hormona de crecimiento humana (hGH) con su receptor (hGHR)). El modelo tridimensional hexamérico inclina a los autores a predecir una interacción IL-6-IL-6 de baja afinidad, idea ya expresada anteriormente por Paonesha y col.³³¹, que sería un pre-requisito para el ensamblaje funcional del complejo hexamérico de la IL-6³³³. La interacción de la IL-6_D, una forma preestablecida de dos monómeros de IL-6, con su receptor podría entonces facilitar la formación del complejo hexamérico.

Ward y col.³⁰¹ describen, sin embargo, que el complejo IL-6_D+2 moléculas de IL-6Rs no parece tener capacidad para formar el complejo hexamérico con gp130 soluble (gp130s), es decir, el complejo IL-6/IL-6Rs/gp130s 2:2:2³⁰¹. De hecho, en el ensayo biológico que utilizan para comparar la actividad de las dos formas de IL-6, observan que la IL-6 dimérica antagoniza la actividad de la IL-6 monomérica sobre una de las vías de trasducción de señal de IL-6, en la que se produce la fosforilación en tirosina de STAT3³³⁴. Somers y col.³³³ y Mattheews y col.³³⁴ explican estos resultados atendiendo a las zonas de la IL-6 que se pueden unir a IL-6R y a gp130: a) Sitio 1, zona de la IL-6 donde se sitúan el N-terminal y el C-terminal, para la unión a IL-6R; b) Sitio 2, para la unión a la primera molécula de gp130; y c) Sitio 3, para la unión a la segunda molécula de gp130. En la IL-6_D³³⁴ el Sitio 1 queda libre para la unión a IL-6R. Sin embargo, el Sitio 3, utilizado para la formación del dímero de IL-6, no podría unirse a gp130s. Sin embargo, hay que recordar que el efecto inhibitorio de la IL-6_D se establece en un ensayo de fosforilación de STAT3, una vía implicada en procesos de proliferación/diferenciación, no de apoptosis (ver más adelante). Además, parte de estos hallazgos están basados en un sistema libre de células³⁰¹. Por lo tanto, no es en absoluto descartable que si dos monómeros de IL-6 pueden conducir a la dimerización del receptor, la IL-6_D pueda inducir la formación de oligómeros del receptor, amplificando por lo tanto la señal a nivel intracelular. En este sentido es posible que la “clusterización” del receptor de IL-6 conduzca a una respuesta biológica única.

La descripción de la IL-6 como un factor anti-apoptótico para las células de la LLC-B es un hecho controvertido: unos autores no encuentran efecto alguno^{251, 252}, mientras Reittie y col.²⁵³ describen un efecto promotor de supervivencia en las células leucémicas. Nuestros resultados mostraron que diferentes preparaciones comerciales de IL-6, naturales y recombinantes, mostraban efectos diversos en las células de la LLC-B: la IL-6 natural procedente de células de osteosarcoma mostró un notable efecto anti-apoptótico, aunque no tan llamativo como la IL-6 contenida en el M.Cd y necesitando además de concentraciones superiores a las presentes en el sobrenadante de las CEs. La IL-6r de *E. coli*, sin embargo, mostró un efecto muy leve. Puesto que, como se ha citado³⁰¹, la IL-6r de *E. coli* está constituida por la combinación de IL-6_D e IL-6_M, separamos ambas fracciones, y comprobamos que sólo la IL-6 dimérica tenía actividad anti-apoptótica, si bien claramente inferior a la mostrada por la IL-6 de la CE. Esta menor actividad de la IL-6_D de *E. coli* con respecto a la IL-6 de 40-60 kDa procedente de CEs podría deberse a una mayor inestabilidad de la forma dimérica de la IL-6r. De hecho, Matthews y col.³³⁴ demuestran que la disociación de la IL-6_D de *E. coli* en IL-6_M es de alrededor del 25% a las 24 horas y de casi un 50% a los 3 días (a 37°C). Por el contrario, nuestros estudios de termoestabilidad de la IL-6 contenida en el M.Cd mostraron que su actividad se mantenía incluso tras el calentamiento a 90°C.

Nuestros resultados indican que la glicosilación no es necesaria para la formación de dímeros de IL-6, ya que la IL-6 de *E. coli* mostró en la filtración sobre gel un doble pico de IL-6_D e IL-6_M. Esta observación es compatible con las descritas para otros factores solubles³³⁵. Sin embargo, la menor actividad de la IL-6_D de *E. coli* podría deberse a la no glicosilación de la misma. Como se sabe, la IL-6 puede ser producida de manera constitutiva o regulable por multitud de tipos celulares^{297, 336}. No se ha estudiado el Pm de la IL-6 de todas estas fuentes, si bien se considera que oscila entre 20-30 kDa. Existe, por tanto, una heterogeneidad en el Pm de la IL-6_M debida a modificaciones post-translacionales tales como N- y O-glicosilaciones y/o a diferentes fosforilaciones²⁹⁷. En fibroblastos, las IL-6 de 23-25 kDa son O-glicosiladas y las especies de 28-30 kDa son N- y O-glicosiladas³¹⁵. También se han detectado diferencias en la fosforilación de la IL-6 y se ha sugerido que éstas podrían servir para modular su función de una manera específica de tejido³³⁷. Nuestros resultados sugieren que la glicosilación juega un papel escasamente relevante, ya que una IL-6r procedente de células CHO (constituida por IL-

6_D e IL-6_M, según los resultados no mostrados que obtuvimos mediante una filtración sobre gel idéntica a la llevada a cabo con IL-6r de *E. coli*), y por tanto, glicosilada, no mostró efecto anti-apoptótico sobre la LLC-B.

Además de la probable disociación de la IL-6_D en IL-6_M de la IL-6r, hay que destacar las diferentes propiedades funcionales mostradas por proteínas recombinantes aparentemente idénticas. Así, la IL-6r de células de mamífero³³⁸ tiene una alta actividad antiviral y baja actividad sobre células B; la IL-6r de *E. coli* ensayada por May y col.³³⁹ tiene actividad antiviral y sobre células B, mientras que la IL-6r de *E. coli* de Hirano y col.³⁴⁰ no tiene ninguna actividad antiviral y tiene alta actividad sobre células B. Una diferencia estructural basada en diferentes glicosilaciones de la proteína no es posible ya que se detecta una diferencia funcional importante entre dos IL-6r procedentes de *E. coli*. Situaciones parecidas también se han descrito para otras interleuquinas recombinantes: IL-8r derivadas de células endoteliales y de monocitos, respectivamente tienen actividades muy diferentes, ya que la IL-8r de células endoteliales induce apoptosis en numerosas líneas de leucemias, mientras que la IL-8r de monocitos no tiene ningún efecto³⁴¹. De igual manera se han detectado diferencias notables en la actividad de las formas nativa y recombinante de algunas citoquinas³⁴². Es importante destacar que dada la trascendencia que parece tener la IL-6_D en la supervivencia de las células de la LLC-B, y la ausencia de actividad de la forma monomérica, la falta de eficacia de los preparados comerciales de IL-6r puede ser debida al efecto competitivo que la IL-6_M tiene con la IL-6_D con respecto a la unión al receptor de citoquina. En este sentido la separación por Pm es un paso esencial para ensayar el efecto de esta citoquina.

Las señales intracelulares que median el efecto anti-apoptótico de la IL-6 de 40-60 kDa contenida en el M.Cd de las CEs aún no han sido estudiadas en profundidad. Se sabe que después de la unión de la IL-6 a su receptor y de la homodimerización de gp130, se puede producir la activación de 2 vías principales de trasducción de señales: 1) la activación de las quinasas JAK-TYK, que determina la fosforilación en tirosina del factor de transcripción STAT3 y, en menor grado, de STAT1, y 2) la activación de *ras*, que da lugar a su vez a la activación de otras quinasas entre las que se incluyen las proteín-quinatas mitógeno-activadas (*mitogen-activated protein-kinases* o MAPKs). Sobre la activación de la vía de JAK-TYR

secundaria a la unión de IL-6 a su receptor, los datos de que se dispone apuntan a que transduce señales de proliferación/diferenciación, ya que a través de ella es vehiculada la señal de proliferación IL-6-dependiente en el mieloma múltiple (MM)^{343, 344} y de diferenciación IL-6-dependiente en la leucemia mieloide M1³⁴⁵. En cuanto a la segunda ruta principal de trasducción de señal de IL-6, la cascada de MAPK, ha sido implicada como vía importante en la regulación de la apoptosis en varios modelos *in vitro*: en la apoptosis de la célula B tras estimular la Ig de superficie con anti-IgM³⁴⁶, en la vía Fas de la célula T³⁴⁷ o en la inducción de apoptosis en neuronas por NGF (*nerve growth factor*)³⁴⁸. Una de las vías de señalización mediada por las MAPKs consiste en la activación secuencial de RAS/RAF/MEK y ERK³⁴⁹, mientras que la otra vía incluye la activación de JNK/SAPK. Ras puede activar ambas vías, y el equilibrio de ERK y JNK es decisivo en la supervivencia o muerte celular; concretamente en neuronas los estímulos anti-apoptóticos se acompañan de activación de ERK y/o inhibición de JNK³⁴⁸. Basados en estos datos Xu y col.¹⁶ han estudiado la vía de trasducción de señal que utiliza la IL-6 para inhibir la apoptosis en la célula B del MM, y han encontrado que concentraciones de IL-6 protectoras de apoptosis producen inhibición de la vía JNK, lo que de nuevo indica que el equilibrio ERK y JNK se relaciona con la apoptosis celular.

En lo referente a las señales que parecen trasducirse vía JAKs, hay que recordar que la IL-6 ha sido descrita como una citoquina con un papel importante en la diferenciación de la célula B³³⁶. Sin embargo, en la LLC-B la IL-6 recombinante no induce diferenciación ni tampoco proliferación^{208, 209}, incluso puede reducir la capacidad inductora de proliferación del TNF²⁰⁷. Nuestros resultados indican que la IL-6 del M.Cd, mayoritariamente dimérica, tampoco tiene un efecto anti-apoptótico mediado por proliferación y/o diferenciación. Otra neoplasia de células B en la que se ha estudiado la IL-6 como citoquina anti-apoptótica e inductora de proliferación es en el mieloma múltiple. En este tumor se ha descrito que la IL-6 estimula la proliferación en algunos tipos de MM^{350, 351} y también es inhibidora de apoptosis en otros estudios^{15, 16}, aunque hay experimentos indicativos de que estos dos efectos IL-6-dependientes son dissociables y parecen estar mediados por distintos mecanismos¹⁵.

