

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Leucemia linfoblástica aguda: infiltración en el sistema  
nervioso central y papel de BMP4**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Lidia Martínez Fernández de Sevilla**

**Directores**

**Ángeles Vicente López  
Manuel Ramírez Orellana  
Alberto Varas Fajardo**

**Madrid**

**© Lidia Martínez Fernández de Sevilla, 2019**

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



TESIS DOCTORAL

## LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA: INFILTRACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PAPEL DE BMP4

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Lidia Martínez Fernández de Sevilla**

Directores

**Ángeles Vicente López**

**Manuel Ramírez Orellana**

**Alberto Varas Fajardo**

Madrid, 2019





UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Lidia Martínez Fernández de Sevilla,  
estudiante en el Programa de Doctorado de Investigación Biomédica,  
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

**Leucemia Linfoblástica Aguda: Infiltración en el Sistema Nervioso Central  
y papel de BMP4**

y dirigida por: Maria Ángeles Vicente López, Manuel Ramírez Orellana y Alberto Varas  
Fajardo.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 19 de julio de 2019.

**Lidia  
Martínez**

Fdo.: \_\_\_\_\_

Firmado digitalmente por Lidia  
Martínez  
Nombre de reconocimiento  
(DN): cn=Lidia Martínez,  
o=UCM, ou,  
email=lidia.martinez@ucm.es,  
c=ES  
Fecha: 2019.07.19 18:52:02  
+02'00'



El presente trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos *“Papel de BMP4 en Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil: factor pronóstico y función en la recaída”* (I Beca Fundación Uno entre Cien Mil), *“Evaluación de BMP4 como biomarcador en el pronóstico de la leucemia linfoblástica aguda infantil. Relevancia de su vía de señalización en la recaída en el SNC”* (SAF2015-66986-R) y *“¿Cómo las células leucémicas penetran, sobreviven y crecen en el SNC? Santuarios para células leucémicas en el SNC: el nicho neurogénico”* (RTI2018-093899-B-I00) y bajo el programa de financiación de Universidad Complutense de Madrid-Banco Santander para ayudas a contratos predoctorales de personal investigador en formación (2015-CT45/15).



## ABREVIATURAS

<b>7AAD</b>	7-amino-actinomycin D
<b>ABL</b>	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene</i>
<b>ActRI</b>	Receptor tipo I de activina, del inglés <i>Activin receptor type I</i>
<b>ActRII</b>	Receptor tipo II de activina, del inglés <i>Activin receptor type II</i>
<b>ADAM10</b>	Proteína con dominios desintegrina y metaloproteínasa 10
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario total
<b>AEP</b>	Asparagina endopeptidasa
<b>AGM</b>	Región aorta-gónadas-mesonefros
<b>Akt</b>	Proteína serín-treonín quinada RAC- $\alpha$
<b>ALK</b>	Receptor tipo I de Activina, del inglés <i>Activin receptor-like kinase</i>
<b>Ara-C</b>	Citarabina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>aSMA</b>	Alfa actina de músculo liso
<b>BAMBI</b>	Inhibidor BMP y activina unido a membrana, del inglés <i>BMP and activin membrane-bound inhibitor</i>
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>BMP</b>	Proteína morfogenética ósea, del inglés <i>bone morphogenetic protein</i>
<b>BMPRI</b>	Receptor tipo I de BMP, del inglés <i>BMP receptor type I</i>
<b>BMPRII</b>	Receptor tipo II de BMP, del inglés <i>BMP receptor type II</i>
<b>BO</b>	Bulbo olfatorio
<b>BR-Smad</b>	Smad regulada por receptor específica de BMP, del inglés <i>BMP-specific receptor-regulated Smad</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>BSLCR</b>	Barrera sangre- líquido cefalorraquídeo
<b>CAFs</b>	Fibroblastos asociados a tumor, del inglés <i>cancer-associated fibroblasts</i>
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array</i>
<b>CCL</b>	Quimioquina CC, del inglés <i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
<b>CCR</b>	Receptor de quimioquina CC, del inglés <i>chemokine (C-C motif) receptor</i>
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclina, del inglés <i>cyclin-dependent kinase</i>
<b>CDMP</b>	Proteínas morfogenéticas derivadas del cartílago, del inglés <i>cartilage-derived morphogenetic proteins</i>
<b>CFSE</b>	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
<b>CLDN</b>	Claudina
<b>COL1A1</b>	Colágeno tipo 1 alfa 1
<b>Co-SMAD</b>	Smad común, del inglés <i>common mediator Smad</i>
<b>CREBBP</b>	Proteína de unión a CREB, del inglés <i>CREB binding protein</i>
<b>CSFR1</b>	Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos, del inglés <i>macrophage colony-stimulating factor 1 receptor</i>
<b>CXCL</b>	Quimioquina CXC, del inglés <i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
<b>CXCR</b>	Receptor de quimioquinas CXC, del inglés <i>chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
<b>DMH1</b>	Homólogo 1 de dorsomorfinina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EBF1</b>	Factor de transcripción EBF, del inglés <i>Early B Cell Factor 1</i>

## Abreviaturas

---

<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico, del inglés <i>epidermal growth factor</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>EMR</b>	Enfermedad mínima residual
<b>ERG</b>	Factor de transcripción ERG
<b>ERK</b>	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
<b>ETV6</b>	<i>Ets Variant Gene 6</i>
<b>EZH2</b>	Histona lisina metiltransferasa, del inglés <i>Enhancer Of Zeste Homolog 2</i>
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento transformante, del inglés <i>fibroblast growth factor</i>
<b>FLT3</b>	Proteína tirosina quinasa 3 similar a FMS, del inglés <i>fms-like tyrosine kinase 3</i>
<b>FN</b>	Fibronectina
<b>GDF</b>	Factor de crecimiento y diferenciación, del inglés <i>growth/differentiation factor</i>
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida, del inglés <i>glial fibrillary acidic protein</i>
<b>GNB2L1</b>	Proteína G de unión al nucleótido guanidina, polipéptido beta tipo 2, del inglés <i>guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like-1</i>
<b>HCPEC</b>	Células endoteliales humanas del plexo coroideo, del inglés <i>human choroid plexus endothelial cells</i>
<b>HCPEpiC</b>	Células epiteliales humanas del plexo coroideo, del inglés <i>human choroid plexus epithelial cells</i>
<b>HCPFb</b>	Fibroblastos humanos del plexo coroideo, del inglés <i>human choroid plexus fibroblasts</i>
<b>hMECs</b>	Células endoteliales humanas de la microvasculatura cerebral, del inglés <i>human microendothelial cells</i>
<b>HSPG2</b>	Heparan sulfato proteoglicano 2, del inglés <i>heparan sulfate proteoglycan 2</i>
<b>ICAM1</b>	Moléculas de adhesión intercelular 1, del inglés <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
<b>ID</b>	Inhibidor de unión a ADN / de diferenciación
<b>IKZF1</b>	proteína de unión a ADN Ikaros, del inglés <i>Ikaros family zinc finger 1</i>
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>IRM</b>	Imagen de resonancia magnética
<b>I-Smad</b>	Smad inhibidora, del inglés <i>inhibitory Smad</i>
<b>JAG</b>	Proteína Jagged 1
<b>JNK</b>	Quinasas c-Jun n-terminal, del inglés <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>LAMC</b>	Laminina, subunidad 1
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>LFA1</b>	Integrina antígeno de función linfocitaria-1, del inglés <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<b>LLA</b>	Leucemia linfoblástica aguda
<b>LLA-B</b>	Leucemia linfoblástica aguda tipo B
<b>LLA-T</b>	Leucemia linfoblástica aguda tipo T
<b>LLC</b>	Leucemia linfocítica crónica
<b>LLC-B</b>	Leucemia linfocítica crónica tipo B
<b>LMA</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>LMC</b>	Leucemia mieloide crónica
<b>MAP2</b>	Proteína asociada a microtúbulos 2, del inglés <i>microtubule-associated protein 2</i>
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógeno, del inglés <i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>miRNA</b>	micro ARN
<b>MLL</b>	Leucemia de linaje mixto, del inglés <i>Mixed Lineage Leukemia</i>
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de la matriz extracelular, del inglés <i>matrix metalloproteinases</i>

<b>MSCs</b>	Células mesenquimales, del inglés <i>mesenchymal stem cells</i>
<b>MTX</b>	Metotrexato
<b>MyoIIA</b>	Miosina tipo IIA
<b>NCAM</b>	Molécula de adhesión neuronal, del inglés <i>neural cell adhesion molecule 1</i>
<b>NF-κβ</b>	Factor nuclear kappa B, del inglés <i>nuclear factor NF-kappa-B</i>
<b>NG2</b>	Antígeno neural/ glial, del inglés <i>neural/glial antigen 2</i>
<b>NSCs</b>	Células madre neurales, del inglés <i>neural stem cells</i>
<b>NSG</b>	NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> IL2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ
<b>NT5C2</b>	5'-Nucleotidasa citosólica 2
<b>NTRK3</b>	Receptor tirosín quinasa de neurotrofinas tipo 3, del inglés <i>neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3</i>
<b>PAX5</b>	Paired Box 5
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate buffered saline</i>
<b>PBX1</b>	<i>Pre-B-cell leukemia transcription factor 1</i>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain</i>
<b>PDGFRB</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas beta, del inglés <i>platelet-derived growth factor receptor beta</i>
<b>PDNP</b>	Podoplanina
<b>PECAM-1</b>	Molécula de adhesión células endoteliales/plaquetas-1, del inglés <i>platelet and endothelial cell adhesion molecule 1</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PI3K</b>	Fosfoinositida-3-quinasa, del inglés <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>PRKDC</b>	Subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN, del inglés <i>protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit</i>
<b>PRPS1</b>	Fosforibosilpirofosfato sintetasa 1, del inglés <i>phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1</i>
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real
<b>RA</b>	Riesgo alto
<b>RAG2</b>	Gen activador de la recombinación 2, del inglés <i>recombination activating gene 2</i>
<b>RE</b>	Riesgo estándar
<b>RETI-SEHOP</b>	Registro Español de Tumores Infantiles – Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica.
<b>RGM</b>	<i>Repulsive Guidance Protein</i>
<b>RI</b>	Riesgo intermedio
<b>Ror2</b>	Receptor de la tirosín quinasa, del inglés <i>receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2</i>
<b>RUNX</b>	Factor de transcripción, del inglés <i>runt-related transcription factor</i>
<b>SBF</b>	Suero Bovino Fetal
<b>SCD</b>	Estearoil-CoA desaturasa
<b>SCID</b>	Inmunodeficiencia severa combinada, del inglés <i>severe combined immunodeficiency</i>
<b>SEHOP-PETHEMA</b>	Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica- Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatía Maligna
<b>SGZ</b>	Zona subgranular
<b>SLE</b>	Supervivencia libre de enfermedad
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SPP1</b>	Osteopontina, del inglés <i>Secreted Phosphoprotein 1</i>
<b>STAT</b>	Factor de transcripción, del inglés <i>signal transducer and activator of transcription</i>
<b>SVZ</b>	Zona Subventricular
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante beta, del inglés <i>transforming growth factor beta</i>
<b>TIT</b>	Terapia intratecal

## Abreviaturas

---

<b>TNC</b>	Tenascina C
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	TNF $\alpha$ Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés <i>tumor necrosis factor alfa</i>
<b>TrkC</b>	<i>Tyrosine Kinase Receptor C</i>
<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión vascular, del inglés <i>vascular cell adhesion protein 1</i>
<b>VE- Cadherina</b>	<i>Vascular endothelial cadherin</i>
<b>VEGFA</b>	<i>Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés vascular endothelial growth factor alpha</i>
<b>VLA-4</b>	<i>Integrin <math>\alpha 4\beta 1</math></i>
<b>VLA-6</b>	<i>Integrin <math>\alpha 6\beta 1</math></i>
<b>ZAP70</b>	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

# ÍNDICE



---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
INTRODUCCIÓN .....	3
OBJETIVOS .....	5
MATERIAL Y MÉTODOS .....	5
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	6
CONCLUSIONES .....	9
BIBLIOGRAFÍA .....	10
<b>SUMMARY</b> .....	<b>13</b>
INTRODUCTION .....	15
OBJECTIVES .....	17
RESULTS AND DISCUSSION .....	17
MATERIAL AND METHODS .....	19
CONCLUSIONS .....	20
REFERENCES .....	22
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>25</b>
1. Leucemia linfoblástica aguda. Diagnóstico y tratamiento .....	27
2. Recaída en la enfermedad. El Sistema Nervioso Central .....	29
3. Histopatología de la LLA en el SNC .....	31
4. Tráfico de las células leucémicas al SNC y mecanismos moleculares .....	32
5. El microambiente del SNC en la supervivencia de la LLA .....	37
6. Proteínas Morfogenéticas Óseas .....	38
6.1 Componentes de la vía de señalización y su regulación .....	39
6.2 Papel de los ligandos BMP .....	42
6.3 BMPs y cáncer .....	43
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
1. Muestras de pacientes .....	53
2. Estudios in vivo .....	54
2.1 Animales de experimentación .....	54
2.2 Modelo xenogénico de leucemia linfoblástica aguda .....	54
2.3 Recolección de muestras biológicas .....	55
2.4 Obtención de suspensiones celulares a partir de tejido .....	56
2.5 Administración subcutánea de tratamientos .....	56
2.6 Administración intra-cerebroventricular de tratamientos (ICV) .....	57
2.7 Tests de comportamiento .....	58