Como se ha citado previamente, Matthews y col.³³⁴ demuestran que la IL-6_D antagoniza la fosforilación de STAT3 conseguida por IL-6_M mediante la activación de las JAKs. Ya que la IL-6_D de las CEs no induce proliferación ni diferenciación en las células de la LLC-B, es

probable que la vía de las quinasas JAK no esté activada, por lo que la actividad anti-apoptótica de la IL-6_D debería ir vehiculada a través de la vía MAPK en la LLC-B.

Desde que se descubrió que la proteína Bcl-2 bloqueaba la muerte celular programada¹²² se han descrito multitud de sistemas experimentales donde dicha proteína y/o proteínas relacionadas estructuralmente con ella (familia Bcl-2) han demostrado un papel determinante en la supervivencia celular. Así como para Bcl-2 se ha descrito una capacidad inhibidora de apoptosis¹²², Bax antagoniza el efecto protector de Bcl-2¹³². Por otra parte, Bcl-2 es activa cuando forma heterodímeros con Bax, en cuyo caso suprime apoptosis^{132, 139}; y la formación de homodímeros de Bax activa la apoptosis¹³⁹. Es decir, el equilibrio entre heterodímeros Bcl-2:Bax y homodímeros Bax:Bax es el que determina la supervivencia o muerte de las células¹³⁹. Hipotéticamente, la incubación de las células de la LLC-B con factores solubles que prevengan la apoptosis *in vitro* de estas células debería conducir a cambios en los niveles de expresión de Bcl-2 y/o Bax durante el periodo de incubación. Por ello, analizamos la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax por CMF. Nuestro objetivo al estudiar dichas proteínas era determinar su posible implicación en la inhibición de la apoptosis de la LLC-B inducida por el M.Cd de las CEs. Sin embargo, de los resultados obtenidos se deduce que ni la expresión de Bcl-2 ni la de Bax, expresadas como porcentaje de células positivas o como IMF, ni tampoco el cociente Bcl-2/Bax, se correlacionó con la actividad inhibidora de apoptosis del M.Cd de las CEs: inesperadamente, el incremento de la viabilidad de las células tumorales mediada por la IL-6_D contenida en el M.Cd no supuso el mantenimiento de los niveles elevados de Bcl-2 ni descenso de Bax con respecto a los detectados en medio completo, donde, tal y como ya se ha discutido, el porcentaje de células apoptóticas era claramente superior. Puesto que la inhibición de la apoptosis por parte del M.Cd es atribuible a la presencia de IL-6_D en el medio, podemos inferir que, en nuestro sistema experimental, el efecto anti-apoptótico de la IL-6 no es necesariamente dependiente de Bcl-2, Bax o del efecto combinado de ambos. En este sentido se ha descrito que el efecto inhibidor de la IL-6 en la apoptosis de las células tumorales del mieloma múltiple en humanos, un tumor de células B en un estadio de diferenciación más avanzado que el correspondiente a la LLC-B, no solo no aumenta o estabiliza los niveles de Bcl-2 con respecto a los detectados en las células tumorales frescas, sino que se acompaña de una disminución en

la cantidad de Bcl-2 expresado¹⁵, de una manera similar a lo descrito en nuestro sistema. De hecho, hay varios ejemplos donde Bcl-2 no es efectivo como agente bloqueante de apoptosis. Así, Bcl-2 protege mínimamente a los linfocitos de la apoptosis inducida por anticuerpos anti-CD95⁹⁷. En algunos trabajos que estudian la apoptosis en células B normales y neoplásicas se ha descrito que la expresión de Bcl-2 es independiente de la apoptosis inducida o suprimida por ciertos factores^{53, 234}. Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de Bcl-2 en la LLA de linaje B no se relaciona con la evolución de la enfermedad ni con resistencias a fármacos²²⁷. Resultados similares se han obtenido con los LNH de células B²²⁹. En la LLC-B algunos autores han defendido que Bcl-2 inhibe la muerte celular programada *in vitro*²⁶², incluso que podría ser la vía de escape principal de la apoptosis de la LLC-B^{263, 352} junto con la débil expresión de Fas^{264, 265}. En estudios *in vitro*, Hanada y col.²⁶² detectan una muerte más rápida en las LLC-Bs con niveles más bajos de Bcl-2. Otros autores han mostrado una regulación positiva de Bcl-2 en células cultivadas con citoquinas inhibitoras de la apoptosis en la LLC-B como la IL-4²⁵², la IL-8²⁵⁴ y el IFN α ²⁴⁷. Sin embargo, hay otros trabajos en los que no se encuentra relación entre la muerte de las células de la LLC-B y la expresión de Bcl-2^{241, 250, 268, 353, 354}. Estas discrepancias pueden ser explicadas, aunque sólo parcialmente, por la diferente metodología utilizada: el análisis de la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax por CMF en forma de moléculas equivalentes de fluorocromo soluble (MESF) y el cálculo posterior del cociente Bcl-2/Bax, demuestra que este cociente es más alto en pacientes no tratados o en pacientes tratados pero resistentes a tratamiento con respecto a pacientes tratados sensibles al tratamiento o a controles sanos³⁵²; resultados similares obtienen McConkey y col.²⁷¹ detectando en este caso Bcl-2 y Bax por inmunoblotting. Por otro lado, Osorio y col. demuestran que en la mayoría de los casos de LLC-Bs sometidas a estímulos inductores de apoptosis se detecta un descenso del ARNm de Bcl-2 y un aumento del ARNm de Bax y, por tanto, un descenso del cociente Bcl-2/Bax³⁵³. En otro estudio³⁵⁵ no se observa relación entre la progresión clínica de la LLC-B y los niveles de proteína Bcl-2; sin embargo, al analizar el cociente Bcl-2/Bax de ARNm detectan un valor significativamente mayor en el grupo de pacientes con enfermedad progresiva. El hecho de que la IL-6_D contenida en el M.Cd de las CEs inhiba la apoptosis *in vitro* de las células de la LLC-B, sin que al menos se mantengan, como cabría esperar, los niveles de Bcl-2 originales (o de Bax), en contraposición a lo descrito con otras citoquinas,

parece indicar que las vías de señalización están mediadas presumiblemente por diferentes mecanismos. Así, ya se han descrito algunas vías alternativas que incluyen proteínas relacionadas con Bcl-2, tales como Bcl-x_L o MCL-1, que desempeñan un papel más relevante que la propia proteína Bcl-2 en algunos estadios madurativos del linfocito B^{193, 356}.

En conclusión, nuestros resultados experimentales demuestran por vez primera que las CEs, un tipo celular con el que muy probablemente las células tumorales de la LLC-B mantienen *in vivo* numerosas interacciones, inhiben potentemente la apoptosis *in vitro* de estas células leucémicas, estando dicho efecto mediado por dímeros de IL-6.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

1. El medio condicionado procedente de las CEs de cordón umbilical humano (HUVEC y ECV-304) inhibe la apoptosis espontánea *in vitro* de las células de la LLC-B, lo que indica la secreción de un factor (es) soluble con actividad promotora de supervivencia sobre las células leucémicas.
2. El efecto anti-apoptótico del M.Cd ha sido confirmado mediante diferentes métodos citométricos capaces de cuantificar el porcentaje de células muertas (FSC/SSC, Anexina-V/IP, TUNEL y pico hipodiploide) así como por el método semicuantitativo de la electroforesis de ADN en gel de agarosa. El método que muestra mayor sensibilidad es el marcaje con Anexina-V/IP, ya que detecta células desde estadios muy iniciales hasta estadios finales de la apoptosis.
3. El M.Cd inhibe significativamente la apoptosis espontánea *in vitro* de las células de la LLC-B con respecto al M.C durante los tres primeros días de cultivo, con cinéticas de apoptosis ascendentes en ambos casos. Los porcentajes de mortalidad celular se igualan por lo general a día +4 por el consumo del factor (es) inhibidor. En los cultivos en *transwell*, por el contrario, la viabilidad se mantiene alta después del día +4, como consecuencia lógica de la producción continuada del factor (es).
4. El aparente efecto antiapoptótico mediado por contactos físicos CE/célula leucémica es irrelevante, ya que:
 4. 1. Anticuerpos bloqueantes anti-moléculas de adhesión expresadas en la mayoría de las células de la LLC-B (CD18, CD29, CD62L y CD44) no afectan a la inhibición de la apoptosis de la célula leucémica.
 4. 2. Las proteínas de matriz extracelular (purificadas o procedentes de CE) no afectan a la viabilidad de la célula leucémica.
 4. 3. La fijación de la monocapa de CEs anula el efecto anti-apoptótico de dichas células sobre la célula leucémica.
 4. 4. Las CEs fagocitan las células apoptóticas de la LLC-B.

5. La señal anti-apoptótica mediada por el M.Cd de la CE no induce proliferación ni diferenciación de la célula tumoral.
6. La actividad promotora de supervivencia del M.Cd de la CE es específica para las células de la LLC-B: no actúa sobre linfocitos de SP de individuos sanos, ni sobre las células B de CG y MF de amígdala.
7. El efecto anti-apoptótico del M.Cd de CE es aparentemente inferior en otras células B neoplásicas (linfoma de manto y LPL-B) con respecto al descrito en las células de la LLC-B.
8. El factor (es) soluble del M.Cd con actividad anti-apoptótica posee una elevada termoestabilidad.
9. La actividad anti-apoptótica del M.Cd es retenida en el concentrado de una membrana de ultrafiltración con un poro para 50 kDa y eluye en las fracciones de 40-60 kDa de un S-200.
10. Los anticuerpos neutralizantes anti-IL-6 bloquean totalmente el efecto anti-apoptótico del M.Cd.
11. Las células de la LLC-B expresan el receptor de IL-6 (CD126) en su membrana.
12. La IL-6 del M.Cd de la CE con efecto anti-apoptótico sobre la LLC-B tiene un peso molecular de 40-60 kDa sugerente de una forma dimérica de esta citoquina. La forma monomérica (≈ 25 kDa) no tiene ningún efecto sobre la apoptosis de la LLC-B.
13. La IL-6 del M.Cd de la CE se detecta en SDS-PAGE, tras marcaje metabólico e inmunoprecipitación con anticuerpos anti-IL-6, con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, lo que excluye una unión covalente en la formación del dímero.