2.7.1	Test de la cuerda transversal.....	58
2.7.2	Prueba de fuerza de agarre .....	58
2.7.3	Prueba de discriminación olfativa .....	59
2.8	Técnicas histológicas.....	59
2.8.1	Tinción con hematoxilina-eosina.....	60
2.8.2	Inmunofluorescencia.....	60
2.8.3	Microscopía electrónica de transmisión.....	61
2.8.4	Cuantificación semicuantitativa de la infiltración en el cerebro .....	62
2.9	Resonancia magnética .....	62
3.	Estudios in vitro .....	63
3.1	Obtención y cultivo de líneas celulares leucémicas.....	63
3.2	Transducción de la línea celular Nalm6 .....	64
3.3	Obtención y cultivo de células neurales .....	65
3.4	Co-cultivos .....	66
3.5	Obtención y cultivo de células madre neurales adultas .....	67
3.6	Ensayos de autorrenovación.....	67
3.7	Co-cultivos NSCs- NALM6 .....	67
3.8	Ensayos de proliferación.....	68
3.9	Determinación de la viabilidad celular .....	68
3.10	Tinción con CFSE .....	69
3.11	Ensayos de migración.....	69
3.12	Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (PCRq) .....	69
3.13	Citometría de flujo.....	70
3.14	Cuantificación de factores solubles. ....	72
4.	Análisis estadístico.....	72
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>75</b>
1.	Localización y distribución de las células leucémicas en el sistema nervioso en un modelo in vivo.....	77
2.	Entrada de las células leucémicas al parénquima nervioso a través de la limitante glial-pial ...	82
3.	Rotura de la barrera glial-pial .....	85
4.	Respuesta inflamatoria en el SNC como consecuencia de la infiltración leucémica .....	88
5.	La infiltración leucémica en SNC provoca muerte neuronal .....	90
6.	La infiltración leucémica provoca alteraciones sensitivas y motoras.....	90
7.	Las células leucémicas que alcanzan el parénquima nervioso son resistentes a los tratamientos quimioterápicos utilizados en la terapia intratecal .....	91
8.	El nicho neurogénico aloja células leucémicas. Impacto en la neurogénesis.....	92
9.	Localización de células leucémicas en los ventrículos cerebrales .....	96
10.	El estroma del plexo coroideo es invadido por células leucémicas.....	97

---

11. Caracterización del estroma conjuntivo del plexo. Respuesta a la presencia de células leucémicas .....	99
12. El estroma del plexo coroideo como santuario para las células leucémicas .....	105
13. Expresión de BMP4 en diferentes subpoblaciones de células leucémicas .....	109
14. La elevada expresión de BMP4 en muestras primarias de LLA-B correlaciona con mayores tasas de injerto en el modelo xenogénico de LLA .....	110
15. Niveles elevados de BMP4 incrementan la agresividad de la línea leucémica Nalm6 .....	111
16. El tratamiento con el inhibidor de la señalización canónica de BMP, DMH1, reduce la infiltración leucémica en el SNC .....	118
17. La inhibición de la vía canónica de señalización BMP reduce la viabilidad de las células leucémicas .....	122
18. Estudio de la expresión de los componentes la vía de señalización BMP en muestras de pacientes de LLA .....	123
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>129</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>157</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>173</b>



# RESUMEN



## LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA: INFILTRACIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PAPEL DE BMP4

### INTRODUCCIÓN.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en la población infantil. Caracterizada por la alteración genética de las células hematopoyéticas que modifican su capacidad de proliferación y diferenciación, esta enfermedad se presenta con la acumulación de células tumorales en la médula ósea y la extensión extramedular de las mismas. La mejora de las estrategias terapéuticas, fundamentalmente debida a la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo y al tratamiento profiláctico dirigido al sistema nervioso central (SNC), ha permitido que las tasas de supervivencia superen el 80% en la actualidad<sup>1,2</sup>. De esta forma, sólo los pacientes incluidos en el grupo de riesgo alto reciben tratamientos más intensivos, reduciéndose así los efectos secundarios derivados de la terapia<sup>3</sup>. Por otra parte, la eficacia de la profilaxis en SNC pone de manifiesto que éste ya está colonizado en el momento del diagnóstico, a pesar de no detectarse la presencia de células tumorales en el líquido cefalorraquídeo (LCR)<sup>4</sup> con las técnicas de diagnóstico utilizadas. De hecho, autopsias realizadas a niños con LLA en los años 70 por Price *et al.* indicaban que en torno al 50-60% de las pacientes presentaban afectación de SNC<sup>5</sup>. Además, si bien las tasas de supervivencia han experimentado un notable incremento, todavía un 15-20% de los pacientes diagnosticados, principalmente incluidos en grupos de riesgo no alto, recaen en médula ósea y/o en otras localizaciones extramedulares, siendo las recaídas en SNC una de las principales causas de morbi-mortalidad en niños<sup>6,7</sup>. La correcta identificación de todos los casos y la comprensión de los mecanismos por los que las células leucémicas penetran y sobreviven en el tejido nervioso dando lugar a posteriores recaídas representan los principales desafíos de la enfermedad.

Las rutas y mecanismos mediante los cuales las células alcanzan el SNC aún no han sido completamente descritos, sin embargo, puesto que la entrada de células y moléculas al mismo está estrictamente regulada por tres barreras: 1) la barrera hematoencefálica (BHE), 2) la barrera sangre-LCR (BSLCR) y 3) la limitante glial pial; parece inevitable que al menos alguna de éstas sea modificada para facilitar la entrada de las células leucémicas<sup>8-10</sup>. La infiltración del SNC en pacientes con LLA se ha considerado clásicamente como una enfermedad fundamentalmente meníngea atribuyéndose la entrada de células al parénquima nervioso a estados avanzados de la enfermedad<sup>11</sup>. Aunque los trabajos que abordan la colonización al SNC son escasos, diferentes rutas han sido propuestas para las células leucémicas. Así, Price *et al.* sugirieron la llegada de éstas al espacio subaracnoideo a través de los senos venosos duros<sup>5</sup>. Sin embargo, otros autores apuntan al plexo coroideo por su mayor grado de permeabilidad<sup>12,13</sup> y, por su parte, Yao *et al.* han propuesto la infiltración del SNC por las células leucémicas procedentes de la médula ósea del cráneo a lo largo de la capa adventicia de las venas emisarias<sup>14</sup>. En cuanto a los mecanismos, números factores y vías de señalización se han asociado con la infiltración de SNC en diferentes trabajos,

incluyendo la regulación de moléculas de adhesión (VE-caherina, ICAM-1, VLA-6)<sup>13-15</sup> y metaloproteasas (MMP2, MMP9)<sup>16</sup>. Además, cambios en la expresión de genes como *IL-15*, *IL-7R*, *CXCR3*, *CXCR4* y *CCR7* en las células tumorales primarias y alteraciones en la composición del líquido cefalorraquídeo (incremento de VEGFA, CXCL10 o factores pro-inflamatorios) se han postulado como marcadores de pacientes con una mayor probabilidad de afectación del SNC o recaídas en esta localización<sup>17, 18</sup>.

Más allá de los mecanismos de entrada al SNC, cuyo valor clínico es limitado si, como indican algunos estudios, en el momento del diagnóstico más del 40% de los pacientes ya presentan afectación en el SNC, es fundamental determinar cuáles son las interacciones celulares y los factores del microambiente responsables del mantenimiento y supervivencia de las células leucémicas, quedando protegidas de la quimioterapia. En este sentido, se ha descrito que la interacción *in vitro* con algunos tipos celulares del SNC favorecen la supervivencia de las células leucémicas durante el tratamiento con fármacos quimioterápicos. Por otra parte, el análisis comparativo entre células aisladas del cerebro y de médula ósea indica que las células leucémicas que invaden el SNC adoptan un estado de mayor quiescencia con un menor consumo de oxígeno y mayor actividad glicolítica, lo que promueve su supervivencia en esta localización dando lugar a posteriores recaídas<sup>15, 19, 20</sup>.

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son factores de crecimiento que constituyen una familia dentro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Los ligandos BMP señalizan a través de la unión a los complejos formados por receptores tipo I (BMPRIA, BMPRIB y ActRIA) y tipo II (BMPRII, ActRIIA y ActRIIB). Como resultado de esa unión, los últimos transfosforilan a receptores tipo I que, a su vez fosforilan a las Smads reguladas por receptor de BMP, las BR-SMADs (SMAD1/5/8). Estas se unen a la smad mediadora común (SMAD4) formando un complejo que se transloca al núcleo para regular la expresión de los genes diana. Alternativamente a esta vía canónica, la unión al receptor puede desencadenar la activación de proteínas quinasas (p38, JNK y ERK) o GTPasas (Rho, Rac). La señalización BMP está sometida a una estricta regulación a diferentes niveles: intracelular, por las smads inhibitoras (SMAD6, SMAD7), extracelular, por los antagonistas (Noggin, Chordin, Gremlin) y a nivel de membrana, por los co-represores y los co-receptores<sup>21</sup>.

En cuanto a su función, las BMPs son proteínas multifuncionales que participan tanto en el desarrollo embrionario como en la regulación de la proliferación, supervivencia, diferenciación, quimiotaxis, apoptosis y migración de diversos tipos celulares en diferentes tejidos y órganos. Recientemente, alteraciones en los componentes de su vía de señalización se han asociado al proceso de carcinogénesis<sup>22</sup>. Numerosos estudios principalmente en tumores sólidos, aunque también en algunas neoplasias hematológicas, han puesto de manifiesto los efectos pro y anti-tumorales de los BMPs, reflejo de la complejidad de su vía de señalización, siendo, además, dependientes del tipo de tumor, el estadio, la recurrencia y del microambiente tumoral<sup>23</sup>. Estos trabajos apuntan a los componentes de la vía de

señalización y al estado de la misma como posibles indicadores de posteriores complicaciones en la enfermedad, sirviendo en algunos casos como potenciales dianas terapéuticas.

## OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Estudiar la localización de las células leucémicas en el SNC en un modelo animal de LLA
2. Evaluar los cambios histológicos y funcionales en el SNC como consecuencia de la infiltración leucémica abordando sus efectos en la neurogénesis
3. Analizar el plexo coroideo como nicho para células leucémicas
4. Evaluar la relevancia de BMP4 y su vía de señalización en la infiltración leucémica
5. Validar prospectivamente el valor pronóstico de BMP4 y el estado de la vía canónica de señalización de BMP4 en los blastos leucémicos en niños diagnosticados de LLA

## MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras primarias procedentes del aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos diagnosticados de LLA en tres centros diferentes fueron proporcionadas por el Hospital Universitario Niño Jesús de Madrid con la participación del Grupo de Estudios Biológicos de la LLA infantil que agrupa a todos los laboratorios españoles dedicados al diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Niño Jesús de Madrid y, en todos los casos se obtuvo el consentimiento informado previo de padres o tutores.

Para el establecimiento del modelo xenogénico de LLA, algunas de estas muestras, junto con la línea celular Nalm6, modificada o no para sobreexpresar BMP4 (Nalm6-BMP4), fueron transplantadas en ratones inmunodeficientes NSG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ). En este modelo se llevaron a cabo los test comportamentales y se analizó mediante técnicas histológicas (tinciones convencionales, microscopía de fluorescencia y electrónica) la distribución de las células leucémicas en el cerebro de estos animales y los cambios histológicos derivados de la infiltración. La infiltración de células tumorales en órganos diana (cerebro, médula ósea, bazo y sangre) se cuantificó mediante citometría de flujo. Además, estos animales fueron sometidos a pruebas de resonancia magnética con un agente de contraste basado en gadolinio (IRM-Gd) para el análisis de la integridad de las barreras cerebrales.

El análisis del papel de BMP4 en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad se realizó mediante la administración del inhibidor de la vía canónica de señalización BMP, DMH1, a través de diferentes vías:

subcutánea, mediante la implantación de dispositivos que permitían su liberación diaria; e intracerebroventricular, mediante inyección en el ventrículo lateral.

Células primarias humanas aisladas del SNC, células madre neurales obtenidas de la zona subventricular (SVZ) de ratones C57/BL6, así como líneas leucémicas establecidas se utilizaron para el establecimiento de co-cultivos y en los ensayos de autorrenovación, proliferación, viabilidad y migración. La expresión de diferentes moléculas fue analizada por citometría de flujo y/o PCR cuantitativa y la cuantificación de factores solubles en estos cultivos, así como en el suero sanguíneo de los animales se realizó mediante ELISA o a través del sistema *Cytometric Bead Array Flex Set*.

A los cultivos y co-cultivos celulares se les adicionaron los siguientes tratamientos: BMP4 recombinante humano (0,01, 0,1, 1, 10 o 100ng/ml); DMH1 (10Mm); metotrexato, (0.01, 0.1, 1  $\mu$ M); citarabina 0.01, 0.1, 1  $\mu$ M); TNF- $\alpha$  (10ng/ml), anticuerpo bloqueante, anti-VLA-4 (10 $\mu$ g/0,5x10<sup>6</sup>células); DAPT, inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa (50 $\mu$ M).

Finalmente, los resultados fueron analizados con el software *GraphPad Prism 8.0* utilizando diferentes pruebas estadísticas en función de la distribución de los datos. Las curvas de supervivencia y de recaídas se calcularon según el modelo de Kaplan Meier. Los niveles de significación considerados fueron los siguientes: \*p  $\leq$  0,05; \*\* p  $\leq$  0,1; \*\*\* p  $\leq$  0,001.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados derivados del estudio de la infiltración en el SNC en un modelo xenogénico de LLA que recrea la histopatología de la enfermedad descrita por Price *et al.* a partir de autopsias realizadas a pacientes pediátricos de LLA<sup>5</sup>, evidencian que los acúmulos de células leucémicas en el espacio subaracnoideo se localizan, fundamentalmente, en zonas que corresponden con las cisternas y principales cisuras cerebrales en las que la velocidad de LCR sería menor, como se ha descrito en metástasis de otros tumores sólidos<sup>24</sup>. Las células que forman estos agregados en contacto con la piamadre presentan además una reducida tasa proliferativa, confirmando la protección inducida por las células leptomenígeas a la que apuntaban otros autores a partir de estudios *in vitro*<sup>25</sup> y en consonancia con datos previos que indican una mayor quiescencia de las células que infiltran el SNC frente a células aisladas de periferia<sup>20</sup>.

El estudio histológico de las secciones de cerebro de los animales que desarrollaban la enfermedad ha puesto de manifiesto el incremento del número y calibre de los vasos sanguíneos en el parénquima nervioso no descrito hasta el momento pero similar a lo que ocurre en médula ósea<sup>26</sup>. También indica que tanto la microglía como los astrocitos responden a la metástasis leptomenígea. Esta respuesta podría contribuir a la inducción del ambiente inflamatorio en el SNC que, como apuntan nuestros datos, es característico en estos animales, del mismo modo que se ha descrito un incremento de factores pro-inflamatorios en el LCR de los pacientes con peor pronóstico<sup>27, 28</sup>. Además, este ambiente puede ser

responsable del daño tisular observado y fundamental en la rotura de la barrera glial-pial demostrada por microscopía de fluorescencia y por IRM-Gd, dando paso a la colonización del parénquima nervioso por las células tumorales, constituyendo así una de las rutas de entrada.

Aunque en menor medida que en el espacio subaracnoideo, encontramos también pequeños grupos de células en distintas localizaciones del parénquima nervioso, entre ellas zonas profundas de la corteza cerebral las cuales, además, sobreviven a los efectos de los quimioterápicos en animales tratados pudiendo ser responsables de posteriores recaídas. En este trabajo se demuestra también la presencia de blastos leucémicos en el nicho neurogénico de la zona subventricular como habían hipotetizado previamente otros autores<sup>29</sup>. Esta colonización induce el bloqueo de la diferenciación de las NSCs alterando el proceso de neurogénesis fundamental en la edad pediátrica de estos pacientes. Estos datos sugieren que la infiltración leucémica en el SNC junto con la inflamación podría contribuir al desarrollo de los problemas neurocognitivos detectados en estos pacientes y atribuidos hasta ahora a los efectos secundarios de la terapia intratecal (TIT)<sup>30,31</sup>.

Nuestros resultados también ponen de manifiesto la presencia de células leucémicas en los ventrículos laterales, tanto en la luz de este, interaccionando, a veces, con el epitelio del plexo coroideo como en el estroma del mismo. La localización de células tumorales en el espacio perivascular de los vasos presentes en este estroma sugiere además, la llegada de células desde el torrente circulatorio hasta el estroma del plexo coroideo a través de los endotelios fenestrados característicos en esta localización, tal y como habían sugerido otros autores<sup>14</sup>. Esta llegada podría estar facilitada, según lo descrito en pacientes con esclerosis múltiple<sup>32</sup>, por la inducción de cambios fenotípicos en las células endoteliales del plexo coroideo, ya que estas células incrementan en la expresión de factores pro-inflamatorios, moléculas de adhesión y metaloproteasas, al mismo tiempo que regulan negativamente la expresión las moléculas que forman las uniones adherentes entre células.

La llegada de células a un compartimento que presenta las características adecuadas para albergar células del linaje hematopoyético<sup>33, 34</sup> sugiere que este podría presentar un microambiente favorable para el mantenimiento de células leucémicas, una cuestión que hasta el momento no ha sido abordada en la literatura. En este sentido, nuestros resultados revelan el establecimiento de un estrecho contacto entre las células leucémicas y los fibroblastos presentes en el estroma del plexo coroideo, observándose una regulación positiva de las integrinas VLA-4 y LFA-1 en las primeras, que correlaciona con un incremento de sus ligandos, VCAM-1 e ICAM-1 en los segundos. Esta interacción induce cambios relevantes en ambos tipos celulares. Por un lado, las células tumorales, productoras de elevadas cantidades de TGF- $\beta$ , provocan un incremento en la expresión de algunos de los marcadores descritos en los fibroblastos asociados a tumor en tumores sólidos<sup>35</sup>, como alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), vimentina o el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR $\beta$ ), así como una regulación positiva del ligando de la vía de señalización Notch, JAGGED-1, e inducen, de forma similar a lo descrito en las células

mesenquimales derivadas de médula ósea de pacientes con LLA<sup>36</sup>, la producción de factores pro-inflamatorios. Por otra parte, los fibroblastos promueven una reducción significativa de la tasa proliferativa de las células leucémicas e inducen quimiorresistencia a los fármacos convencionales utilizados en la TIT (metotrexato y citarabina) a través, al menos en parte, de las interacciones VCAM-1-VLA-4, como han demostrado otros grupos en el desarrollo de una menor sensibilidad frente a estos fármacos en las células leucémicas localizadas en médula ósea<sup>37</sup>. Además, en consonancia con lo descrito por Kamga *et al.*<sup>38</sup>, la señalización Notch también parece estar implicada en la adquisición de la resistencia exhibida por las células leucémicas, pues la inhibición de esta vía de señalización, así como el bloqueo de VLA-4 revierte parcialmente los efectos protectores.

En cuanto al papel de BMP4 en el desarrollo y establecimiento de la LLA, los resultados obtenidos en este trabajo a partir del modelo xenogénico de LLA indican que una elevada expresión de BMP4 favorece la capacidad de injerto, incrementa la agresividad de las células tumorales y promueve la infiltración en el SNC, identificándose efectos tanto autocrinos como paracrinos de esta proteína. Así, observamos una reducción de la tasa proliferativa como consecuencia de los elevados niveles de BMP4 en las células leucémicas Nalm6 que conduce a un incremento de la quimiorresistencia, de forma similar a lo descrito por otros autores en leucemias mieloides<sup>39</sup>. Además, estas células exhiben un fenotipo más invasivo, con un incremento en la expresión de las moléculas de adhesión LFA-1 y VLA-4, así como de la metaloproteasa ADAM10, asociadas a la mayor supervivencia y migración de las células, a la infiltración en SNC y a un mal pronóstico<sup>13,40,41</sup>.

Por otra parte, los efectos de BMP4 sobre el microambiente se deben, fundamentalmente, al papel inductor de procesos inflamatorios ampliamente demostrado en otros sistemas<sup>42-44</sup>. La mayor respuesta inflamatoria se refleja en el incremento de los niveles séricos de IL-6 y en el agravamiento de la sintomatología clínica en estos animales debido, presumiblemente, a un incremento de la inflamación en los acúmulos leucémicos formados en las raíces nerviosas. En cuanto al SNC, como ocurre en otros modelos<sup>45</sup>, los elevados niveles de BMP4 incrementan la respuesta inflamatoria observada en los animales como consecuencia de la infiltración leucémica, pues se observa una respuesta astrogliol exacerbada en el cerebro de los animales trasplantados con las células Nalm6-BMP4. Además, nuestros datos ponen de manifiesto las modificaciones producidas en las barreras cerebrales, pues BMP4 induce la adquisición de un fenotipo pro-inflamatorio en las células endoteliales de la vasculatura cerebral, así como cambios en la población de atrociitos y, en consecuencia, de la limitante glial astrocitaria. Estas alteraciones conducen a un incremento de la permeabilidad de las barreras que facilita la entrada de células leucémicas.

Los efectos observados en el desarrollo de la LLA no parecen estar mediados por la vía de señalización canónica de BMP, pues con el bloqueo de la misma los efectos observados afectan principalmente al SNC. Sin embargo, puesto que recientemente se ha demostrado la baja capacidad de distribución del inhibidor

utilizado (DMH1) y su rápida inactivación al unirse a proteínas plasmáticas no podemos descartar que la ausencia de efecto no sea debido a las propiedades farmacocinéticas del fármaco.

Finalmente, el análisis de la expresión de los componentes de la vía de señalización BMP a partir de muestras primarias de una cohorte de 174 pacientes indica que, en los pacientes incluidos en el grupo de riesgo no alto, la inhibición de la vía canónica de señalización BMP en el momento del diagnóstico se correlaciona con un mal pronóstico, asociándose con posteriores recaídas.

## CONCLUSIONES

1. Coincidiendo con las principales cisuras y cisternas cerebrales, un importante porcentaje de las células leucémicas presentes en el espacio subaracnoideo forman agregados complejos con las células leptomeníngeas.
2. La infiltración leucémica en el SNC provoca la rotura de la barrera glial pial con la consiguiente invasión del parénquima nervioso.
3. Las células leucémicas que penetran el parénquima nervioso son resistentes a la quimioterapia, provocan una respuesta inflamatoria, daño tisular y alteraciones comportamentales.
4. Las células leucémicas alcanzan el nicho neurogénico de la SVZ induciendo una respuesta inflamatoria y la inhibición de la neurogénesis.
5. Las células leucémicas invaden el estroma del plexo coroideo, induciendo un fenotipo protumorogénico en los fibroblastos residentes.
6. La interacción célula leucémica -fibroblasto provoca en las primeras la pérdida de expresión de CD19, la reducción de la tasa proliferativa y, en consecuencia, la resistencia a los agentes quimioterápicos. La señalización a través de VLA-4 y Notch media estos efectos.
7. Elevados niveles de expresión de BMP4 favorece el desarrollo de la LLA en el modelo xenogénico, induciendo un fenotipo más agresivo. Por otra parte, la señalización canónica de BMP está implicada en la infiltración en el SNC.
8. La expresión reducida de las BR-smads y/o el incremento de las smad inhibitoras en blastos de pacientes analizados en el momento del diagnóstico se asocian con un peor pronóstico. Además, la incidencia acumulada de recaídas tiende a ser superior en los pacientes que, al diagnóstico, presentan blastos con elevados niveles de expresión de BMP4 y bajos de SMAD1.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
2. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50(4):314-24.
3. Tratamiento de la Leucemia Aguda Linfoblástica de Nuevo Diagnóstico. Recomendaciones terapéuticas LAL/SEHOP-PETHEMA 2013.
4. Pui CH, Thiel E. Central nervous system disease in hematologic malignancies: historical perspective and practical applications. *Semin Oncol*. 2009;36(4 ):S2-S16.
5. Price RA, Johnson WW. The central nervous system in childhood leukemia. I. The arachnoid. *Cancer*. 1973;31(3):520-33.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30.
7. Bhojwani D, Pui CH. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):e205-17.
8. Saunders NR, Habgood MD, Mollgard K, Dziegielewska KM. The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? *F1000Res*. 2016;5.
9. Ghersi-Egea JF, Strazielle N, Catala M, Silva-Vargas V, Doetsch F, Engelhardt B. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathol*. 2018;135(3):337-61.
10. Engelhardt B, Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids and barriers of the CNS*. 2011;8(1):4.
11. Ginsberg LE, Leeds NE. Neuroradiology of leukemia. *AJR Am J Roentgenol*. 1995;165(3):525-34.
12. Williams MT, Yousafzai YM, Elder A, Rehe K, Bomken S, Frishman-Levy L, et al. The ability to cross the blood-cerebrospinal fluid barrier is a generic property of acute lymphoblastic leukemia blasts. *Blood*. 2016;127(16):1998-2006.
13. Holland M, Castro FV, Alexander S, Smith D, Liu J, Walker M, et al. RAC2, AEP, and ICAM1 expression are associated with CNS disease in a mouse model of pre-B childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;118(3):638-49.
14. Yao H, Price TT, Cantelli G, Ngo B, Warner MJ, Olivere L, et al. Leukaemia hijacks a neural mechanism to invade the central nervous system. *Nature*. 2018;560(7716):55-60.
15. Akers SM, O'Leary HA, Minnear FL, Craig MD, Vos JA, Coad JE, et al. VE-cadherin and PECAM-1 enhance ALL migration across brain microvascular endothelial cell monolayers. *Exp Hematol*. 2010;38(9):733-43.
16. Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. *PLoS One*. 2011;6(8):e20599.
17. Gossai NP, Gordon PM. The Role of the Central Nervous System Microenvironment in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Pediatr*. 2017;5:90.
18. Frishman-Levy L, Izraeli S. Advances in understanding the pathogenesis of CNS acute lymphoblastic leukaemia and potential for therapy. *Br J Haematol*. 2017;176(2):157-67.
19. Gaynes JS, Jonart LM, Zamora EA, Naumann JA, Gossai NP, Gordon PM. The central nervous system microenvironment influences the leukemia transcriptome and enhances leukemia chemoresistance. *Haematologica*. 2017;102(4):e136-e9.
20. Kato I, Nishinaka Y, Nakamura M, Akarca AU, Niwa A, Ozawa H, et al. Hypoxic adaptation of leukemic cells infiltrating the CNS affords a therapeutic strategy targeting VEGFA. *Blood*. 2017;129(23):3126-9.
21. Yadin D, Knaus P, Mueller TD. Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;27:13-34.
22. Ning J, Zhao Y, Ye Y, Yu J. Opposing roles and potential antagonistic mechanism between TGF-beta and BMP pathways: Implications for cancer progression. *EBioMedicine*. 2019;41:702-10.
23. Zhang L, Ye Y, Long X, Xiao P, Ren X, Yu J. BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination. *Oncotarget*. 2016;7(47):78206-18.

24. Weller RO, Sharp MM, Christodoulides M, Carare RO, Mollgard K. The meninges as barriers and facilitators for the movement of fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS. *Acta Neuropathol.* 2018;135(3):363-85.
25. Akers SM, Rellick SL, Fortney JE, Gibson LF. Cellular elements of the subarachnoid space promote ALL survival during chemotherapy. *Leuk Res.* 2011;35(6):705-11.
26. Trujillo A, McGee C, Cogle CR. Angiogenesis in acute myeloid leukemia and opportunities for novel therapies. *J Oncol.* 2012;2012:128608.
27. Eisenkraft A, Keidan I, Bielora B, Keller N, Toren A, Paret G. MCP-1 in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2006;30(10):1259-61.
28. Jaime-Perez JC, Gamboa-Alonso CM, Jimenez-Castillo RA, Lopez-Silva LJ, Pinzon-Uresti MA, Gomez-De Leon A, et al. TNF-alpha increases in the CSF of children with acute lymphoblastic leukemia before CNS relapse. *Blood Cells Mol Dis.* 2017;63:27-31.
29. Heidari N, Saki N, De Filippis L, Shahjahani M, Teimouri A, Ahmadzadeh A. Central nervous system niche involvement in the leukemia. *Clin Transl Oncol.* 2016;18(3):240-50.
30. Krull KR, Brinkman TM, Li C, Armstrong GT, Ness KK, Srivastava DK, et al. Neurocognitive outcomes decades after treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the St Jude lifetime cohort study. *J Clin Oncol.* 2013;31(35):4407-15.
31. Hearps S, Seal M, Anderson V, McCarthy M, Connellan M, Downie P, et al. The relationship between cognitive and neuroimaging outcomes in children treated for acute lymphoblastic leukemia with chemotherapy only: A systematic review. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(2):225-33.
32. Vercellino M, Votta B, Condello C, Piacentino C, Romagnolo A, Merola A, et al. Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study. *J Neuroimmunol.* 2008;199(1-2):133-41.
33. Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Inaba M, Li M, Shi M, Kawamura N, et al. Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus. *Brain Behav Immun.* 2013;29:82-97.
34. Nataf S, Strazielle N, Hatterer E, Mouchiroud G, Belin MF, Ghersi-Egea JF. Rat choroid plexuses contain myeloid progenitors capable of differentiation toward macrophage or dendritic cell phenotypes. *Glia.* 2006;54(3):160-71.
35. LeBleu VS, Kalluri R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis Model Mech.* 2018;11(4).
36. Entrena A, Varas A, Vazquez M, Melen GJ, Fernandez-Sevilla LM, Garcia-Castro J, et al. Mesenchymal stem cells derived from low risk acute lymphoblastic leukemia patients promote NK cell antitumor activity. *Cancer Lett.* 2015;363(2):156-65.
37. Jacamo R, Chen Y, Wang Z, Ma W, Zhang M, Spaeth EL, et al. Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF-kappaB mediates chemoresistance. *Blood.* 2014;123(17):2691-702.
38. Takam Kamga P, Dal Collo G, Midolo M, Adamo A, Delfino P, Mercuri A, et al. Inhibition of Notch Signaling Enhances Chemosensitivity in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.* 2019;79(3):639-49.
39. Zhao X, Liu J, Peng M, Liu J, Chen F. BMP4 is involved in the chemoresistance of myeloid leukemia cells through regulating autophagy-apoptosis balance. *Cancer Invest.* 2013;31(8):555-62.
40. Shalpour S, Hof J, Kirschner-Schwabe R, Bastian L, Eckert C, Prada J, et al. High VLA-4 expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse. *Haematologica.* 2011;96(11):1627-35.
41. Caltabiano R, Puzzo L, Barresi V, Ieni A, Loreto C, Musumeci G, et al. ADAM 10 expression in primary uveal melanoma as prognostic factor for risk of metastasis. *Pathol Res Pract.* 2016;212(11):980-7.
42. Eixarch H, Calvo-Barreiro L, Montalban X, Espejo C. Bone morphogenetic proteins in multiple sclerosis: Role in neuroinflammation. *Brain Behav Immun.* 2018;68:1-10.
43. Wu DH, Hatzopoulos AK. Bone morphogenetic protein signaling in inflammation. *Exp Biol Med (Maywood).* 2019;244(2):147-56.
44. Helbing T, Arnold L, Wiltgen G, Hirschbihl E, Gabelmann V, Hornstein A, et al. Endothelial BMP4 Regulates Leukocyte Diapedesis and Promotes Inflammation. *Inflammation.* 2017;40(6):1862-74.