14. La IL-6 natural procedente de células de osteosarcoma retrasa la apoptosis de la LLC-B, si bien las concentraciones necesarias para alcanzar un efecto equivalente al descrito para el M.Cd son superiores.
15. Las IL-6r procedentes de levadura y de células CHO no tienen actividad anti-apoptótica sobre las células de la LLC-B.
16. La IL-6r de *E. coli* posee un efecto inhibidor de apoptosis de la LLC-B inferior al de la IL-6 del M.Cd. Este efecto es atribuible exclusivamente a la forma dimérica (≈ 45 kDa) de esta IL-6r, ya que la forma monomérica (≈ 25 kDa) no tiene ningún efecto sobre la apoptosis de la LLC-B.
17. Las proteínas Bcl-2 y Bax de la célula de la LLC-B no están implicadas directamente en el efecto anti-apoptótico de la IL-6 producida por el endotelio.

BIBLIOGRAFIA

7.- BIBLIOGRAFIA

1. Cohen JJ (1993). Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130
2. Kerr JFR; Wyllie AH and Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257
3. Howie SEM; Harrison DJ and Wyllie AH (1994). Lymphocyte apoptosis. Mechanisms and implications in disease. *Immunol Rev* 142: 141-156
4. Searle J; Kerr JFR and Bishop CJ (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 17: 229-259
5. Naruse I and Keino H (1995). Apoptosis in the developing CNS. *Prog Neurobiol* 47: 135-155
6. Zakeri ZF and Ahuja HS (1994). Apoptotic cell death in the limb and its relationship to pattern formation. *Biochem Cell Biol* 72: 603-613
7. Hennekam RC and Cohen MM (1995). Hypothesis: patient with possible disturbance in programmed cell death. *Eur J Hum Genet* 3: 374-377
8. Koury MJ (1992). Programmed cell death (apoptosis) in hematopoiesis. *Exp Hematol* 20: 391-394
9. Levy Y and Brouet JC (1994). Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of bcl-2 protein. *J Clin Invest* 93: 424-428
10. Duke RC and Cohen JJ (1986). IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res* 5: 289-299
11. Williams GT; Smith CA; Spooner E; Dexter TM and Taylor DR (1990). Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343: 76-79
12. Koury MJ and Bondurant MC (1990). Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed cell death in erythroid progenitor cells. *Science* 248:378-381
13. Magan DF and Wahl SM (1991). Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol* 147: 3408-3412
14. Hardin J; MacLeod S; Grigorieva I; Chang R; Barlogie B; Xiao H and Epstein J (1994).

- Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood* 84: 3063-3070
15. Lichtenstein A; Tu Y; Fady C; Vescio R and Berenson J (1995). Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell Immunol* 162: 248-255
 16. Xu F; Sharma S; Gardner A; Tu Y; Raitano A; Sawyers C and Lichtenstein A (1998). Interleukin-6-induced inhibition of multiple myeloma cell apoptosis: support for the hypothesis that protection is mediated via inhibition of JNK/SAPK pathway. *Blood* 92: 241-251
 17. Núñez G; London L; Hockenbery D; Alexander M; McKearn JP and Korsmeyer SJ (1990). Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 144: 3602-3610
 18. Migliorati G; Nicoletti I; Crocicchio F; Pagliacci C; D'Adamio F and Riccardi C (1992). Heat shock induces apoptosis in mouse thymocytes and protects them from glucocorticoid-induced cell death. *Cell Immunol* 143: 348-356
 19. Sellins KS and Cohen JJ (1987). Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J Immunol* 139: 3199-3206
 20. Hickman JA (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metast Rev* 11: 121-139
 21. Reed JC (1995). Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hemato Onco Clin North Am* 9: 451-473
 22. Wyllie AH (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556
 23. McConkey DJ; Nicotera P; Hartzell P; Bellomo G; Wyllie A and Orrenius S (1989). Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca^{2+} concentration. *Arch Biochem Biophys* 269: 365-370
 24. Wyllie AH; Morris RG; Smith AL and Dunlop D (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142: 67-77
 25. Cohen JJ and Duke RC (1984). Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132: 38-42
 26. Nagata S and Golstein P (1995). The fas death factor. *Science* 267: 1449-1456

27. Smith CA; Williams GT; Kinston R; Jenkinson EJ and Owen JJT (1989). Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 337: 181-184
28. McConkey DJ; Hartzell P; Amador-Perez JF; Orrenius S and Jondal M (1989). Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J Immunol* 143: 1801-1806
29. McConkey DJ; Hartzell P; Nicotera P and Orrenius S (1989). Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J* 3: 1843-1849
30. Cuende E; Ales-Martinez JE; Ding L; González-García M; Martínez C and Núñez G (1993). Programmed cell death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *EMBO J* 12: 1555-1560
31. Cagan RL and Ready DF (1989). The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Devel Biol* 136: 346-362
32. Wyllie AH; Kerr JFR and Currie AR (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306
33. Hess KL; Tudor K-S RS; Johnson JD; Osati-Ashtiani F; Askew DS and Cook-Mills JM (1997). Human and murine high endothelial venule cells phagocytose apoptotic leukocytes. *Exp Cell Res* 236: 404-411
34. Dini L; Lentini A; Diez-Diez G; Rocha M; Falasa L; Sarafino L and Vidal-Vanaclocha F (1995). Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci* 108: 967-773
35. Hall SE; Savill JS; Henson PM and Haslett C (1994). Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol* 153: 3218-3227
36. Morris RG; Hargreaves AD; Duval E and Wyllie AH (1984). Hormone-induced cell death. 2. Surface change in thymocytes undergoing apoptosis. *Am J Path* 115: 426-436
37. Savill J; Dransfield I; Hogg N and Haslett C (1990). Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343: 170-173
38. Fadok VA; Savill JS; Haslett C; Bratton DL; Doherty DE; Campbell PA and Henson PM (1992). Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149: 4029-

4035

39. Savill J; Fadok V; Henson P and Haslett C (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14: 131-136
40. Pytela R; Pierschbacher MD and Rouslahti E (1985). A 125/115 cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5766-5770
41. Fadok VA; Voelker DR; Campbell PA; Cohen JJ; Bratton DL and Henson PM (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes trigger specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148: 2207-2216
42. Castedo M; Hirsch T; Susin SA; Zamzami N; Marchetti P; Macho A and Kroemer G (1996). Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 157: 512-521
43. Devitt A; Moffatt OD; Raykindalia C; Cappa JD; Simmons DL and Gregory CD (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392: 505-509
44. Petit PX; Lecoecur H; Zorn E; Dauguet C; Mignotte B and Gougeon ML (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 130: 157-167
45. Martin SJ; O'Brien GA; Nishioka WK; McGahon AJ; Mahboubi A; Saido TC and Green DR (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 270: 6425-6428
46. Tinnemans MM; Lenders MH; ten-Velde GP; Ramaekers FC and Schutte B (1995). Alterations in cytoskeletal and nuclear matrix-associated proteins during apoptosis. *Eur J Cell Biol* 68: 35-46
47. Vaux DL and Strasser A (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2239-2244
48. Golstein P; Ojcius DM and Young DE (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121: 29-65
49. Zheng L; Fisher G; Miller RE; Peschon J; Lynch DH and Lenardo MJ (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 377: 348-351

50. Sarin A; Conan-Cobotti M and Henkart PA (1995). Cytotoxic effect of TNF and lymphotoxin on T lymphoblasts. *J Immunol* 155: 3716-3718
51. Andjelic S; Khanna A; Suthanthiran M and Nikolic-Zugic J (1997). Intracellular Ca^{2+} activation and cyclosporin A synergistically induce TGF-beta 1-mediated apoptosis in lymphocytes. *J Immunol* 158: 2527-2534
52. Chaouchi N; Arvanitakis L; Auffredou MT; Blanchard DA; Vazquez A and Sharma S (1995). Characterization of transforming growth factor beta 1 induced apoptosis in normal human B cells and lymphoma B cell lines. *Oncogene* 11: 1615-1622
53. Lømo J; Blomhoff HK; Beiske K; Stokke T and Smeland EB (1995). TGF- β 1 and cyclic AMP promote apoptosis in resting human B lymphocytes. *J Immunol* 154: 1634-1643
54. Douglas RS; Capocasale RJ; Lamb RJ; Nowell PC and Moore JS (1997). Chronic lymphocytic leukemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor- β . *Blood* 89: 941-947
55. Buske C; Becker D; Fering-Buske M; Hannig H; Wulf G; Schafer C; Hiddemenn W and Wormann B (1997). TGF-beta inhibits growth and induces apoptosis in leukemic B cell precursors. *Leukemia* 11: 386-392
56. Lotem J and Sachs L (1992). Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor beta 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood* 80: 1750-1757
57. Havrilesky LJ; Hurteau JA; Whitaker RS; Elbendary A; Wu S; Rodríguez GC; Bast RC and Berchuck A (1995). Regulation of apoptosis in normal and malignant ovarian epithelial cells by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 55: 944-948
58. Sánchez A; Alvarez AM; Benito M and Fabregat I (1996). Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 271: 7416-7422
59. Lin JK and Chou CK (1992). In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 52: 385-388
60. Yanagihara K and Tsumuraya M (1992). Transforming growth factor beta 1 induces apoptotic cell death in cultured human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 52: 4042-4045
61. Friesen C; Herr I; Krammer PH and Debatin KM (1996). Involvement of CD95

- (APO/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Med* 2: 574-577
62. Sodhi A and Pai K (1992). Increased production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human monocytes treated in vitro with cisplatin or other biological response modifiers. *Immunol Lett* 34: 183-188
 63. Gorelik L and Mokyr MB (1995). Low-dose-melphalan-induced up-regulation of type-1 cytokine expression in the s.c. tumor nodule of MOPC-315 tumor bearers and the role of interferon gamma in the therapeutic outcome. *Cancer Immunol Immunother* 41: 363-374
 64. Ding AH; Porteu F; Sánchez E and Nathan CF (1990). Shared actions of endotoxin and taxol on TNF receptors and TNF release. *Science* 248: 370-372
 65. Wiegmann K; Schutze S; Machleidt T; Witte D and Kronke M (1994). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78: 1005-1015
 66. Rose R; Verheij M; Haimovitz-Friedman A; Scotto K; Fuks Z and Kolesnick R (1995). Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* 82: 405-414
 67. Rubin E; Kharbanda S; Gunji H and Kufe D (1991). Activation of the c-jun protooncogene in human myeloid leukemia cells treated with etoposide. *Mol Pharmacol* 39: 697-701
 68. Rubin F; Kharbanda S; Gunji H; Weichselbaum R and Kufe D (1992). Cis-Diamminedichloroplatinum (II) induces c-jun expression in human myeloid leukemia cells: potential involvement of a protein kinase C-dependent signaling pathway. *Cancer Res* 52: 878-882
 69. Bhushan A; Abramson R; Chiu JF and Tritton TR (1992). Expression of c-fos in human and murine multidrug-resistant cells. *Mol Pharmacol* 42: 69-74
 70. Kaufmann SH; Desnoyers S; Ottaviano Y; Davidson NE and Poirier GG (1993). Specific proteolytic cleavage of poli(ADP-ribose)polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53: 3976-3985
 71. Walker PR; Smith C; Youdale T; Leblanc J; Whitfield JF and Sikorska M (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 51: 1078-1085