45. Shijo T, Warita H, Suzuki N, Ikeda K, Mitsuzawa S, Akiyama T, et al. Antagonizing bone morphogenetic protein 4 attenuates disease progression in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2018;307:164-79.

# SUMMARY



## ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: CENTRAL NERVOUS SYSTEM INFILTRATION AND ROLE OF BMP4

### INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood malignancy. It is thought to originate from genetic alterations that disrupt lymphoid differentiation and proliferation ability in hematopoietic cells. This disease is defined by an accumulation of tumour cells in the bone marrow and the later extramedullar expansion. Improved treatment strategies, mainly due to patients stratification into risk-adapted groups and prophylactic central nervous system (CNS) directed therapy, has led to an increase of survival rates to more than 80%<sup>1,2</sup>. Therefore, only those children included in high-risk group receive the most intensive treatments, thus reducing treatment-related adverse side-effects<sup>3</sup>. On the other hand, the efficacy of CNS prophylaxis shows that CNS is already colonized by leukemic cells at diagnosis, even if presence of tumour cells in cerebrospinal fluid (CSF) is undetectable by using current diagnostic methods<sup>4</sup>. In fact, studies from autopsies of children who died from ALL performed by Price *et al.* revealed that around 50-60% of patients had CNS involvement<sup>5</sup>. Furthermore, while survival rates have notably raised, 15-20% of ALL diagnosed children, mainly included in non-high risk groups, still relapse into bone marrow and/or other extramedullary locations. CNS relapses remains a major cause of morbidity and mortality in these children<sup>6,7</sup>. The main challenges of the disease are the correct identification of all cases and the understanding of the mechanisms by which leukemia cells penetrate and survive in the nervous tissue, thus favouring later relapses.

The entry pathways and mechanisms by which tumour cells invade the CNS have not yet been fully described. However, the movement of cells and molecules between CNS and the periphery is strictly regulated by three brain barriers: 1) the blood brain barrier, 2) the blood-CSF barrier and 3) the glial pial membrane; what means that altered properties of these barriers are crucial for leukemic CNS infiltration<sup>8-10</sup>. CNS involvement in ALL has been described primarily as a meningeal disease, but brain parenchyma invasion by leukemic cells has been associated to advanced stages of the disease<sup>11</sup>. To date, although CNS colonization has been scarcely studied, various entry routes has been proposed. Price *et al.* suggested that cells could enter in the CNS by migrating through the dural venous endothelium<sup>5</sup>. Other authors, however, propose the fenestrated endothelium of choroid plexus as a potential gate towards the CSF<sup>12</sup>,<sup>13</sup>. Alternatively, Yao *et al.* have pointed out that leukemic cells may spread directly from the bone marrow of the skull into the meninges via the bridging veins<sup>14</sup>. In these sense, several factors and signaling pathways have also been associated with CNS infiltration. They include adhesion molecules (VE-cadherin, ICAM-1, VLA-6)<sup>13-15</sup> and metalloproteases (MMP2, MMP9)<sup>16</sup>. In addition, changes in the expression of several genes such as *IL-15*, *IL-7R*, *CXCR3*, *CXCR4* y *CCR7* in leukemic cells, as well as alterations in the

composition of CSF (increase of VEGFA, CXCL10 or pro-inflammatory factors) have been proposed as markers for patients with a higher likelihood of CNS involvement or relapses in this location<sup>17, 18</sup>.

Beyond the CNS entry mechanisms used by leukemic blasts, whose clinical value may be limited if, as some studies indicate, more than 40% of patients already have CNS involvement at diagnosis, it is essential to identify which are the cell-cell interactions established in the CNS and the microenvironmental factors responsible for the maintenance and survival of leukemia cells protected from chemotherapy. In this context, it has been found that leukemic cells co-cultured with CNS-derived cells exhibited enhanced chemoresistance<sup>25</sup>. Others have performed a comparative analysis between isolated cells from brain and bone marrow indicating that blasts obtained from CNS are more quiescent, consume less oxygen, and have greater glycolytic activity. These features improve survival in CNS microenvironment resulting in later relapses<sup>15, 19, 20</sup>.

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are members of a growth factors family that belongs to the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily. BMP ligands bind to type I (BMPRIA, BMPRIB and ActRIA) and type II (BMPRII, ActRIIA and ActRIIB) receptors. Upon binding, type II receptors, which have constitutive kinase activity, phosphorylate type I receptor. Then, BMP-receptor regulated Smads, BR-Smads (SMAD1/5/8) are activated. They bind to the common mediating smad (SMAD4) forming complexes which then translocate into the nucleus to regulate target genes expression. Alternatively, to this canonical pathway, BMPs activate non-smad signaling pathways including kinase proteins (p38, JNK and ERK) or GTPases (Rho, rac). BMP signaling is strictly regulated at multiple levels including inhibitory smads (SMAD6, SMAD7), antagonists (Noggin, Chordin, Gremlin) co-receptors and co-repressors<sup>21</sup>.

In terms of function, BMPs are multifunctional proteins involved in both embryonic development and regulation of cellular processes such as proliferation, survival, differentiation, chemotaxis, apoptosis and migration of different cell types from different tissues and organs. Recently, alterations in this signaling pathway has been linked to carcinogenesis<sup>22</sup>. Multiple studies, mainly in solid tumours but also in some hematological malignancies, have reported the pro- and anti- tumour effects of BMPs. The dual role showed by these components reflects the complexity of the pathway and the variable effects depending on the type of tumour, stage, recurrence and tumour microenvironment<sup>23</sup>. These studies highlight the contribution of ligands, receptors and interacting molecules and BMP signaling pathway status as indicators of disease complications. They have also been proposed as potential therapeutic targets in some cases.

## OBJECTIVES

The aims of the present work are:

1. To study the location of leukemic cells in the CNS by using a xenograft model of ALL.
2. To analyse the CNS histological and functional changes derived from leukemic infiltration while also considering its impact in neurogenesis.
3. To study the choroid plexus as a niche for leukemic cells.
4. To evaluate the biological relevance of BMP4 and its signaling pathway in leukemic infiltration.
5. To prospectively validate the prognostic value of BMP4 and the BMP canonical signaling status in samples from ALL diagnosed children.

## RESULTS AND DISCUSSION

Results derived from ALL xenograft model, which recreates the histopathology of the disease described from autopsies of children who died from ALL by Price *et al*<sup>5</sup>, reveal the presence of leukemic cells aggregates in the subarachnoid space. They are mainly located in areas where cerebral cisterns and fissures are placed and where the CSF flow rate may be consequently decreased, as it has been already described in CNS metastasis of some other solid tumours<sup>24</sup>. In these clusters, those leukemic cells which are in contact with the piamater showed a reduced proliferation rate. This result confirms leptomeningeal induced protection of leukemic cells suggested by other authors from *in vitro* co-cultures<sup>25</sup> and is in line with previous data indicating that CNS infiltrating cells exhibit more quiescence than those isolated from peripheral organs<sup>20</sup>.

Brain histological study of mice brain cryosections showed an increased development of brain vasculature in mice with ALL, which has not been previously reported although similar results have been described in bone marrow<sup>26</sup>. This analysis also revealed that both microglia cells and astrocytes respond to leukemic leptomeningeal metastasis. This response could contribute to the pro-inflammatory microenvironment we have observed in these animals in a similar way that pro-inflammatory factors are increased in CSF of ALL patients with poor prognosis<sup>27,28</sup>. Also, inflammatory response may result in tissue damage and glial pial membrane alterations revealed by fluorescence microscopy and MRI-Gd, thus favouring CNS colonization by leukemic cells. Therefore, glial-pial membrane could be at least one of the entry routes used by these cells.

We also found, although to a lesser extent, small groups of cells in different locations of brain parenchyma, including deep layers of cerebral cortex. There, tumour cells seem to be able to evade chemotherapy effects leading to subsequent relapses. In the present work we show the presence of leukemic blasts in the subventricular zone neurogenic niche in agreement with the previous hypothesis proposed by other

authors<sup>29</sup>. Leukemic colonization of this niche induce an impairment of neural stem cells differentiation, thus altering normal neurogenesis. These data suggest that leukemic CNS infiltration along with the inflammation could contribute to the development of neurocognitive problems reported in these patients. These complications have been attributed so far to intrathecal chemotherapy<sup>30,31</sup>.

In addition, our results revealed the presence of leukemic cells in the lateral ventricle, both floating in the CSF, but also interacting with the choroid plexus epithelium and within the choroid plexus stroma of those animals with CNS infiltration. The proximity of ALL cells to choroid plexus capillaries suggests they may easily enter through this fenestrated endothelium, in agreement with other authors<sup>14</sup>. As it has been previously showed in multiple sclerosis patients<sup>32</sup>, induction of phenotypical changes could favour the entrance. In fact, leukemic cells induce an upregulation of pro-inflammatory factors, adhesion molecules and metalloproteases in these endothelial cells. Furthermore, these cells downregulate adherens junctions.

The fact that hematopoietic lineage cells are maintained in the choroid plexus stroma suggests this compartment could have the appropriate microenvironment to harbour leukemic cells<sup>33,34</sup>. In this sense, our results indicated that a strong adhesion was established between ALL cells and human choroid plexus fibroblasts. The adhesion molecules VLA-4 and LFA-1, and their ligands VCAM1 and ICAM1 were upregulated in leukaemic cells and fibroblasts, respectively, when co-cultured. These cell interactions induced relevant changes in both cell types. On one hand, TGF- $\beta$  producing leukemic cells induced an upregulation of different cancer associated fibroblasts markers<sup>35</sup> such as vimentin,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and platelet derived growth factor receptor (PDGFR $\beta$ ). Other upregulated genes were *VEGFA* and the Notch signalling ligand, *JAGGED1*. In a similar way to ALL patients-derived mesenchymal stem cells from bone marrow<sup>36</sup>, fibroblasts increased pro-inflammatory factors production in presence of tumour cells. On the other hand, choroid plexus fibroblasts induced a consistent reduction of proliferation and, therefore, resistance to chemotherapeutic agents (methotrexate and citarabine) on leukemic cells. These effects are at least partially mediated by VCAM1-VLA-4 interactions, a mechanism of chemoresistance already proposed by others in bone marrow resident leukemic cells<sup>37</sup>. In agreement with Kanga *et al.*<sup>38</sup>, Notch signaling has also a role in development of leukemia chemoresistance. The inhibition of this signaling pathway as well as the blockade of VCAM1-VLA-4 interactions impaired these protective effects.

Regarding the role of BMP4 in ALL establishment and development, our data from the xenograft model indicate that high expression of BMP4 promotes leukemic cells engraftment, increases tumour cells aggressiveness and has a role in CNS infiltration through both autocrine and paracrine BMP4 effects. Thus, we found reduced proliferation rates in Nalm6 cells as a consequence of the high levels of BMP4 leading to an increased resistance to chemotherapeutics, as shown in myeloid leukemias<sup>39</sup>. In addition, these cells exhibited a more invasive phenotype, an upregulation of the adhesion molecules LFA-1 and VLA-4, as well

as ADAM10 metalloprotease. These changes are associated with increased cell survival and migration, with CNS infiltration and with poor prognosis<sup>13, 40, 41</sup>.

BMP4 is a key mediator of inflammatory conditions in different systems<sup>42-44</sup>. In ALL context, paracrine effects were mainly produced by the BMP4-induced systemic inflammatory response leading to an increase in IL-6 serum levels and the aggravation of clinical symptoms. These findings could be attributed to the inflammatory response and the leukemic clusters formed in nerve roots. Also, in a similar way to what has been previously described in different models<sup>45</sup>, we have found that high BMP4 levels in CNS resulted from leukemic infiltration induced an inflammatory response as was evidenced by an exacerbated astroglial response in brain sections of mice transplanted with Nalm6-BMP4 cells. Furthermore, our data indicated that brain barriers were altered. BMP4 induced a pro-inflammatory phenotype in brain microendothelial cells and astrocytes. These cell types have a key role in blood brain barrier and glial pial membrane integrity, what means that those alterations increase barrier permeability and favours leukemic cell entry.

The blockade of BMP canonical signaling pathway showed a significant reduction of leukemic CNS infiltration, however, no effect was observed in peripheral organs. These data indicate ALL development does not appear to be mediated by BMP canonical signaling pathway. A recent report showed that DMH1, the inhibitor used in this work has low distribution capacity and it is rapidly inactivated by binding to plasma proteins<sup>46</sup>, so the drug pharmacokinetics cannot be excluded as responsible of the absence of effect.