72. Geley S; Hartmann BL; Hala M; Strasser-Wozak EM; Kapelari K and Kofler R (1996). Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells is due to insufficient glucocorticoid receptor expression. *Cancer Res* 56: 5033-5038
73. Caron-Leslie JM; Schwartzman RA; Gaido ML; Compton MM and Cidlowski JA (1991). Identification and characterization of glucocorticoid-regulated nuclease(s) in lymphoid cells undergoing apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40: 661-671
74. Martz E and Howell DM (1989). CTL: virus control cells first and cytolytic cells second? DNA fragmentation, apoptosis and the prelytic halt hypothesis. *Immunol Today* 10: 79-86
75. Ucker DS (1987). Cytotoxic T lymphocytes and glucocorticoids activate an endogenous suicide process in target cells. *Nature* 327: 62-64
76. Squier MK and Cohen JJ (1994). Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* 6: 447-452
77. Ogasuwara J; Watanabe-Fukunaga R; Adachi M; Matsuzawa A; Kasugai T; Kitamura Y; Itoh N; Suda T and Nagata S (1993). Lethal effect of the anti-Fas anti-body in mice. *Nature* 364: 806-809
78. Trauth BC; Klas C; Peters AMJ; Matzku S; Moller P; Falk W; Debatin KM and Krammer PH (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245: 301-305
79. Clarke AR; Gledhill S; Hooper ML; Bird CC and Wyllie AH (1994). P53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following γ irradiation. *Oncogene* 9: 1767-1773
80. Clarke AR; Purdie CA; Harrison DJ; Morris RG; Bird CC; Hooper MC and Wyllie AH (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362: 849-852
81. Sugahara H; Kanakura Y; Furitsu T; Ishihara K; Oritani K; Ikeda H; Kitayama H; Ishikawa J; Hashimoto K; Kanayama Y and Matsuzawa Y (1994). Induction of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectin via its interaction with very late antigen 5. *J Exp Med* 179: 1757-1766
82. Boldin MP; Varfolomeev EE; Pancer Z; Mett IL; Camonis JH and Wallach D (1995). A

- novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motif related to the death domain (1995). *J Biol Chem* 270: 7795-7798
83. Boldin MP; Mett IL; Varfolomeev EE; Chumakov I; Shemeravni Y; Canonis JH and Wallach D (1995). Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* 270: 387-391
 84. Hsu HL; Xiong J and Goeddel DV (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81: 495-504
 85. Stanger BZ; Leder P; Lee TH; Kim E and Seed B (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81: 513-523
 86. Chinnaiyan AM; O'Rourke K; Tewari M and Dixit VM (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domains of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512
 87. Heller RA; Song K; Fan N and Chang DJ (1992). The p70 tumor necrosis factor. *Cell* 70: 47-56
 88. Grell M; Zimmermann G; Hulser D; Pfizenmaier K and Scheurich P (1994). TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J Immunol* 153: 1963-1972
 89. Rothe M; Sarma V; Dixit VW and Goeddel DV (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269: 1424-1427
 90. Rothe M; Wong SC; Henzel WJ and Goeddel DV (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78: 681-692
 91. Massagué J; Cheifetz S; Boyd FT and Andres JL (1990). TGF- β receptors and TGF- β binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci* 593: 59-72
 92. Wrana JL; Attisano L; Carcamo J; Zentella A; Doody J; Laiho M; Wang XF and Massague J (1992). TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71: 1003-1014

93. Gehring U (1993). The structure of the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol* 45: 183-190
94. Reik A; Schutz G and Stewart AF (1991). Glucocorticoids are required for establishment and maintenance of an alteration in chromatin structure: induction leads to a reversible disruption of nucleosomes over an enhancer. *EMBO J* 10: 2569-2576
95. Alnemri ES and Litwack G (1990). Activation of internucleosomal DNA cleavage in human CEM lymphocytes by glucocorticoid and novobiocin. *J Biol Chem* 265: 17323-17333
96. Wang D; Freeman GJ; Levine H; Ritz J and Robertson M (1997). Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies. *Br J Haematol* 97: 409-417
97. Itoh N; Tsujimoto Y and Nagata S (1993). Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J Immunol* 151: 621-627
98. Obeid LM; Linardic CM; Karolak LA and Hannun YA (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259: 1769-1771
99. Mathias S and Kolesnick R (1993). Ceramide: a novel second messenger. *Adv Lipid Res* 25: 65-90
100. Cifone MG; De MR; Roncaioli P; Rippo MR; Azuma M; Lanier LL; Santoni A and Testi R (1994). Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates and acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 180: 1547-1552
101. Kim MY; Linardic C; Obeid L and Hannun Y (1991). Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* 266: 484-489
102. Barber SA; Perera PY and Vogel SN (1995). Defective ceramide response in C3H/HeJ(Lpsd) macrophages. *J Immunol* 155: 2303-2305
103. Jaattela M; Benedict M; Tewari M; Shayman JA and Dixit VM (1995). Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene* 10: 2297-2305
104. Zychlinsky A; Zheng LM; Liu CC and Young JD (1991). Cytolytic lymphocytes induce both apoptosis and necrosis in target cells. *J Immunol* 146: 393-400
105. Lowin B; Hahne M; Mattmann C and Tschopp J (1994). Cytolytic T-cell cytotoxicity

- is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370: 650-652
106. Berke G (1994). The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 12: 735-773
 107. Song Q; Burrows SR; Smith G; Lees-Miller SP; Kumar S; Cahn DW; Trapani JA; Alnemri E; Litwack G; Lu H; Moss DJ; Jackson S and Lavin MF (1996). Interleukin-1 beta-converting enzyme-like protease cleaves DNA-dependent protein kinase in cytotoxic T cell killing. *J Exp Med* 184: 619-626
 108. Canman CE and Kastan MB (1997). Role of p53 in apoptosis. *Adv Pharmacol* 41: 429-460
 109. Ellis HM and Horvitz HR (1986). Genetic control of programmed cell death in nematode *C. elegans*. *Cell* 44: 817-829
 110. Yuan JY; Shaham S; Ledoux S; Ellis HM and Horvitz HR (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75: 641-652
 111. Salvensen GS and Dixit VM (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91: 443-446
 112. Martin SJ and Green DR (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. *Cell* 82: 349-352
 113. De Murcia G and De Murcia JM (1994). Poly (ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 19: 172-176
 114. Lazebnik YA; Kaufmann SH; Desnoyers S; Poirier GG and Earnshaw WC (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371: 346-347
 115. Nicholson DW; Ali A; Thornberry NA; Vaillancourt JP; Ding CK; Gallant M; Gareau Y; Griffin PR; Labelle M; Lazebnik YA; Munday NA; Raju SM; Smulson ME; Yamin TT; Yu VL and Miller DK (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37-43
 116. Tewari M; Quan LT; O'Rourke K; Desnoyers S; Zeng Z; Beidler DR; Poirier GG; Salvensen GS and Dixit VM (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose)polymerase.

Cell 81: 801-809

117. Kuida K; Lippke JA; Ku G; Harding MW; Livingston DJ; Su MS and Flavell RA (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267: 2000-2003
118. Li P; Allen H; Banerjee S; Franklin S; Herzog L; Johnston C; McDowell J; Paskind M; Rodman L; Salfeld J; Towne E; Tracay D; Wardwell S; Wei FY; Wong W; Kamen R and Seshadri T (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80: 401-411
119. Yuan J and Horvitz HR (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 309-320
120. Jacobson MD; Burne JF and Raff MC (1994). Programmed cell death and Bcl-2 protein in the absence of a nucleus. *EMBO J* 13: 1899-1910
121. Vaux DL; Cory S and Adams JM (1988). Bcl-2 gene promotes hemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442
122. Hockenbery D; Núñez G; Millman C; Schreiber RD and Korsmeyer SJ (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336
123. Monaghan P; Robertson D; Amos TA; Mason DY and Greaves MF (1992). Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem* 40: 1819-1825
124. Nguyen M; Millar DG; Yong VW; Korsmeyer SJ and Shore GC (1993). Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 68: 25265-25268
125. Sentman CL; Shutter JR; Hockenbery D; Kanagawa O and Korsmeyer SL (1991). Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 67: 879-888
126. Strasser A; Harris AW and Cory S (1991). Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self censorship. *Cell* 67: 889-899
127. Tsujimoto Y (1989). Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* 4: 1331-1336

128. Hengartner MO and Horvitz HR (1994). *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76: 665-676
129. Lin EY; Orlofski A; Berger MS and Prystowsky MB (1993). Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to *bcl-2*. *J Immunol* 151: 1979-1988
130. Kozopas KM; Yang T; Buchan HL; Zhou P and Craig RW (1993). MCL-1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3516-3520
131. Reynolds JE; Yang T; Qian LP; Jenkinson JD; Zhou P; Eastman A and Craig RW (1994). Mcl-1, a member of Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 54: 6348-6352
132. Oltvai ZN; Millman CL and Korsmeyer SL (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619
133. Yang E; Zha J; Jockel J; Boise LH; Thompson CB and Korsmeyer SL (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-291
134. Kiefer MC; Brauer MJ; Powers VC; Wu JJ; Umansky SR; Tomei LD and Barr PJ (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374: 736-739
135. Farrow SN; White J; Martinou I; Raven T; Pun KT; Grinhan CJ; Martinou JC and Brown R (1995). Cloning of a *bcl-2* homologue by interaction with adenovirus E1B 19k. *Nature* 374: 731-733
136. Chittenden T; Harrington EA; O'Connor R; Flemington C; Lutz RJ; Evan GI and Guild BC (1995). Induction of apoptosis by Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374: 733-736
137. Boise LH; Gonzales-Garcia M; Postema CE; Ding L; Lindstein T; Turka LA; Mao X; Núñez G and Thompson CB (1993). Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-608
138. Sato T; Hanada M; Bodrug S; Irie SJ; Iwama N; Boise LH; Thompson CB; Golemis E; Fong L; Wang HG and Reed JC (1994). Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9238-