Finally, the analysis of BMP signaling pathway components expression in primary samples from a cohort of 174 patients indicated that in those patients included in non-high risk groups BMP canonical signaling inhibition at diagnosis correlates with poor prognosis and it is associated with relapses

## MATERIAL AND METHODS

Primary bone marrow samples of newly diagnosed ALL paediatric patients in three different hospitals were provided by Hospital Universitario Niño Jesús of Madrid with the participation of the Biology Study Group composed by all spanish research groups focused on the diagnosis and monitoring of ALL patients. This study was approved by the Ethic Committee of Clinical Research at Hospital Universitario Niño Jesús and written informed consent was obtained from parents or tutors.

In order to establish a xenograft model of ALL, both human primary samples and Nalm6 cells either unmodified or overexpressing BMP4 were transplanted onto NSG (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup> /SzJ) immunodeficient mice. These animals were subjected to several behavioural tests. Also, leukemic cells distribution as well as histological changes derived from leukemic brain infiltration were analysed by using different histological techniques (conventional staining methods, fluorescence and electron microscopy).

Tumour cells infiltration in several organs (brain, bone marrow, spleen and blood) was quantified by flow cytometry. Brain barriers integrity was also assessed by gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging (MRI-Gd).

The potential role of BMP4 in both bone marrow engraftment and development of disease was evaluated by administrating a BMP canonical signaling inhibitor, DMH1, through different ways: subcutaneously implanting infusion pumps for continuous dosing; and intracerebroventricularly via lateral ventricle injection.

Primary human cells isolated from CNS, neural stem cells obtained from subventricular zone (SVZ) of C57/BL6 mice, and leukemic cell lines were used for co-cultures establishment, self-renewal, proliferation, viability and migration assays. Different molecules expression was analysed by flow cytometry and/or quantitative PCR and soluble factors from cultures and mice sera were quantitated by ELISA or Cytometric Bead Array Flex Set.

Cell cultures and co-cultures were treated with the following treatments: human recombinant BMP4 (0,01, 0,1, 1, 10 or 100 ng/ml); DMH1 (10Mm); methotrexate, (0.01, 0.1, 1  $\mu$ M); citarabine 0.01, 0.1, 1  $\mu$ M); TNF- $\alpha$  (10ng/ml), blocking antibody, anti-VLA-4 (10 $\mu$ g/0,5x10<sup>6</sup>células); DAPT,  $\gamma$ -secretase inhibitor (50 $\mu$ M).

Finally, GraphPad Prism 8.0 software was used to perform different statistical parametric and non-parametric tests. Survival curves and cumulative incidence of relapses were analysed by using Kaplan Meier method. The significance levels considered were: \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,1$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

## CONCLUSIONS

1. Leukemic cells together with leptomeningeal cells form complex aggregates in the subarachnoid space mainly located in the main cerebral fissures and cisterns.
2. Leukemic infiltration induces glial-pial disruption leading to parenchymal invasion by tumour cells
3. Brain tissue invading leukemic cells are chemoresistant. They induce an inflammatory response, tissue damage and behavioural deficits.
4. ALL cells are able to reach SVZ neurogenic niche inducing an inflammatory response and impairing neurogenesis.
5. Choroid plexus invasion by leukemic cells promotes a pro-tumorigenic phenotype in resident fibroblasts.

6. Leukemic cell-choroid plexus fibroblast interaction induces the loss of CD19 expression, a reduction of proliferation rate, and chemotherapeutic drug resistance in tumour cells. Signaling through both VLA-4 and Notch mediate this effect.
7. High BMP4 expression levels promote ALL development in the xenograft model by inducing a more aggressive phenotype in tumour ALL cells.
8. The reduced BR-Smads expression and/or an increased inhibitory smads expression at diagnosis are associated with poor prognosis. Furthermore, the cumulative incidence of relapses tends to be higher in patients who showed high levels of BMP4 expression and low levels of SMAD1 expression at diagnosis.

## REFERENCES

1. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
2. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50(4):314-24.
3. Tratamiento de la Leucemia Aguda Linfoblástica de Nuevo Diagnóstico. Recomendaciones terapéuticas LAL/SEHOP-PETHEMA 2013.
4. Pui CH, Thiel E. Central nervous system disease in hematologic malignancies: historical perspective and practical applications. *Semin Oncol*. 2009;36(4 ):S2-S16.
5. Price RA, Johnson WW. The central nervous system in childhood leukemia. I. The arachnoid. *Cancer*. 1973;31(3):520-33.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30.
7. Bhojwani D, Pui CH. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):e205-17.
8. Saunders NR, Habgood MD, Mollgard K, Dziegielewska KM. The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? *F1000Res*. 2016;5.
9. Ghersi-Egea JF, Strazielle N, Catala M, Silva-Vargas V, Doetsch F, Engelhardt B. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathol*. 2018;135(3):337-61.
10. Engelhardt B, Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids and barriers of the CNS*. 2011;8(1):4.
11. Ginsberg LE, Leeds NE. Neuroradiology of leukemia. *AJR Am J Roentgenol*. 1995;165(3):525-34.
12. Williams MT, Yousafzai YM, Elder A, Rehe K, Bomken S, Frishman-Levy L, et al. The ability to cross the blood-cerebrospinal fluid barrier is a generic property of acute lymphoblastic leukemia blasts. *Blood*. 2016;127(16):1998-2006.
13. Holland M, Castro FV, Alexander S, Smith D, Liu J, Walker M, et al. RAC2, AEP, and ICAM1 expression are associated with CNS disease in a mouse model of pre-B childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;118(3):638-49.
14. Yao H, Price TT, Cantelli G, Ngo B, Warner MJ, Olivere L, et al. Leukaemia hijacks a neural mechanism to invade the central nervous system. *Nature*. 2018;560(7716):55-60.
15. Akers SM, O'Leary HA, Minnear FL, Craig MD, Vos JA, Coad JE, et al. VE-cadherin and PECAM-1 enhance ALL migration across brain microvascular endothelial cell monolayers. *Exp Hematol*. 2010;38(9):733-43.
16. Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. *PLoS One*. 2011;6(8):e20599.
17. Gossai NP, Gordon PM. The Role of the Central Nervous System Microenvironment in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Pediatr*. 2017;5:90.
18. Frishman-Levy L, Izraeli S. Advances in understanding the pathogenesis of CNS acute lymphoblastic leukaemia and potential for therapy. *Br J Haematol*. 2017;176(2):157-67.
19. Akers SM, Rellick SL, Fortney JE, Gibson LF. Cellular elements of the subarachnoid space promote ALL survival during chemotherapy. *Leuk Res*. 2011;35(6):705-11.
20. Gaynes JS, Jonart LM, Zamora EA, Naumann JA, Gossai NP, Gordon PM. The central nervous system microenvironment influences the leukemia transcriptome and enhances leukemia chemoresistance. *Haematologica*. 2017;102(4):e136-e9.
21. Kato I, Nishinaka Y, Nakamura M, Akarca AU, Niwa A, Ozawa H, et al. Hypoxic adaptation of leukemic cells infiltrating the CNS affords a therapeutic strategy targeting VEGFA. *Blood*. 2017;129(23):3126-9.
22. Yadin D, Knaus P, Mueller TD. Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;27:13-34.
23. Ning J, Zhao Y, Ye Y, Yu J. Opposing roles and potential antagonistic mechanism between TGF-beta and BMP pathways: Implications for cancer progression. *EBioMedicine*. 2019;41:702-10.

24. Zhang L, Ye Y, Long X, Xiao P, Ren X, Yu J. BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination. *Oncotarget*. 2016;7(47):78206-18.
25. Weller RO, Sharp MM, Christodoulides M, Carare RO, Mollgard K. The meninges as barriers and facilitators for the movement of fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS. *Acta Neuropathol*. 2018;135(3):363-85.
26. Trujillo A, McGee C, Cogle CR. Angiogenesis in acute myeloid leukemia and opportunities for novel therapies. *J Oncol*. 2012;2012:128608.
27. Eisenkraft A, Keidan I, Bielorai B, Keller N, Toren A, Paret G. MCP-1 in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2006;30(10):1259-61.
28. Jaime-Perez JC, Gamboa-Alonso CM, Jimenez-Castillo RA, Lopez-Silva LJ, Pinzon-Uresti MA, Gomez-De Leon A, et al. TNF-alpha increases in the CSF of children with acute lymphoblastic leukemia before CNS relapse. *Blood Cells Mol Dis*. 2017;63:27-31.
29. Heidari N, Saki N, De Filippis L, Shahjehani M, Teimouri A, Ahmadzadeh A. Central nervous system niche involvement in the leukemia. *Clin Transl Oncol*. 2016;18(3):240-50.
30. Krull KR, Brinkman TM, Li C, Armstrong GT, Ness KK, Srivastava DK, et al. Neurocognitive outcomes decades after treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the St Jude lifetime cohort study. *J Clin Oncol*. 2013;31(35):4407-15.
31. Hearps S, Seal M, Anderson V, McCarthy M, Connellan M, Downie P, et al. The relationship between cognitive and neuroimaging outcomes in children treated for acute lymphoblastic leukemia with chemotherapy only: A systematic review. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(2):225-33.
32. Vercellino M, Votta B, Condello C, Piacentino C, Romagnolo A, Merola A, et al. Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study. *J Neuroimmunol*. 2008;199(1-2):133-41.
33. Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Inaba M, Li M, Shi M, Kawamura N, et al. Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus. *Brain Behav Immun*. 2013;29:82-97.
34. Nataf S, Strazielle N, Hatterer E, Mouchiroud G, Belin MF, Gherzi-Egea JF. Rat choroid plexuses contain myeloid progenitors capable of differentiation toward macrophage or dendritic cell phenotypes. *Glia*. 2006;54(3):160-71.
35. LeBleu VS, Kalluri R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis Model Mech*. 2018;11(4).
36. Entrena A, Varas A, Vazquez M, Melen GJ, Fernandez-Sevilla LM, Garcia-Castro J, et al. Mesenchymal stem cells derived from low risk acute lymphoblastic leukemia patients promote NK cell antitumor activity. *Cancer Lett*. 2015;363(2):156-65.
37. Jacamo R, Chen Y, Wang Z, Ma W, Zhang M, Spaeth EL, et al. Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF-kappaB mediates chemoresistance. *Blood*. 2014;123(17):2691-702.
38. Takam Kamga P, Dal Collo G, Midolo M, Adamo A, Delfino P, Mercuri A, et al. Inhibition of Notch Signaling Enhances Chemosensitivity in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res*. 2019;79(3):639-49.
39. Zhao X, Liu J, Peng M, Liu J, Chen F. BMP4 is involved in the chemoresistance of myeloid leukemia cells through regulating autophagy-apoptosis balance. *Cancer Invest*. 2013;31(8):555-62.
40. Shalapur S, Hof J, Kirschner-Schwabe R, Bastian L, Eckert C, Prada J, et al. High VLA-4 expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse. *Haematologica*. 2011;96(11):1627-35.
41. Caltabiano R, Puzzo L, Barresi V, Ieni A, Loreto C, Musumeci G, et al. ADAM 10 expression in primary uveal melanoma as prognostic factor for risk of metastasis. *Pathol Res Pract*. 2016;212(11):980-7.
42. Eixarch H, Calvo-Barreiro L, Montalban X, Espejo C. Bone morphogenetic proteins in multiple sclerosis: Role in neuroinflammation. *Brain Behav Immun*. 2018;68:1-10.
43. Wu DH, Hatzopoulos AK. Bone morphogenetic protein signaling in inflammation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(2):147-56.
44. Helbing T, Arnold L, Wiltgen G, Hirschbihl E, Gabelmann V, Hornstein A, et al. Endothelial BMP4 Regulates Leukocyte Diapedesis and Promotes Inflammation. *Inflammation*. 2017;40(6):1862-74.

## *Summary*

---

45. Shijo T, Warita H, Suzuki N, Ikeda K, Mitsuzawa S, Akiyama T, et al. Antagonizing bone morphogenetic protein 4 attenuates disease progression in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2018;307:164-79.
46. Newman JH, Augeri DJ, NeMoyer R, Malhotra J, Langenfeld E, Chesson CB, et al. Novel bone morphogenetic protein receptor inhibitor JL5 suppresses tumor cell survival signaling and induces regression of human lung cancer. *Oncogene*. 2018;37(27):3672-85.

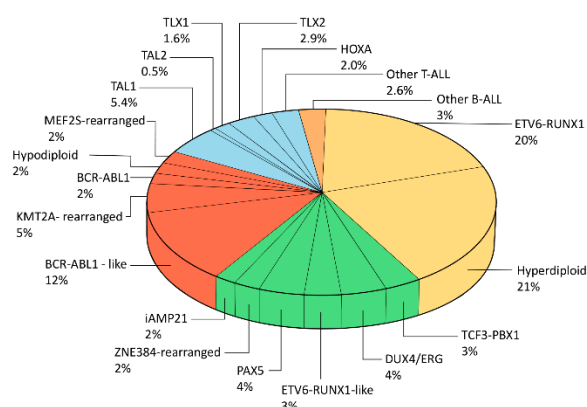
# INTRODUCCIÓN



## 1. Leucemia linfoblástica aguda. Diagnóstico y tratamiento

Las leucemias agudas son el tipo de neoplasias malignas más frecuentes en la población infantil constituyendo alrededor de un 30% de los casos registrados. Entre ellas, el subtipo más común es la leucémica linfoblástica aguda (LLA) que supone el 78,4% de los tumores hematológicos diagnosticados en este grupo poblacional según el último Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP) y constituye la primera causa de muerte por enfermedad en la infancia. Con un pico máximo de incidencia entre 2-5 años, las tasas de supervivencia de pacientes pediátricos han incrementado desde el 10% en los años 60 hasta superar el 80% en la actualidad, debido, fundamentalmente, a la mejora de las estrategias terapéuticas a lo largo de los últimos años.

La LLA se caracteriza por la presencia de una serie de alteraciones genéticas, entre ellas alteraciones cromosómicas como hiperdiploidías, hipodiploidías y mutaciones somáticas o germinales en las células hematopoyéticas más o menos diferenciadas de la médula ósea que les confieren una capacidad de autorrenovación indefinida o les impiden continuar su proceso de diferenciación celular, alterando así el desarrollo hematopoyético normal<sup>1,2</sup>. En el caso de las leucemias linfoblásticas tipo B, que afectan al 85% de los pacientes pediátricos con LLA, las alteraciones genéticas identificadas incluyen cambios numéricos y estructurales (Figura 1) así como mutaciones cooperativas<sup>47</sup>. Entre estas últimas destacan mutaciones en genes implicados en el desarrollo linfoide (*IKZF1*, *PAX5*, *EBF1*), en la supresión de tumores (*CDKN2A/CDKN2B*, *PTEN* y *RB1*), en la señalización a través de receptores de citoquinas y de tirosín quinasas (*ABL1*, *CSF1R*, *FLT3*, *NTRK3*, *PDGFRB*), en la señalización RAS (*NRAS*, *KRAS* y *PTPN11*), en la regulación transcripcional (*ETV6*, *ERG*, *TBL1XR1* y *CREBBP*), así como en la modificación epigenética (*CREBBP*, *EP300*, *SETD2* y *NSD2*)<sup>48, 49</sup>. En los últimos años, se ha puesto de manifiesto además la contribución de los cambios epigenéticos, fundamentalmente la metilación del ADN, en el desarrollo de la LLA<sup>50</sup>.



**Figura 1. Alteraciones genéticas en los diferentes subtipos de LLA infantil.** Los subtipos de LLA-T se muestran en azul, en amarillo aparece el subgrupo de LLA-B de riesgo estándar, en verde las de riesgo intermedio y en rojo las de riesgo alto. El 3% restante representa las LLA-B que no están incluidas en ninguno de los otros grupos (Pui et al. 2019).

Los síntomas de la LLA son muy variados e inespecíficos. La acumulación clonal de blastos leucémicos en la médula ósea conduce a la supresión de la hematopoyesis, lo cual se manifiesta en forma de anemia,

neutropenia y trombocitopenia. Los pacientes suelen presentar también fiebre, dolores musculares y óseos, dificultades respiratorias, fatiga, hepatomegalia, hematomas y hemorragias.

El diagnóstico de la LLA se basa principalmente en la identificación, a partir de un aspirado medular, de blastos leucémicos presentes en la médula ósea. Aunque el diagnóstico incluye también un examen físico completo, análisis bioquímico de sangre y orina, así como otras pruebas clínicas (radiografías, ecografías, técnicas de resonancia magnética) es fundamental el análisis del aspirado de médula ósea y de una muestra de sangre periférica para realizar el diagnóstico biológico. Además, con el fin de evaluar la presencia de células leucémicas y el grado de afectación del Sistema Nervioso Central (SNC) en el momento del diagnóstico, se incluye una punción lumbar.

La caracterización biológica implica en primer lugar la cuantificación, mediante técnicas de microscopía óptica y citometría de flujo, del número de blastos presentes en las muestras obtenidas, así como la caracterización de los rasgos citológicos de éstos: el tamaño celular, los nucleolos, la morfología nuclear o el estado de la cromatina<sup>3</sup>. Por otra parte, la expresión de ciertos marcadores de membrana permite identificar el grado de diferenciación de las células leucémicas: pro-B, B común, pre-B y B maduras. Finalmente, el análisis genético conduce a la identificación de alteraciones genéticas, muchas de ellas asociadas al pronóstico de la enfermedad, como ocurre con el reordenamiento del gen *MLL*, asociado a un mal pronóstico, mientras que la translocación t (12;21) (p13;q22) se asocia con un elevado porcentaje de supervivencia.

A partir del estudio realizado en el momento del diagnóstico, los pacientes son clasificados en tres grupos que atienden al riesgo de recaída en la enfermedad. Esta estratificación ha sido un factor clave en la mejora de la tasa de supervivencia de los pacientes con LLA, pues permite administrar un tratamiento más adecuado a cada grupo de pacientes, asegurando un tratamiento más intensivo al grupo catalogado como de riesgo alto (RA) y reduciendo al máximo los efectos tóxicos innecesarios derivados del tratamiento en aquellos pacientes incluidos en el grupo de riesgo estándar (RE)<sup>1</sup>.

Los criterios utilizados para clasificar a los pacientes según SEHOP-PETHEMA (Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica- Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatía Maligna) son los siguientes: la edad del paciente, el número de leucocitos al diagnóstico, el inmunofenotipo de las células tumorales, la citogenética, la presencia o ausencia de infiltración en el SNC y/o testículos, la respuesta al tratamiento y la enfermedad mínima residual (EMR) en médula ósea al final de la primera fase del tratamiento (Inducción). Esta última hace referencia a la detección de niveles residuales de enfermedad en el aspirado de médula ósea cuando no hay evidencias morfológicas de ella gracias a la utilización de una técnica más sensible como la citometría de flujo o la PCR<sup>3</sup>. La EMR es uno de los factores pronóstico más importantes ya que permite identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de recaída, pues la presencia de blastos leucémicos indica que estas células han conseguido resistir a la primera fase de quimioterapia.

La estratificación de los pacientes en los distintos grupos de riesgo implica que aquellos incluidos en el grupo de RE deben reunir todos y cada uno de los criterios establecidos para este grupo. Por su parte, el cumplimiento de cualquiera de las características que definen el grupo de RA supone la inclusión del paciente en el mismo. Aquellos que no cumplan ninguno de estos dos requisitos serán incorporados en el grupo de riesgo intermedio (RI)<sup>3</sup>. De esta clasificación dependerá, por tanto, la mayor o menor agresividad del tratamiento, reservándose protocolos menos agresivos a los pacientes incluidos en el grupo de RE o RI.

El tratamiento de la LLA consta de varias fases que varían en los fármacos utilizados y en las dosis de los mismos entre los diferentes grupos de riesgo. La primera es la fase de inducción con la que se pretende eliminar la mayor parte de la carga leucémica para restaurar así la hematopoyesis. La segunda fase es la de consolidación, durante la cual se eliminan las células residuales y se sigue con una fase de reinducción. Finalmente, tiene lugar la fase de mantenimiento, con una duración de dos años. Además, todos los grupos reciben la terapia intratecal triple (TIT), que combina metotrexato, hidrocortisona y citarabina como estrategia profiláctica para controlar la afectación del SNC y reducir el riesgo de recaída<sup>4</sup>.

## 2. Recaída en la enfermedad. El Sistema Nervioso Central

A pesar de las tasas de supervivencia alcanzadas en los últimos años debido a la mejora de los tratamientos y a la adaptación de estos en función de los grupos de riesgo, un 15-20% de los pacientes pediátricos recaen tras haber alcanzado la remisión completa y su supervivencia es muy baja<sup>6</sup>.

Las recaídas pueden ocurrir en diferentes localizaciones, siendo la médula ósea la de peor pronóstico. Por otra parte, las recaídas extramedulares más frecuentes afectan al SNC y a los testículos, ambas muy habituales en niños, si bien también se han identificado recaídas en otros órganos. Además, las recaídas pueden ser aisladas o combinadas<sup>7</sup>. En el momento de la recaída, los pacientes se clasifican atendiendo a los siguientes criterios: tiempo transcurrido desde el diagnóstico, localización anatómica de la recaída e inmunofenotipo de las células leucémicas. En función de estos parámetros se ajusta el tratamiento, lo que conlleva una intensificación de la quimioterapia acompañada, en caso de un elevado riesgo de recaída o de recaídas recurrentes, del trasplante hematopoyético<sup>7,51</sup>.

Con el objetivo de identificar los mecanismos que conducen a las recaídas se han llevado a cabo diversos estudios con muestras de pacientes obtenidas tanto en el momento de diagnóstico como en el momento de la recaída. Éstos indican que las recaídas podrían originarse bien a partir de un clon quimiorresistente que ya estaría presente en el momento del diagnóstico o bien podrían surgir a partir de la adquisición de mutaciones secundarias a lo largo del tratamiento<sup>2,52-54</sup>. En este sentido Ebinger *et al.* han identificado una subpoblación de células que exhiben un estado de quiescencia y son menos sensibles a los agentes citotóxicos. Además, estas características son reversibles y dependientes del microambiente, lo que

explicaría que las células se mantuvieran en este estado, resistentes al tratamiento, en determinadas localizaciones y que al finalizar éste, fuesen capaces de reactivar su ciclo celular dando lugar a la recaída<sup>53</sup>. Otros autores, sin embargo, han detectado alteraciones genéticas nuevas en prácticamente todos los pacientes pediátricos con LLA analizados y que presentan recaída. De hecho, un 50% presentan mutaciones activadoras de genes asociadas a la ruta de señalización RAS<sup>55</sup> y un 20% presentan mutaciones en el gen *CREBBP* que, en ocasiones van acompañadas de alteraciones en *KRAS*<sup>56, 57</sup>. Por otra parte, las mutaciones somáticas de ganancia de función en el gen *NT5C2* también afectan a un 20% de estos pacientes<sup>58</sup> y mutaciones en el gen *PRPS1* son exhibidas por un 7% de los pacientes<sup>59</sup>. Finalmente, se han identificado deleciones que afectan a la expresión de diferentes genes<sup>60, 61</sup>. Todas estas alteraciones genéticas se asocian directa o indirectamente a mecanismos de resistencia a la terapia. En conjunto, estos estudios evidencian que la aparición de las recaídas podría deberse a múltiples factores biológicos, tanto intrínsecos a las células leucémicas como extrínsecos, tales como la presión ejercida por el tratamiento o el microambiente. Así, algunos autores sugieren que, en determinados nichos, las células pueden establecer interacciones con otras células y/o encontrar los factores solubles y los componentes de matriz que favorezcan el mantenimiento de un estado de quiescencia, otorgándoles cierta ventaja frente a los agentes quimioterápicos<sup>62, 63</sup>. A esto podría sumarse además, el hecho de que la concentración de los fármacos sea menor en nichos como los testículos y el SNC tal y como sugieren otros autores<sup>64-66</sup>, contribuyendo así a mantener la supervivencia de las células tumorales.

Unos de los lugares extramedulares de mayor relevancia clínica que colonizan las células leucémicas es el SNC. Los pacientes que presentan afectación leucémica en esta localización pueden experimentar síntomas como dolor de cabeza, náuseas, vómitos, irritabilidad, letargia y papiledema, derivados de un incremento de la presión intracraneal, así como derivada de la afectación de los nervios craneales y espinales<sup>67</sup>. Aunque sólo es detectable en un reducido número de casos en el momento del diagnóstico, probablemente debido a una falta de sensibilidad de los métodos de diagnóstico, las autopsias realizadas a niños con LLA por Price *et al.* en el año 1973 revelaron que en torno al 60% de los casos presentaban afectación en el SNC<sup>5</sup>. En esta misma dirección, también en los años 70 un grupo de investigadores del Hospital St Jude demostró la importancia de realizar una profilaxis en el SNC para evitar recaídas en esta localización<sup>68</sup>. A partir de ese momento comenzó a implementarse la irradiación craneal como tratamiento profiláctico para la prevención de recaídas en este sistema<sup>69</sup>. Sin embargo, las complicaciones posteriores derivadas de dicha irradiación (neoplasias secundarias, alteraciones neurocognitivas, endocrinopatías) han conducido a su sustitución por la administración intratecal de fármacos quimioterápicos. Actualmente, se administra a todos los pacientes la denominada terapia intratecal triple que incluye metotrexato, citarabina e hidrocortisona. La incorporación de la terapia dirigida al SNC junto a la quimioterapia sistémica, independientemente de la afectación de esta localización, en los protocolos de tratamiento ha sido un factor clave en la considerable reducción de la tasa de incidencia de infiltración leucémica en el SNC<sup>1, 68</sup>.

A pesar de estos avances, las recaídas en el SNC suponen todavía un 2-7% de los casos siendo ésta una de las principales causas de morbilidad y mortalidad por enfermedad en niños <sup>6, 70, 71</sup>. El hecho de que, además, en torno al 15% de los pacientes incluidos en los grupos de RE o RI recaigan indica que todavía existen factores pronóstico que se desconocen. Por otro lado, aunque los efectos son más atenuados, también se ha puesto de manifiesto que el tratamiento intratecal tiene un impacto negativo en la función neurocognitiva a largo plazo en los pacientes que sobreviven a la enfermedad, presuntamente derivado de la toxicidad producida en el SNC. Los efectos secundarios observados incluyen convulsiones, encefalopatías, problemas de memoria visual y verbal, de atención, de concentración y del procesamiento de la información, así como una reducción del coeficiente de inteligencia. Estas alteraciones cognitivas parecen estar relacionadas con cambios anatómicos en el tejido nervioso tales como modificaciones en el volumen de las áreas subcorticales de la sustancia blanca y sustancia gris relacionadas con la memoria y la atención, alteraciones en la actividad cerebral de la corteza frontal y en la conectividad de zonas asociadas al cociente intelectual, así como cambios en las redes frontoparietales <sup>30, 31, 67, 72-74</sup>. En la mayor parte de los trabajos publicados se relacionan todos estos cambios en el tejido nervioso con el tratamiento quimioterápico al que son sometidos los pacientes, sin tener en cuenta, el posible daño presente ya en el momento del diagnóstico producido como consecuencia de la propia enfermedad.

En definitiva, la identificación de nuevos marcadores que permitan identificar correctamente todos los casos, así como la comprensión de los mecanismos a través de los cuales las células penetran en el SNC y dan lugar a las recaídas, son algunos de los principales retos en la enfermedad. Estos aspectos son fundamentales para la mejora de la estrategia terapéutica, pues permitirían adaptar el tratamiento y la profilaxis en el SNC en cada caso, reduciendo al máximo los efectos secundarios derivados del tratamiento e incrementando las tasas de curación.