9242

139. Yin XM; Oltvai ZN and Korsmeyer SJ (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369: 321-323
140. Cory S (1995). Regulation of lymphocyte survival by the Bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol* 13: 513-543
141. Yang E and Korsmeyer SJ (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88: 386-401
142. Kane DJ; Sarafian TA; Anton R; Hahn H; Butler-Gralla E; Silverstone-Valentine J; Örd T and Bredesen DE (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262: 1274-1277
143. Hockenbery DM; Oltvai ZN; Yin XM; Millman CL and Korsmeyer SJ (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251
144. Lam M; Dubyak G; Chen L; Núñez G; Miesfeld RL and Distelhorst CW (1994). Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6569-6573
145. Cheng EHY; Levine B; Boise LH; Thompson CB and Hardwick JM (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-x_L. *Nature* 379: 554-556
146. Chittenden T; Flemington C; Houghton AB; EBB RG; Gallo GJ; Elangovan B; Chinnadurai G and Lutz RJ (1995). A conserved domain of Bak distinct from BH1 and BH2 mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* 14: 5589-5596
147. Pham CT and Ley TJ (1997). The role of granzyme B cluster proteases in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* 9: 127-133
148. Tian Q; Streuli M; Saito H; Schollossman SF and Anderson P (1991). A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67: 629-639
149. Darmon AJ; Nicholson DW and Bleackley RC (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377: 446-448
150. Darmon AJ; Ley TJ; Nicholson DW and Bleackley RC (1996). Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J Biol Chem* 271: 21709-21712

151. Shi L; Chen G; MacDonald G; Bergeron L; Li H; Miura M; Rotello RJ; Miller DK; Li P; Seshadri T; Yuan J and Greenberg AH (1996). Activation of an interleukin 1 converting enzyme-dependent apoptosis pathway by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11002-11007
152. Harvey NL; Trapani JA; Fernandes-Alnemri T; Litwack G; Alnemri ES and Kumar S (1996). Processing of the Nedd2 precursor by ICE-like proteases and granzyme B. *Genes Cells* 1: 673-685
153. Thornberry NA; Rano TA; Peterson EP; Rasper DM; Timkey T; Garcia-Calvo M; Houtzager VM; Nordstrom PA; Roy S; Vaillancourt JP; Chapman KT and Nicholson DW (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272: 17909-17911
154. Talanian RV; Yang X; Turbov J; Seth P; Ghayur T; Casiano CA; Orth K and Froelich CJ (1997). Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J Exp Med* 186: 1323-1331
155. Chiu VK; Walsh CM; Liu CC; Reed JC and Clark WR (1995). Bcl-2 blocks degranulation but not fas-based cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 154: 2023-2032
156. Renvoize C; Roger R; Mouliau N; Bertoglio J and Breard J (1997). Bcl-2 expression in target cells leads to functional inhibition of caspase-3 protease family in human NK and lymphokine-activated killer cell granule-mediated apoptosis. *J Immunol* 159: 126-134
157. Sutton VR; Vaux DL and Trapani JA (1997). Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 158: 5783-5790
158. Arend MJ; Morris RG and Wyllie AH (1990). Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136: 593-608
159. Ribeiro JM and Carson DA (1993). $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease from human spleen: purification, properties, and role in apoptosis. *Biochemistry* 32: 9129-9136
160. Khodarev NN and Ashwell JD (1996). An inducible lymphocyte nuclear $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease associated with apoptosis. *J Immunol* 156: 922-931
161. Polzar B; Zanotti S; Stephan H; Rauch F; Peitsch MC; Irmeler M; Tschopp J and

- Mannherz HG (1994). Distribution of deoxyribonuclease I in rat tissues and its correlation to cellular turnover and apoptosis (programmed cell death). *Eur J Cell Biol* 64: 200-210
162. Barry MA and Eastman A (1993). Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 300: 440-450
163. Enari M; Sakahira H; Yokoyama H; Okawa K; Iwamatsu A and Nagata S (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50
164. Sakahira H; Enari M and Nagata S (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99
165. Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462
166. Suda T; Takahashi T; Golstein P and Nagata S (1993). Molecular cloning and expression on the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178
167. Ameisen JC and Capron A (1991). Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol Today* 12: 102-105
168. Groux H; Torpier G; Monte D; Mouton Y; Capron A and Ameisen JC (1992). Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 175: 331-340
169. Gougeon ML and Montagnier L (1993). Apoptosis in AIDS. *Science* 260: 1269-1270 [erratas en *Science* 1993; 260: 1709]
170. Debatin KM; Fahrig-Faissner A; Enenkel-Stoodt S; Kreutz W; Benner A and Krammer PH (1994). High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood* 83: 3101-3103
171. Rosen DR; Siddique T; Patterson D; Figlewicz DA; Sapp P; Hentati A; Donaldson D; Goto J; Oregan JP; Deng HX; et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62
172. Deng HX; Hentati A; Tainer JA; Iqbal Z; Cayabyab A; Hung WY; Getzoff ED; Hu P; Herzfeldt B; Ross RP et al. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science* 261: 1047-1051

173. Chang GQ; Hao Y and Wong F (1993). Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 11: 595-605
174. Behl C; Davis J; Cole GM and Schubert D (1992). Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 944-950
175. Yoshida Y (1993). Hypothesis: apoptosis may be the mechanism responsible for the premature intramedullary cell death in the myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 7: 144-146
176. Dunstan CR; Somers NM and Evans RA (1993). Osteocyte death and hip fracture. *Calcif Tissue Int* 53: S113-117
177. Mohr W and Lehmann Z (1992). Osteoarthritis of the ankle joints in old rats. *Z Rheumatol* 51: 35-40
178. Ishizaki Y; Burne JF and Raff MC (1994). Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture. *J Cell Biol* 126: 1069-1077
179. Kramer PH; Behrmann I; Daniel P; Dhein J and Debatin KM (1994). Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 6: 279-289
180. Lagneaux L; Delforge A; Bron D; De Bruyn C and Stryckmans P (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 91: 2387-2396
181. Schena M; Larsson LG; Gottardi D; Carlsson M; Nilsson K and Cligaris-Cappio F (1992). Growth-and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 79: 2981-2989
182. Gibson LF; Piktet D; Narayanan R; Núñez G and Landreth KS (1996). Stromal cells regulate bcl-2 and bax expression in pro-B cells. *Exp Hematol* 24: 628-637
183. McDonnell TJ; Deane N; Platt FM; Núñez G; Jaeger U; McKearn JP and Korsmeyer SJ (1989). Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57: 79-88
184. Campana D; Coustan-Smith E; Manabe A; Buschle M; Raimondi SC; Behm FG; Ashmun R; Arico M; Biondi A and Pui CH (1993). Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by overexpression of Bcl-2 protein. *Blood* 81: 1025-1031
185. Liu YJ; Joshua DE; Williams GT; Smith CA; Gordon J and MacLennan ICM (1989).

- Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342: 929-931
186. McConkey DJ; Aguilar-Santelises M; Hartzell P; Eriksson I; Mellstedt H; Orrenius S and Jondal M (1991). Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 146: 1072-1076
 187. Choe J; Kim HS; Zhang X; Armitage RJ and Choi YS (1996). Cellular and molecular factors that regulate the differentiation and apoptosis of germinal center B cells. *J Immunol* 157: 1006-1016
 188. Liu YJ; Mason DY; Johnson GD; Abbot S; Gregory CD; Hardie DL; Gordon J and MacLennan ICM (1991). Germinal center cells express bcl-2-protein after activation by signals which prevent their entry to apoptosis. *Eur J Immunol* 21: 1905-1910
 189. Martínez-Valdez H; Guret C; de Bouteiller O; Fugier I; Banchereau J and Liu YJ (1996). Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P⁵³, and Bax but not the survival gene Bcl-2. *J Exp Med* 183: 971-977
 190. Chleq-Deschamps CM; LeBrun DP; Huie P; Besnier DP; Warnke RA; Sibley RK and Cleary ML (1993). Topographical dissociation of Bcl-2 messenger RNA and protein expression in human lymphoid tissues. *Blood* 81: 293-298
 191. Koopman G; Keehnen RMJ; Lindhout E; Newman W; Shimizu Y; van Senter GA; deGroot C and Pals ST (1994). Adhesion through the LFA-1(CD11a/CD18)-ICAM-1(CD54) and the VLA-4(CD49d)-VCAM-1(CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J Immunol* 152: 3760-3767
 192. Fluckiger AC; Brière F; Zurawski G; Bridon JM and Banchereau J (1994). IL-13 has only a subset of IL-4-like activities on B chronic lymphocytic leukaemia cells. *Immunology* 83: 397-403
 193. Lømo J; Blomhoff HK; Jacobsen SE; Krajewski S; Reed JC and Smeland EB (1997). Interleukin-13 in combination with CD40 ligand potently inhibits apoptosis in human B lymphocytes: upregulation of Bcl-x_L and Mcl-1. *Blood* 89: 4415-4424
 194. Tsujimoto Y; Finger LR; Yunis J; Nowell PC and Croce CM (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cell with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226: 1097-1099
 195. Tsujimoto Y; Cossman J; Jaffe E and Croce C (1985). Involvement of the bcl-2 gene