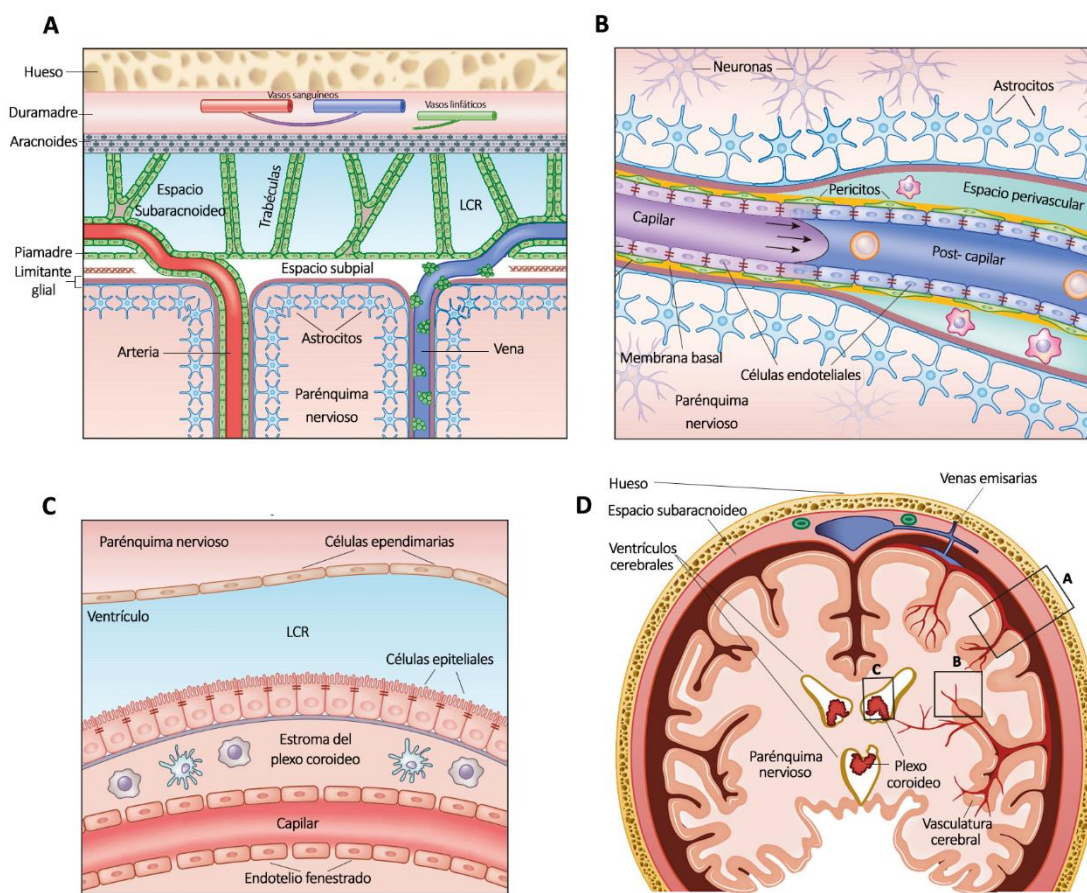
### **3. Histopatología de la LLA en el SNC**

La infiltración en el SNC durante el desarrollo de la LLA se ha descrito clásicamente como una enfermedad principalmente menígea, con afectación de la duramadre, de las leptomeninges o de ambas <sup>11</sup>. Los primeros estudios histopatológicos llevados a cabo a partir de autopsias realizadas a niños con LLA ponían de manifiesto la presencia, en la mayoría de los casos, de células leucémicas asociadas a la superficie de las trabéculas aracnoideas de tejido conjuntivo y, en ocasiones, a las paredes de las venas. El incremento del número de células daría lugar, a continuación, a la rotura de las trabéculas permitiendo la salida de las células al líquido cefalorraquídeo (LCR), colonizando así el espacio subaracnoideo y formando nódulos leucémicos. Esto conlleva la posterior invasión por parte de las células leucémicas del espacio de Virchow-Robin que acompaña a la vasculatura cerebral hacia zonas más profundas del tejido nervioso, tanto de la corteza como de la sustancia blanca, manteniéndose allí confinadas gracias a la barrera glial pial. Las células tumorales son también capaces de migrar hacia los nervios craneales, siendo común en los niños

la afectación del nervio óptico. La infiltración del parénquima se observa, sin embargo, de forma ocasional en los casos más severos. Acompañando a la invasión del SNC se han descrito otras alteraciones histológicas como gliosis reactiva, degeneración del tejido nervioso, necrosis y hemorragias, tanto en presencia como en ausencia de infiltrados leucémicos próximos<sup>5,75</sup>.

#### **4. Tráfico de las células leucémicas al SNC y mecanismos moleculares**

El mantenimiento de la homeostasis en el SNC se debe a los estrictos límites anatómicos que controlan y restringen el paso de células y moléculas entre este compartimento y la periferia. Las principales barreras encargadas de esta función son: 1) la barrera hematoencefálica (BHE), compuesta por células endoteliales especializadas que tapizan la microvasculatura cerebral controlando el paso entre el torrente sanguíneo y el tejido nervioso; 2) la barrera sangre - LCR (BSLCR), encargada de regular el movimiento de células y moléculas entre la sangre y el LCR, compuesta por el epitelio del plexo coroideo cuyas células presentan uniones estrechas<sup>8-10</sup>; y 3) la limitante glial pial, encargada de establecer el límite entre el espacio subaracnoideo y el parénquima nervioso, formada por la piamadre, los pies astrocitarios y la membrana basal interpuesta entre ellas (Figura 2). Por lo tanto, para invadir el SNC las células leucémicas procedentes de la médula ósea tienen que hacer frente a alguna de estas barreras alterando o modificando sus propiedades. Sin embargo, las rutas utilizadas y los mecanismos mediante los cuales consiguen infiltrar el parénquima nervioso no están aun completamente descritos.



**Figura 2. Representación esquemática de las barreras cerebrales. A)** Barreras que delimitan el parénquima nervioso. La limitante glial pial, formada por los pies astrocitarios, la piamadre y la membrana basal dispuesta entre ambas, establece el límite del parénquima nervioso con el espacio subaracnoideo por el que circula el LCR y acompaña a las arterias y venas que desde éste penetran en el parénquima nervioso. Las trabéculas aracnoideas atraviesan el espacio subaracnoideo conectando con la piamadre. Sobre ésta se encuentra la duramadre adyacente al hueso. **B)** Barrera hematoencefálica (BHE). Se localiza en la microvasculatura cerebral y está formada por células endoteliales unidas entre sí mediante uniones estrechas muy especializadas que tapizan los vasos y la membrana basal sobre la que se depositan. Esta membrana se forma por la fusión de la membrana basal de las propias células endoteliales, recubierta por los pericitos, y la limitante glial formada por los pies astrocitarios. A nivel de las vénulas postcapilares, se forma un espacio entre estas membranas adyacentes, el espacio perivascular o espacio de Virchow-Robin. **C)** La barrera sangre-LCR (BSLCR) del plexo coroideo. Formada por las células epiteliales unidas entre sí por uniones estrechas que tapizan el estroma del mismo y lo separan del LCR. Dicho estroma está irrigado por capilares fenestrados que carecen de BHE. **D)** Esquema de la sección coronal del cerebro en la que se representa la localización de las barreras cerebrales. (Modificado de Engelhardt et al., 2017 y Halsey, 2018)

La descripción de la localización de las células tumorales en el tejido nervioso a partir de autopsias de niños con LLA llevadas a cabo en los años 70, así como estudios realizados en un modelo xenogénico de la LLA sugieren que la infiltración leucémica se produciría a través de los senos venosos duros ya que se observan acúmulos leucémicos en sus proximidades <sup>5, 12</sup>. Sin embargo, las células leucémicas podrían llegar al LCR a través de los plexos coroideos, tal y como sugieren algunos autores al comprobar la presencia de estas células en los ventrículos cerebrales <sup>12, 13, 75</sup>. Además, esta barrera presenta mayor permeabilidad en condiciones fisiológicas, pues sus capilares se caracterizan por presentar un endotelio

fenestrado y su epitelio es atravesado habitualmente por células del sistema inmune, entre ellas linfocitos T y B<sup>9</sup>. Por otra parte, algunos autores han propuesto otra ruta alternativa que implica la colonización del espacio subaracnoideo directamente desde la médula ósea del cráneo. En este caso, las células leucémicas localizadas en la capa adventicia seguirían el recorrido de las venas emisarias<sup>14, 76</sup>.

En cuanto a los mecanismos utilizados por las células, numerosos factores y vías de señalización se han asociado a la infiltración en el SNC, producto del análisis de expresión de muestras obtenidas de pacientes pediátricos con LLA, de los estudios realizados con el modelo de ratón, así como de estudios *in vitro* llevados a cabo con líneas celulares leucémicas (Tabla 1). Algunos autores apuntan a mecanismos utilizados por otros tipos celulares, principalmente del sistema inmunológico, como posibles mediadores de la entrada de las células leucémicas al SNC. En este sentido, Buonamici *et al.* han puesto de manifiesto que las células leucémicas tipo T presentan niveles de expresión de CCR7 incrementados, una molécula fundamental en los linfocitos T de memoria CD4<sup>+</sup> presentes en el LCR cuyo ligando, CXCL19, se expresa en el epitelio del plexo coroideo<sup>77</sup>. En cuanto a las células leucémicas tipo B, aunque se ha analizado el papel de CXCR4, este parece ser independiente de la colonización del SNC<sup>78</sup>.

Por otra parte, se ha analizado el papel de las moléculas de adhesión en la colonización del tejido nervioso. Algunos trabajos que sugieren la interacción entre las células tumorales y la BHE indican que existe un regulación positiva en la expresión de la VE-cadherina y de la molécula de adhesión PECAM-1 en las líneas leucémicas tras el contacto con las células endoteliales de la microvasculatura cerebral que inducen su invasividad *in vitro*<sup>15</sup>. Otros, sin embargo, señalan a la integrina  $\alpha 6\beta 1$  (VLA-6) como la responsable del anclaje de las células a la laminina de la superficie abluminal de los vasos por los que migran desde la médula ósea al espacio subaracnoideo<sup>14</sup>. Moléculas como ICAM-1 o el ligando de la P-selectina también se han asociado con una mayor migración e invasión de las células al SNC<sup>13, 79</sup>. Del mismo modo una mayor expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 acompañada de una regulación negativa de las proteínas que forman las uniones estrechas (zonulina-1, claudina-5 y ocludina) incrementan la permeabilidad de la BHE<sup>16</sup>. Por otra parte, se ha descrito que la miosina tipo II es un factor importante en la extravasación de las células tumorales infiltrando el SNC<sup>80</sup>. Estos datos parecen sugerir que las células leucémicas utilizarían los mecanismos de extravasación leucocitaria previamente descritos para atravesar las barreras del SNC (Tabla 1).

La búsqueda de nuevos marcadores que ayuden a clasificar mejor a los pacientes al diagnóstico ha dado lugar a la identificación de diversos factores que aparecen incrementados en los blastos de los niños con LLA. El análisis de expresión génica de muestras de médula ósea de estos pacientes indican un aumento en los niveles de expresión de *IL-15*, de los receptores *IL-7R*, *CXCR3*, *CXCR4* y *CCR7* o la tirosín quinasa *ZAP70* se correlacionan con una mayor probabilidad de afectación del SNC o posteriores recaídas en esta localización<sup>81-84</sup> (Tabla 1). En algunos casos, la asociación con la infiltración del tejido nervioso se encuentra sólo en determinados grupos de pacientes. Es el caso de la tirosín quinasa Mer, cuyos niveles

de expresión elevados en muestras con la translocación t (1;19) indican afectación del SNC; así como de la expresión del antígeno NG2, un proteoglicano que induce un fenotipo más agresivo en las leucemias con el reordenamiento del gen *MLL*<sup>85,86</sup>. En línea con todo lo anterior, la detección de una composición alterada del LCR de los niños ha dado paso a la identificación de potenciales factores predictores de la diseminación de la enfermedad hacia al SNC. En este sentido, los pacientes con LLA que presentan afectación nerviosa o que recaen en el SNC tienen niveles del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFA) y de CXCL10 en el LCR significativamente superiores a los que no desarrollan esta complicación a lo largo de la enfermedad<sup>81,87</sup>(Tabla 1).

Uno de los factores que cada vez más se asocia con los distintos tipos de tumores pediátricos es la respuesta inflamatoria, la cual parece tener un papel fundamental en la progresión del tumor y en el establecimiento de las metástasis<sup>88</sup>. Por otra parte, se ha descrito en diferentes situaciones que la inflamación tanto sistémica como en el SNC es responsable de la alteración de las barreras cerebrales, incrementando la permeabilidad de las mismas y facilitando el paso de células a través de ellas. En este contexto, los pacientes pediátricos con LLA presentan altos niveles de factores pro-inflamatorios como IL-8, TNF $\alpha$ , IL-6 y CCL2 en el suero sanguíneo en el momento del diagnóstico, indicando el estatus inflamatorio que presentan antes de iniciar el tratamiento<sup>89-91</sup>. El análisis del LCR también revela un incremento significativo de algunos de estos, asociándose positivamente con el desarrollo de recaídas en el SNC, es el caso de CCL2 y TNF $\alpha$ <sup>27,28</sup>.

Si bien la descripción de los mecanismos mediante los cuales las células leucémicas penetran a los compartimentos nerviosos es fundamental para entender la biología y fisiopatología de la enfermedad, el valor clínico de estas observaciones es limitado, pues los avances conseguidos en las tasas de supervivencia de los pacientes pediátricos con LLA como consecuencia de la administración de la terapia intratecal, incluso aquellos que no presentan células leucémicas detectables en el LCR, ponen de manifiesto que las células tumorales podrían colonizar el SNC en estadios tempranos de la enfermedad en la mayoría de los pacientes. De hecho, estudios clínicos indican que en el momento del diagnóstico, el SNC está ya invadido en más del 40% de los casos<sup>92,93</sup>. En este sentido, Williams *et al.* sugieren que la capacidad para invadir el SNC es una característica universal de los blastos leucémicos al observar que, un 80% de los animales trasplantados con 29 muestras primarias LLA-B de pacientes incluidos tanto en el grupo de RA como RE y con evidencia o no de afectación del SNC, presentaban infiltración en este compartimento<sup>12</sup>. Por lo tanto, presumiblemente, las estrategias post-diagnóstico dirigidas a bloquear la entrada de las células leucémicas al SNC podrían ser poco eficaces.