- in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443
196. Lowe SW; Bodis S; McClatchey A; Remington L; Ruley HE; Fisher DE; Housman DE and Jacks T (1994). P53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 266: 807-810
 197. Harrison. *Principios de Medicina Interna*. 13^a Ed. Vol II; pag. 2039-2040
 198. Freedman AS (1990). Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Hemato Onco Clin North Am* 4: 405-429
 199. Dighiero G; Travade P; Chevret S; Fenaux P; Chastang C; Binet JL; and The French Cooperative Group on CLL (1991). B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. *Blood* 78: 1901-1914
 200. Bloem AC; van Hooff COM; Bast EJEG and Ballieux RE (1984). Mitogenic stimulation of malignant B cell. Chronic lymphocytic leukaemia: secretion of monoclonal IgM by in vitro-induced plasmablasts. *Clin Exp Immunol* 55: 636-642
 201. Tötterman TH; Nilsson K and Sundström C (1980). Phorbol ester-induced differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells. *Nature* 288: 176-178
 202. Gordon J; Mellstedt H; Aman P; Biberfeld P and Klein G (1984). Phenotypic modulation of chronic lymphocytic leukemia cells by phorbol ester: induction of IgM secretion and changes in the expression of B cell-associated surface antigens. *J Immunol* 132: 541-547
 203. Drexler HG; Benner MK; Coustan-Smith E; Wickremasinghe G and Hoffbrad AV (1987). Synergistic action of calcium ionophore A23187 and phorbol ester TPA on B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 70: 1536-1542
 204. Maddy AH; Sanderson A; Mackie MJ and Smith SK (1989). The role of cell maturation in the generation of phenotypic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* 68: 346-352
 205. Carlsson M; Totterman TH; Matsson P and Nilsson K (1988). Cell cycle progression of B-chronic lymphocytic leukemia cells induced to differentiate by TPA. *Blood* 71: 415-421
 206. Trentin L; Cerutti A; Zambello R; Sancetta R; Tassinari C; Facco M; Adami F; Rodeghiero F; Agostini C and Semenzato G (1996). Interleukin-15 promotes the growth

- of leukemia cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood* 87: 3327-3335
207. Aderka D; Maor Y; Novick D; Engelman H; Kahn Y; Levo Y; Wallach D and Revel M (1993). Interleukin 6 inhibits the proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia cells that is induced by tumor necrosis factor-alpha or -beta. *Blood* 81: 2076-2084
208. Van Kooten C; Rensink I; Aarden L and van Oers R (1993). Effect of IL-4 and IL-6 on proliferation and differentiation of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 7: 618-624
209. Fournier S; Delespesse G; Rubio M; Biron G and Sarfati M (1992). CD23 antigen regulation and signaling in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 89: 1312-1321
210. Bofill M; Janossy G; Janossa M; Buford GD; Seymour GJ; Wernet P and Kelemen E (1985). Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *J Immunol* 34: 1531-1538
211. Antin JH; Emerson SP; Martin P; Gaddol N and Ault KA (1986). Leu-1⁺(CD5⁺) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. *J Immunol* 136: 505-510
212. Gobbi M; Caligaris-Cappio F and Janossy G (1983). Normal equivalent of B cell malignancies: analysis with monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 54: 393-403
213. Caligaris-Cappio F; Gobbi M; Bofill M and Janossy G (1982). Infrequent normal B lymphocytes express features of B chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 155: 623-628
214. Freedman AS; Boyd AW; Bieber F; Daley J; Rosen K; Horowitz JC; Levy DN and Nadler LM (1987). Normal cellular counterparts of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 70: 418-427
215. Antin JH; Ault KA; Rappeport JM and Smith BR (1987). B lymphocyte reconstitution after human bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 80: 325-332
216. Ault KA; Antin JH; Ginsburg D; Orkin SH; Rappeport JM; Keohan ML; Martin P and Smith BR (1985). Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation. *J Exp Med* 161: 1483-1502
217. Parra C; Roldan E and Brieva JA (1996). Deficient expression of adhesion molecules by human CD5⁺ B lymphocytes both after bone marrow transplantation and during normal

- ontogeny. *Blood* 88: 1733-1740
218. Plater-Zyberk C; Maini RN; Lam K; Kennedy TD and Janossy G (1985). A rheumatoid arthritis B cell subset expresses a phenotype similar to that in chronic lymphocytic leukemia. *Arthritis Rheum* 28: 971-976
219. Galton DAG and MacLennan ICM (1982). Clinical patterns of B cell malignancy. *Clin Hematol* 11: 561-587
220. Hardy RR and Hayakawa K (1986). Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog Leu-1 B. *Immunol Rev* 93: 53-79
221. Manabe A; Coustan-Smith E; Behm FG; Raimondi SC and Campana D (1992). Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79: 2370-2377
222. Nishigaki H; Ito C; Manabe A; Kumagai M; Coustan-Smith E; Yanishevski Y; Behm FG; Raimondi SC; Pui CH and Campana D (1997). Prevalence and growth characteristics of malignant stem cells in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89: 3735-3744
223. Campana D; Coustan-Smith E; Manabe A; Kumagai M; Murti KG; Silvennoinen O; Nishigaki H; Kitanaka A and Ito C (1996). Human B-cell progenitors and bone marrow microenvironment. *Hum Cell* 9: 317-322
224. Ito C; Evans WE; McNinch L; Coustan-Smith E; Mahmoud H; Pui CH and Campana D (1996). Comparative cytotoxicity of dexametasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 14: 2370-2376
225. Kumagai M; Manabe A; Pui CH; Behm FG; Raimondi SC; Hancock ML; Mahmoud H; Crist WM and Campana D (1996). Stroma-supported culture in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells predicts treatment outcome. *J Clin Invest* 97: 755-760
226. Karawajew L; Wuchter C; Ruppert V; Drexler H; Gruss HJ; Dorken B and Ludwig WD (1997). Differential CD95 expression and function in T and B lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 11: 1245-1252
227. Coustan-Smith E; Kitanaka A; Pui CH; McNinch L; Evans WE; Raimondi SC; Behm FG; Arico M and Campana D (1996). Clinical relevance of Bcl-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 87: 1140-1146
228. Spina D; Leoncini L; Megha T; Del Vecchio MT; Minacci C; Poggi S; Pileri S; Tosi

- P; Kraft R; Laissue JA and Cottier H (1996). Stage-related differences of mitotic and apoptotic indices, and bcl-2 protein expression in diffusely growing non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer* 68: 436-440
229. Hill ME; MacLennan KA; Cunningham DC; Vaughan-Hudson B; burke M; Clarke P; Di Stefano F; Anderson L; Vaughan-Hudson G; Mason D; Selby P and Linch DC (1996). Prognostic significance of Bcl-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 88: 1046-1051
230. Collins RJ; Verschuer LA; Harmon BV; Prentice RL; Pope JH and Kerr JF (1989). Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* 71: 343-350
231. Andreeff M; Darzynkiewicz Z; Sharpless TK; Clarkson BD and Melamed MR (1980). Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA. *Blood* 55: 282-293
232. Gale RP; Caligaris-Cappio F; Dighiero G; Keating M; Montserrat E and Rai K (1994). Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. International Workshop on chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 8: 1610-1614
233. Caligaris-Cappio F; Gottardi D; Alfarano A; Stacchini A; Gregoret MG; Ghia P; Bertero M; Novarino A and Bergui L (1967). Chronic lymphocytic leukemia - an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 29: 566-584
234. Holder MJ; Wang H; Milner AE; Casamayor M; Armitage R; Spriggs MK; Fanslow WC; MacLennan IC; Gregory CD; Gordon J et al (1993). Supression of apoptosis in normal and neoplastic B lymphocytes by CD40 ligand is independent of Bcl-2 induction. *Eur J Immunol* 23: 2368-2371
235. Panayiotidis P; Ganeshaguru K; Jabbar AB and Hoffbrand AV (1993). Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* 85: 439-445
236. Tangye SG and Raison RL (1996). Leukaemic CD5⁺ B apoptosis: co-incidence of cell death and DNA fragmentation with reduced bcl-2 expression. *Br J Haematol* 92: 950-953
237. Begleiter A; Wang H; Verburg L; Lee K; Israels LG; Mowat MR and Johnston JB

- (1996). In vitro cytotoxicity of 2-chlorodeoxy-adenosine and chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 10: 1959-1965
238. Robertson LE; Chubb S; Meyn RE; Story M; Ford R and Hittelman WN (1993). Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9- β -D-Arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood* 81: 143-150
239. Zinzani PL; Buzzi M; Farabegoli P; Tosi P; Fortuna A; Visani G; Martinelli G; Zaccaria A and Tura S (1994). Induction "in vitro" apoptosis by fludarabine in freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 13: 95-97
240. Tosi P; Zinzani PL; Pellacani A; Ottaviani E; Magagnoli M and Tura S (1997). Loxoribine affects fludarabine activity on freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 26: 343-348
241. Mainou-Fowler T; Crocij VA; Copplestone JA; Hamon MD and Prentice AG (1994). Interleukin-5 (IL-5) increases spontaneous apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro independently of bcl-2 expression and is inhibited by IL-4. *Blood* 84: 2297-2304
242. Fluckiger AC; Durand I and Banchereau J (1994). Interleukin 10 induces apoptosis cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *J Exp Med* 179: 91-99
243. Gordon J; Mellstedt H; Aman P; Biberfeld P; Björkman M and Klein G (1983). Phenotypes in chronic B-lymphocytic leukemia probed by monoclonal antibodies and immunoglobulin secretion studies: identification of stages of maturation arrest relation to clinical findings. *Blood* 62: 910-917
244. Mainou-Fowler T; Copplestone JA and Prentice AG (1995). Effect of interleukins on the proliferation and survival of B cell chronic lymphocytic leukaemia cells. *J Clin Pathol* 48: 482-487
245. Jurlander J; Lai CF; Tan J; Chou CC; Geisler CH; Schriber J; Blumenson LE; Narula SK; Baumann H and Caligiuri MA (1997). Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 89: 4146-4156
246. Forbes IJ; Zalewski PD; Giannakis D and Cowled PA (1992). Induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells and its prevention by phorbol ester. *Exp Cell Res* 198: 367-372

247. Panayiotidis P; Ganeshaguru K; Jabbar S and Hoffbrand A (1994). Alpha-interferon (α -IFN) protects B-chronic lymphocytic leukaemia cells from apoptotic cell death in vitro. *Br J Haematol* 86: 169-173
248. Heslep HE; Bianchi AC; Cordingley FT; Turner M; Chandima W; Dewel CP; Hoffbrand AV and Brenner MK (1990). Effects of interferon alpha on autocrine growth factor loops in B lymphoproliferative disorders. *J Exp Med* 172: 1729-1734
249. Jewell AP; Worman CP; Lydyard PM; Yong KL; Giles FJ and Golodstone AH (1994). Interferon-alpha up-regulates bcl-2 cells from apoptosis in vitro and in vivo. *Br J Haematol* 88: 268-274
250. Chaouchi N; Wallon C; Taieb J; Aufredou MT; Tertian G; Lemoine FM; Delfraissy JF and Vazquez A (1994). Interferon-alpha-mediated prevention of in vitro apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B cells: role of Bcl-2 and c-myc. *Clin Immunol Immunopath* 73: 197-204
251. Buschle M; Campana D; Carding SR; Richard C; Hoffbrand AV and Brenner MK (1993). Interferon γ inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 177: 213-218
252. Dancescu M; Rubio-Trujillo M; Biron G; Bron D; Delespesse G and Sarfati M (1992). Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med* 176: 1319-1326
253. Reittie JE; Yong KL; Panayiotidis P and Hoffbrand V (1996). Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumour necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 22: 83-90
254. Di Celle PF; Mariani S; Riera L; Stacchini A; Reato G and Foa R (1996). Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. *Blood* 87: 4382-4389
255. Chaouchi N; Wallon C; Goujard C; Tertian G; Rudent A; Caput D; Ferrera P; Minty A; Vazquez A and Delfraissy JF (1996). Interleukin-13 inhibits interleukin-1-induced proliferation and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from in vitro apoptosis. *Blood* 87: 1022-1029
256. Mire-Sluis AR and Thorpe R (1991). Interleukin-4 proliferative signal transduction

- involves the activation of a tyrosine-specific phosphatase and the dephosphorylation of an 80-kDa protein. *J Biol Chem* 266: 18113-18118
257. Biondi A; Rossi V; Bassan R; Barbui T; Bettoni S; Sironi M; Mantouani a and Rambaldi A (1989). Constitutive expression of the interleukin-6 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 73: 1279-1284
 258. Di Celle PF; Carbone A; Marchis D; Zhou D; Sozzani S; Zupo S; Pini M; Mantovani A and Foa R (1994). Cytokine gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of constitutive interleukin-8 (IL-8) mRNA expression and secretion of biological active IL-8 protein. *Blood* 84: 220-228
 259. Panayiotidis P; Jones D; Ganeshaguru K; Foroni L and Hoffbrand V (1996). Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Br J Haematol* 92: 97-103
 260. Long BW; Witte PL; Abraham GN; Gregory SA and Plate JR (1995). Apoptosis and interleukin 7 gene expression in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1416-1420
 261. Reed JC (1994). Bcl-2 and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6
 262. Hanada M; Delia D; Antonella A; Stadtmauer E and Reed JC (1993). Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82: 1820-1828
 263. Schena M; Gottardi D; Ghia P; Larsson LG; Carlsson M; Nilsson K and Caligaris-Cappio F (1993). Role of bcl-2 in the pathogenesis of B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 11: 173-179
 264. Mapara MY; Bargou R; Zugk C; Döhnor H; Ustaoglu F; Jonker RR; Krammer PH and Dörken B (1993). APO-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with bcl-2 oncogene expression. *Eur J Immunol* 23: 702-708
 265. Molica S; Mannella A; Dattilo A; Levato D; Iuliano F; Peta A; Consarino C and Magro S (1996). Differential expression of BCL-2 oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemic bone marrow cells. A flow cytometric analysis. *Hematologica* 81: 302-309

266. Adachi M; Tefferi A; Greipp PR; Kipps TJ and Tsujimoto Y (1990). Preferential linkage of BCL-2 to immunoglobulin light chain gen in chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 171: 559-564
267. Mariano MT; Moretti L; Donelli A; Grantini M; Montagnani G; Di Prisco AU; Torelli G; Torelli U and Narni F (1992). Bcl-2 gene expression in hematopoietic cell differentiation. *Blood* 80: 768-775
268. Robertson LE; Plunkett W; McConnell K; Keating MJ and McDonnell TJ (1996). Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* 10: 456-459
269. Gottardi D; Alfarano A; De Leo AM; Stacchini A; Aragno M; Rigo A; Veneri D and Zanotti R (1996). In leukaemic CD5⁺ B cells the expression of Bcl-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis. *Br J Haematol* 94: 612-618
270. Gottardi D; Alfarano A; De Leo AM; Stacchini A; Bergui L and Caligaris-Cappio F (1994). Defective apoptosis due to Bcl-2 overexpression may explain why B-CLL cells accumulate in G0. *Curr Top Microbiol Immunol* 194: 307-312
271. McConkey DJ; Chandra J; Wright S; Plunkett W; McDonnell TJ; Reed JC and Keating M (1996). Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of Bcl-2 and Bax. *J Immunol* 156: 2624-2630
272. Bellosillo B; Delman M; Colomer D and Gil J (1997). Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 89: 3378-3384
273. Caverder DE; Cearns J; Barrus CQ and Dunaway-Piccioni D (1991). T-cell adhesion to extracellular matrix molecules secreted by endothelial cells cultured on a substrate of type IV collagen. *J Immunol Methods* 144: 185-196
274. Vermes I; Haanen C; Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51
275. Hess KL; Babcock GF; Askew DS and Cook-Mills JM (1997). A novel flow cytometric method for quantifying phagocytosis of apoptotic cells. *Cytometry* 27: 145-152.
276. Takahasi K and Sawasaki Y (1992). Rare spontaneously transformed human endothelial

- cell line provides useful research tool. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A: 380-382
277. Swat W; Ignatowicz L and Kisielow P (1991). Detection of apoptosis of mature CD4⁺CD8⁺ thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* 137: 79-87
 278. Gorzca W; Gong J and Darzynkiewicz Z (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53: 1945-1951
 279. Nicoletti I; Migliorati G; Pagliacci MC; Grignani F and Riccardi C (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-279
 280. Martin SJ; Reutelingsperger CPM; McGahon AJ; Rader JA; Van Schie RCAA; LaFace DM and Green DR (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182: 1545-1556
 281. Lecoœur H; Ledru E; Prévost MC; and Gougeon ML (1997). Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods* 209: 111-123
 282. Vermes I; Haanen C; Richel DJ; Schaafsma MR; Kalsbeek-Batenburg E and Reutelingsperger CPM (1997). Apoptosis and secondary necrosis of lymphocytes in culture. *Acta Haematol* 98: 8-13
 283. Koopman G; Rutelingsperger CPM; Kijten GAM; Keehen RMJ; Pals ST and Van Oers MHJ (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420
 284. Jewell AP and Yong KL (1997). Regulation and function of adhesion molecules in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Acta Haematol* 97: 67-72
 285. Hardin JA; Yamaguchi K and Sherr DH (1995). The role of peritoneal stromal cells in the survival of sIgM⁺ peritoneal B lymphocyte populations. *Cell Immunol* 161: 50-60
 286. Vincent AM; Cawley JC and Burthem (1996). Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 87: 4780-4788
 287. De Rossi G; Zarcone D; Mauro F; Cerruti G; Tenca C; Puccetti A; Mandelli F and Grossi CE (1993). Adhesion molecule expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia

- cells: Malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. *Blood* 81: 2679-2687
288. Baldini L; Cro L; Calori R; Nobili L; Silvestris I and Maiolo AT (1992). Differential expression antigen-3 (VLA-3)/VLA-4 in B-cell non-Hodgkin lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 79: 2688-2693
289. Braylan RC; Benson NA; Nourse V and Kruth HS (1982). Correlated analysis of cellular DNA, membrane antigens and light scatter of human lymphoid cells. *Cytometry* 2: 337-343
290. Hallden G; Andersson U; Hed J and Johansson SG (1989). A new membrane permeabilization method for the detection of intracellular antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods* 124: 103-109
291. Roberts RA; Spooncer E; Parkinson EK; Lord BI; Allen TD and Dexter TM (1987). Metabolically inactive 3T3 cells can substitute for marrow stromal cells to promote the proliferation and development of multipotent haemopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 132: 203-214
292. Shi Y; Wang R; Sharma A; Gao C; Collins M; Penn L and Mills GB (1997). Dissociation of cytokine signals for proliferation and apoptosis. *J Immunol* 159: 5318-5328
293. Freeman GJ; Freedman AS; Rabinowe SN; Segil JM; Horowitz J; Rosen K; Whitman JF and Nadler LM (1989). Interleukin 6 gene expression in normal and neoplastic B cells. *J Clin Invest* 83: 1512-1518
294. Lahat N; Aghai E; Maroun B; Kinarty A; Quitt M and Froom P (1991). Increased spontaneous secretion of IL-6 from B cells of patients with chronic lymphatic leukaemia (B-CLL) and autoimmunity. *Clin Exp Immunol* 85: 302-306
295. Hulkkonen J; Vilpo J; Vilpo L and Hurme M (1998). Diminished production of interleukin-6 in chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells from patients at advanced stages of disease. *Br J Haematol* 100: 478-483
296. Baggiolini M; Dewald B and Moser B (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55: 97-179
297. Akira S; Taga T and Kishimoto T (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54: 1-78
298. May LT; Santhanam U and Sehgal PB (1991). On the multimeric nature of natural

- human interleukin-6. *J Biol Chem* 266: 9950-9955
299. Wijdenes J; Clement C; Klein B; Morel-Fourrier B; Vita N; Ferrara P and Peters A (1991). Human recombinant dimeric IL-6 binds to its receptor as detected by anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 28: 1183-1192
 300. Ward LD; Howlett GJ; Discolo G; Yasukawa K; Hammacher A; Moritz RL and Simpson RJ (1994). High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp 130. *J Biol Chem* 269: 23286-23289
 301. Ward LD; Hammacher A; Hawlett GJ; Matthews JM; Fabri L; Moritz RL; Nice EC; Weinstock J and Simpson RJ (1996). Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6-Receptor complex. *J Biol Chem* 271: 20138-20144
 302. Milburn MV; Hassell AM; Lambert MH; Jordan SR; Proudfoot AEI; Graber P and Wells TNC (1993). A novel dimer configuration revealed by crystal structure at 2.4Å resolution of human interleukin-5. *Nature* 363: 172-176
 303. Tan JC; Indelicato SR; Narula SK; Zavodny JP and Chou C (1993). Characterization of interleukin-10 receptors on human and mouse cells. *J Biol Chem* 268: 21053-21059
 304. Karpusas M; Nolte M; Benton CB; Meier W; Lipscomb WN and Goetz S (1997). The crystal structure of human interferon β at 2.2-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11813-11818
 305. Favre C; Wijdenes J; Cabrillat H; Djossou O; Banchereau J and Vries JE (1989). Epitope mapping of recombinant human gamma interferon using monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 26: 17-25
 306. Clore GM; Aprela E; Yamada M; Matsushima K and Gronenborn AM (1989). Determination of the secondary structure of interleukin-8 by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 264: 18907-18911
 307. Chung C; Cooke RM; Proudfoot AEI and Wells TNC (1995). The three-dimensional solution structure of RANTES. *Biochemistry* 34: 9307-9314
 308. Mischke R; Kleemann R; Brunner H and Bernhagen J (1998). Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration

- inhibitory factor (MIF). *FEBS Lett* 427: 85-90
309. Wingfield P; Pain RH and Craig S (1987). Tumour factor is a compact trimer. *FEBS Lett* 211: 179-184
310. Dickason RR and Huston DP (1996). Creation of a functional interleukin-5 monomer. *Nature* 379: 652-655
311. Williams G; Borkakoti N; Bottomley GA; Cowan I; Fallowfield AG; Jones PS; Kirtland SJ and Price L (1996). Mutagenesis studies of interleukin-8. *J Biol Chem* 271: 9579-9586
312. Smith RA and Baglioni C (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 262: 6951-6954
313. Schiel X; Rose-John S; Dufhues G; Schooltink H; Gross V and Heinrich PC (1990). Microheterogeneity of human interleukin 6 synthesized by transfected NIH/3T3 cells: comparison with human monocytes, fibroblasts and endothelial cells. *Eur J Immunol* 20: 883-887
314. Van Damme J; Opdenakker G; Simpson J; Rubira MR; Cayphas S; Vinik A; Billiau A and Van Snick (1987). Identification of the human 26-kD protein, interferon β_2 (IFN- β_2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 165: 914-919
315. Santhanam U; Ghrayeb J; Sehgal PB and May LT (1989). Post-translational modifications of human interleukin-6. *Arch Biochem Biophys* 274: 161-170
316. Jirik FR; Podor TJ; Hirano T; Kishimoto T; Loskutoff DJ; Carson DA and Lotz M (1989). Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol* 142: 144-147
317. Howells G; Pham P; Taylor D; Foxwell B and Feldmann M (1991). Interleukin 4 induces interleukin-6 production by endothelial cells synergy with interferon- γ . *Eur J Immunol* 21: 97-101.
318. May LT; Torcia G; Lozzolino F; Ray A; Tatter SB; Santhanam U; Sehgal PB and Stern D (1989). Interleukin-6 gene expression in human endothelial cells: RNA start sites multiple IL-6 proteins and inhibition of proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 991-998
319. Jablons DM; Mulé JJ; McIntosh JK; Sehgal PB; May LT; Huang CM; Rosenberg SA

- and Lotze MT (1989). IL-6/IFN- β -2 as a circulating hormone. Induction by cytokine administration in humans. *J Immunol* 142: 1542-1547
320. Fong Y; Moldawer LL; Marano M; Wei H; Tatter SB; Clarick RH; Santhanam U; Sherris D; May LT; Sehgal PB and Lowry SF (1989). Endotoxemia elicits increased circulating β_2 -IFN/IL-6 in man. *J Immunol* 142: 2321-2324
321. Helfgott DC; Tatter SB; Santhanam U; Clarick RH; Bhardwaj N; May LT and Sehgal PB (1989). Multiple forms of IFN- β_2 /IL-6 in serum and body fluids during acute bacterial infection. *J Immunol* 142: 948-953
322. Bhardwaj N; Santhanam U; Lau L; Tatter SB; Ghayeb J; Rivelis M; Steinman RM; Sehgal PB and May LT (1989). IL-6/IFN- β_2 in sinovial effusions of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *J Immunol* 143: 2153-2159
323. Romero R; Avila C; Santhanam U and Sehgal PB (1990). Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection. *J Clin Invest* 85: 1392-1400
324. Foa R; Massaia M; Cardona S; Tos AG; Bianchi A; Attisano C; Guarini A; di Celle PA and Fierro MT (1990). Production of tumor necrosis factor-alpha by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF in the progression of the disease. *Blood* 76: 393-400
325. Lavabre-Bertrand T; Exbrayat C; Liautard J; Gaillard JP; Baskevitch PP; Poujol N; Duperray C; Bourquard P and Brochier J (1995). Detection of membrane and soluble interleukin-6 receptor in lymphoid malignances. *Br J Haematol* 91: 871-877
326. Taga T; Kawanishi K; Hardy RR; Hirano T and Kishimoto T (1987). Receptors for B cell stimulatory factor 2 (BSF-2): quantitation, specificity, distribution and regulation of the expression. *J Exp Med* 166: 967-981
327. Zola H and Flego L (1992). Expression of interleukin-6 receptor on blood lymphocytes without in vitro activation. *Immunology* 76: 338-340
328. Burdin N; Galibert L; Garrone P; Durand I; Banchereau J and Rousset F (1996). Inability to produce IL-6 is a functional feature of human germinal center B lymphocytes. *J Immunol* 156: 4107-4113
329. Taga T; Hibi M; Hirata Y; Yamasaki K; Yasukawa K; Matsuda T; Hirano T and Kishimoto T (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible

- signal transducer, gp130. *Cell* 58: 573-581
330. Murakami M; Hibi M; Nakagawa N; Nakagawa T; Yasukawa K; Yamanishi K; Taga T and Kishimoto T (1993). IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of tyrosine kinase. *Science* 260: 1808-1810
 331. Paonessa G; Graziani R; De Serio A; Savino R; Ciapponi L; Lahm A; Salvati AL; Toniatti C and Ciliberto G (1995). Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp130 dimer formation and signaling. *EMBO J* 14: 1942-1951
 332. Ward LD; Howlett GJ; Hammacher A; Weinstock J; Yasukawa K; Simpson RJ and Winzor DJ (1995). Use of biosensor with surface plasmon resonance detection for the determination of binding constants: measurement of interleukin-6 binding to the soluble interleukin-6 receptor. *Biochemistry* 34: 2901-2907
 333. Somers W; Stahl M and Seehra JS (1997). 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J* 16: 989-997
 334. Matthews JM; Hammacher A; Howlett GJ and Simpson RJ (1998). Physicochemical characterization of an antagonistic human interleukin-6 dimer. *Biochemistry* 37: 10671-10680
 335. Arakawa T; Yphantis DA; Lary JW; Narhi LO; Lu HS; Prestrelski SJ; Clogston CL; Zsebo KM; Mendiaz EA; Wypych J et al (1991). Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure. *J Biol Chem* 266: 18942-18948
 336. Kishimoto T (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* 74: 1-10
 337. May LT; Santhanam U; Tatter SB; Bhardwaj N; Ghrayeb J and Sehgal PB (1988). Phosphorylation of secreted forms of human β_2 -interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6. *Biochem Biophys Res Commun* 152: 1144-1150
 338. Zilberstein A; Ruggieri R; Korn JN and Revel M (1986). Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J* 5: 2529-2537
 339. May LT; Ghrayeb J; Santhanam U; Tatter SB; Stoeger Z; Helfgott DC; Chiorazzi N; Grieninger G; and Sehgal PB (1988). Synthesis and secretion of multiple forms of β_2 -Interferon/B-cell differentiation factor 2/Hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts

- and monocytes. *J Biol Chem* 263: 7760-7766
340. Hirano T; Yasukawa K; Harada H; Taga T; Watanabe Y; Matsuda T; Kashiwamura S; Nakajima K; Koyama K; Iwamatsu A et al. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324: 73-76
 341. Terui Y; Ikeda M; Tomizuka H; Kasahara T; Ohtsuki T; Uwai T; Mori M; Itoh T; Tanaka M; Yamada M et al. (1998). Identification of a novel apoptosis-inducing factor derived from leukemic cells: endothelial interleukin-8; but not monocyte-derived, induces apoptosis in leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 407-411
 342. Graffney EV and Tsai SC (1986). Lymphocyte-activating and growth-inhibitory activities for several sources of native and recombinant interleukin-1. *Cancer Res* 46: 3834-3837
 343. Berger LC; Hawley TS; Lust JA; Goldman SJ and Hawley RG (1994). Tyrosine phosphorylation of JAK-TYK kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 596-605
 344. Ogata A; Chauhan D; Teoh G; Treon SP; Urashima M; Schlossman RL and Anderson KC (1997). IL-6 triggers cell growth via Ras-Dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 159: 2212-2221
 345. Minami M; Inoue M; Wei S; Takeda K; Matsumoto M; Kishimoto T and Akira S (1996). STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3963-3966
 346. Graves JD; Craves KE; Craxton A; Saklatvala J; Krebs EG and Clark EA (1996). Involvement of stress activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in mIgM-induced apoptosis of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13814-13818
 347. Wilson DJ; Fortner KA; Lynch DH; Mattingly RR; Macara IG; Posada JA and Budd RC (1996). JNK, but not MAPK, activation is associated with fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol* 26: 989-994
 348. Xia Z; Dickens M; Raingeaud J; Davis RJ and Greenberg ME (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331

349. Marshall CJ (1995). Specificity of receptor tyrosin kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179-185
350. Anderson K; Jones RM; Morimoto C; Leavitt P and Barut BA (1989). Response patterns of purified myeloma cells to hematopoietic growth factors. *Blood* 73: 1915-1924
351. Barut BA; Zon LI; Cochran MK; Paul SR; Chauhan D; Mohrbacher A; Figeroth J and Anderson K (1992). Role of interleukin 6 in the growth of myeloma-derived cell lines. *Leukemia Res* 16: 951-959
352. Pepper C; Bentley P and Hoy T (1996). Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 95: 513-517
353. Osorio LM; De Santiago A; Aguilar-Santelises M; Mellstedt H and Jondal M (1997). CD6 ligation modulates the Bcl-2/Bax ratio and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis induces by anti-IgM. *Blood* 89: 2833-2841
354. Byrd JC; Shinn C; Waselenko JK; Fuch EJ; Lehman TA; Ngugen PL; Flinn IW; Diehl LF; Sausville E and Greuer MR (1998). Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53. *Blood* 92: 3804-3816
355. Aguilar-Santelises M; Rottenberg M; Lewin N; Mellstedt H and Jondal M (1996). Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to "in vitro" survival and clinical progression. *Int J Cancer* 69: 114-119
356. Lømo J; Smeland ER; Krajewski S; Reed JC and Blomhof HK (1996). Expression of the Bcl-2 homologue Mcl-1 correlates with survival of peripheral blood B lymphocytes. *Cancer Res* 56: 40-43.