Referencia	Modelo	Mediador	Efecto SNC/periferia	Efecto en proliferación y/o supervivencia
Gladdy <i>et al</i> (2003)	Ratones transgénicos RAG2 <sup>-/-</sup> p53 <sup>-/-</sup> Prkdc <sup>scid/scid</sup>	RAG-1/2	Rag1/2 induce infiltración en SNC	-
Cario <i>et al</i> (2007)	Estudio muestras pacientes	IL-15	IL-15 se asocia con infiltración en SNC	-
Jeha <i>et al</i> (2009)	Estudio muestras pacientes	t(1;19)	t(1;19) se asocia con recaídas aisladas en SNC	-
Buonamici <i>et al</i> (2009)	Modelo de ratón de T-ALL inducida por la expresión oncogénica de Notch1. Ratones Rag2 <sup>-/-</sup> IL2rg <sup>-/-</sup> trasplantados con líneas celulares humanas	Señalización CCR7-CCL19	CCR7 es necesario para la infiltración de T-ALL en el SNC	-
Akers <i>et al</i> (2010)	Estudio <i>in vitro</i> , líneas celulares LLA	VE-CADHERINA y PECAM-1	VE-cadherina y PECAM-1 promueven la adhesión y migración a través de la BHE	-
Akers <i>et al</i> (2010)	Estudio <i>in vitro</i> , líneas celulares LLA	Interacción LLA-células del SNC		La interacción LLA-células del SNC incrementa la supervivencia de la LLA protegiéndolas de los agentes quimioterápicos
Holland <i>et al</i> (2011)	Ratones SCID/beige trasplantados con la línea celular SD1	RAC2, AEP, ICAM1	Expresión de RAC2, AEP, ICAM1 combinada se asocia con afectación de SNC. También se observan cambios en periferia	No se observan cambios en proliferación entre células SD1 y células SD1 <sup>RAC2<sup>fl/fl</sup></sup>
Tang <i>et al</i> (2013)	Estudio muestras pacientes	VEGFA	Los niveles VEGFA en el LCR predicen la afectación del SNC	-
Johnson <i>et al</i> (2014)	Ratones transgénicos RAG2 <sup>-/-</sup> p53 <sup>-/-</sup> Prkdc <sup>scid/scid</sup> y RAG2 <sup>-/-</sup>	Tirosin quinasa FLT3	Sobreexpresión de FLT3 se asocia con la infiltración en SNC. También hay mayor infiltración en bazo	Mayor número de células MIRG/trfIt3 en bazo
Williams <i>et al</i> (2014)	Ratones NSG trasplantados con líneas de LLA (SD-1, SupB15, REH y SEM)	IL-15	Asociación de IL-15 con la invasión del SNC y de los LNs	IL-15 induce la proliferación de las células leucémicas
Van der Velden <i>et al</i> (2016)	Estudio muestras humanas	SPP1 y SCD	Una alta expresión de SPP1 y SCD se asocian con afectación en SNC y con posteriores recaídas en SNC	-
Krause <i>et al</i> (2015)	Ratones NSG trasplantados con muestras primarias. Estudio <i>in vitro</i> , líneas celulares LLA	Tirosin quinasa Mer	Elevada expresión de Mer se correlaciona con afectación del SNC en pacientes t(1;19)	Inhibición del ciclo celular e incremento de la supervivencia
Frishman-Levy <i>et al</i> (2015)	Ratones NSG trasplantados con muestras primarias	IL-15	Células NK activadas por IL-15 reducen infiltración en periferia. No se observan cambios en el SNC. La expresión de receptores activadores de las NKs, Nkp44 y NKG2D se asocian con afectación en SNC en pacientes	-
Gómez, AM <i>et al.</i> (2015)	Ratones NSG trasplantados con la línea celular Nalm6	CXCL10-CXCR3	El bloqueo de CXCR3 reduce la carga leucémica en médula ósea, bazo y cerebro	CXCL10 induce la supervivencia de las células leucémicas <i>in vitro</i>
Wigton <i>et al</i> (2016)	Ratones Arf <sup>-/-</sup> CS7BL/6 CD45+ trasplantados con una línea pre-B-ALL de ratón (transducida con p185Bcr-abl)	Myo11A	Myo11A está implicado en el injerto en periferia y con la infiltración del SNC	No se observan cambios
Williams <i>et al</i> (2016)	Ratones NSG trasplantados con muestras primarias	CXCR4	Los receptores de quimioquinas tienen un papel en la afectación de órganos periféricos, no en SNC	-
Munch <i>et al</i> (2017)	Ratones NSG trasplantados con muestras primarias	VEGFA	Elevados niveles de expresión de VEGFA se correlaciona con una mayor infiltración en SNC. No se observan cambios en periferia	No se observan cambios
Gaynes <i>et al</i> (2017)	Ratones NSG trasplantados con la línea celular Nalm-6. Estudio <i>in vitro</i> , cocultivos LLA-células epitelio plexo de ratón	PBX1	PBX se asocia con infiltración en SNC	No se observan cambios en proliferación
Kato <i>et al</i> (2017)	Ratones inmunodeficientes trasplantados con muestras primarias	VEGFA, genes de adaptación a hipoxia	La expresión de VEGFA se asocia con afectación del SNC	VEGFA promueve la supervivencia de las células en SNC
Alsadeq, A <i>et al.</i> (2017)	Ratones NSG o NOD/SCID trasplantados con las líneas celulares 697, REH, Jurkat ó muestras primarias	ZAP70	Una elevada expresión de ZAP70 se asocian con afectación en SNC, no tiene efectos en periferia	-
Prieto <i>et al</i> (2018)	Ratones NSG trasplantados con muestras primarias	NG2	Las células que infiltran el SNC regulan positivamente NG2	-
Yao <i>et al</i> (2018)	Ratones SCID trasplantados con Nalm6, REH o RCH-ACV. Ratones NSG trasplantados con muestras primarias o SUP-B15	Integrina $\alpha 6$	Efecto sobre SNC. El bloqueo de VLA-6 no tienen efectos en la carga leucémica en periferia	No se observan efectos ni en supervivencia ni en el ciclo celular
Alsadeq, A <i>et al.</i> (2018)	Ratones NSG trasplantados con la línea celular 697 o con muestras primarias de MO de pacientes E2A-PBX1*	IL-7R	Efecto en SNC y en periferia. El silenciamiento o bloqueo del receptor reduce la infiltración en bazo, médula ósea y SNC	El bloqueo del receptor induce la apoptosis
Portale, F <i>et al.</i>	Ratones NSG trasplantados con la línea celular 697 o Nalm6	ActivinA	Efecto en SNC y en periferia. Las células pre-tratadas con ActivinA presentan mayor capacidad para infiltrar médula ósea y SNC.	-

Tabla 1. Estudios referentes a la infiltración leucémica en el SNC. Los mediadores y sus efectos.

## 5. El microambiente del SNC en la supervivencia de la LLA

En las últimas décadas, numerosos trabajos han puesto de manifiesto la relevancia del estroma de la médula ósea en la iniciación y propagación de los tumores hematológicos. Las interacciones mutuas entre las células estromáticas y las células leucémicas son fundamentales tanto en la supervivencia, mantenimiento y proliferación de las células tumorales, como en el desarrollo de la resistencia a los agentes quimioterápicos dando lugar a las consiguientes recaídas<sup>94,95</sup>. Sin embargo, los componentes celulares y moleculares del microambiente del SNC asociados al mantenimiento y supervivencia de las células leucémicas, que otorgarían a este nicho las características de santuario, han sido escasamente explorados. Por un lado, Akers *et al.* demostraron que la interacción de líneas celulares leucémicas y diferentes tipos celulares del SNC humano (células aisladas de las meninges, astrocitos y células epiteliales del plexo coroideo) inducía, *in vitro*, la supervivencia de las células tumorales cuando éstas eran expuestas al tratamiento con diferentes quimioterápicos (metotrexato, citarabina y dexametasona)<sup>25</sup>. Sin embargo, el mecanismo responsable de estos efectos es aún desconocido. Posteriormente, se determinó que una mayor expresión de la tirosín quinasa Mer se correlaciona con una mayor resistencia de las células leucémicas a la muerte celular inducida por metotrexato en presencia de células de glioma y astrocitos de rata, a consecuencia de la activación de señales de supervivencia a través de las rutas de señalización JNK, ERK y Akt. Estos resultados se correlacionan, además, con una menor incidencia de infiltración en el SNC en animales trasplantados con muestras primarias que presentan altos niveles de expresión de la quinasa tratados con el inhibidor de la misma<sup>85</sup>. Otros autores señalan a la quimioquina CXCL10, cuyos niveles aparecen incrementados en el LCR de los pacientes, como la molécula involucrada en la inducción de quimiorresistencia frente a citarabina mediante la regulación positiva de Bcl-2 y la inactivación de las caspasas<sup>81</sup>. Por otra parte, para evaluar los cambios en el perfil de expresión génica que las células experimentan en el tejido nervioso, más recientemente se han analizado comparativamente los perfiles de expresión génica de células Nalm6 o células de muestras primarias aisladas de médula ósea y del SNC. Los genes cuya expresión se encuentra regulada positivamente en el compartimento nervioso están relacionados con rutas de señalización importantes en la biología del cáncer (MAPK, RAS, apoptosis, AKT, BMPs, FGFs), con la adaptación a condiciones de hipoxia y con la glicólisis. Por el contrario, se observa una disminución de los genes implicados en el ciclo celular o con la fosforilación oxidativa. Esto pone de manifiesto que las células que invaden el SNC modulan su perfil génico y adoptan un estado más quiescente, con un menor consumo de oxígeno y con una mayor actividad glicolítica<sup>19,20,96</sup>. Uno de los genes upregulados es *PBX1*, un factor de transcripción que parece estar implicado en la capacidad de autorrenovación y en la resistencia a los quimioterápicos de las células leucémicas aisladas del SNC<sup>19</sup>. Estas células también presentan mayores niveles de expresión de *VEGFA* y de hecho, la administración de bevacizumab, un anticuerpo neutralizante de *VEGFA*, reduce la carga leucémica en este compartimento en los animales, aunque no en periferia<sup>96</sup>. La interpretación de estos resultados obtenidos a partir de los modelos xenogénicos tiene ciertas limitaciones pues los microambientes pueden variar entre especies

siendo más o menos permisivos y, además, en ellos no se tiene en cuenta ni la presión selectiva ejercida por la terapia intratecal ni la inmunovigilancia. En este sentido, el análisis comparativo de muestras pareadas obtenidas directamente de la médula ósea y Del LCR de los pacientes con LLA demuestra que en ambos compartimentos se encuentran los mismos clones de células confirmando, como ya indicaban los modelos animales, la capacidad universal de todas las células para invadir el SNC <sup>97</sup>. Estos resultados ponen de manifiesto, además, la importancia de profundizar en el conocimiento de la interacción de las células tumorales con los componentes del SNC que promueven la adaptación, supervivencia y quimiorresistencia promoviendo, en última instancia, las recaídas en esta localización (Tabla1).

## 6. Proteínas Morfogenéticas Óseas

La familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) que, además, incluye las proteínas TGF- $\beta$ s, Activinas, Inhibinas, las proteínas Nodal, Miostatina y la hormona anti-Mülleriana <sup>98</sup>. Inicialmente aisladas a partir de matriz ósea desmineralizada e identificadas, hacia el año 1965, por su capacidad para formar hueso y cartílago de manera ectópica, actualmente, las BMPs son consideradas proteínas multifuncionales implicadas tanto en el desarrollo embrionario, regulando la formación de la asimetría derecha-izquierda, el patrón neural y esquelético, la formación de las extremidades y la organogénesis, como en el mantenimiento de la homeostasis de multitud de tejidos y órganos, pues intervienen en la regulación de varios procesos, entre ellos la proliferación, supervivencia, diferenciación, quimiotaxis, apoptosis y migración de diversos tipos celulares <sup>99-101</sup>.

Esta familia de proteínas está compuesta por más de 20 miembros que, según el grado de similitud de sus secuencias y su función, se clasifican en varios grupos: el grupo BMP-2/4, compuesto por los miembros BMP2 y BMP4 con homologías estructurales; el grupo BMP-5/6/7/8a/8b, también denominada grupo de la proteína osteogénica 1 (OP-1); el grupo de los factores de crecimiento y diferenciación GDF-5/6/7/9 (GDF-5/BMP-14/CDMP-1, GDF-6/BMP-13/CDMP-2, GDF-7/BMP-12/CDMP-3, GDF-9/BMP-13), y el grupo BMP-9/10. La distribución espacio-temporal y la actividad biológica son diferentes entre los distintos miembros de la familia BMP debido, entre otros, a que la afinidad por los distintos receptores de BMP es variable <sup>98</sup>.

Todas las BMPs se sintetizan como moléculas precursoras de gran tamaño (400-500 aminoácidos) que constan de un dominio señal en la región N-terminal que dirige su secreción, un prodominio, necesario para la dimerización, y un dominio llamado péptido maduro en la región C-terminal. Estos precursores forman dímeros activos, generalmente homodímeros, a través de enlaces disulfuro intermoleculares establecidos entre uno de los residuos de cisteína, altamente conservados, que presentan estas proteínas. A continuación, sufren la proteólisis del extremo C-terminal y son secretados como moléculas

biológicamente activas. A veces, se secretan en forma de heterodímeros, los cuales pueden ser incluso más efectivos que los homodímeros correspondientes en la activación de la vía de señalización<sup>102-106</sup>.

### 6.1 Componentes de la vía de señalización y su regulación

Los dímeros activos son los ligandos BMP que se unen y señalizan a través de los complejos transmembrana de receptores heteroméricos compuestos por receptores serín-treonín quinasa de tipo I y II. Ambos receptores presentan propiedades estructurales similares y, aunque en ausencia de los receptores tipo II los ligandos BMP se unen a los receptores tipo I, los dos tipos son necesarios para la transducción de la señal<sup>98</sup>. Una vez unido el ligando, el dominio quinasa del receptor tipo II, que se mantiene constitutivamente activo, transfosforila al receptor tipo I activándolo y permitiendo la transducción de la señal. Los receptores de las proteínas BMP son capaces de activar diferentes vías de señalización clasificadas en dos categorías: canónica y no canónica. La vía de señalización canónica, la más estudiada, es dependiente de las proteínas Smad. Tras la fosforilación del receptor tipo I, éste recluta y fosforila a las Smad reguladas por receptor BMP o BR-Smads que, a continuación, forman complejos heteroméricos o heterotetraméricos con la proteína mediadora común, la Co-Smad. Estos complejos se translocan al núcleo donde interactúan con secuencias específicas de ADN regulando la transcripción de los genes diana en cooperación con diversos factores de transcripción, co-activadores y co-represores transcripcionales<sup>21</sup> (Figura 3).

Tanto los receptores tipo I como los tipo II están formados por un dominio extracelular relativamente corto, un único dominio transmembrana y un componente intracitoplasmático que contiene el dominio serín-treonín quinasa. Aunque se han descrito 7 receptores tipo I de la superfamilia TGF- $\beta$  en mamíferos, tres de ellos son los identificados como responsables de la activación de las BR-Smad en respuesta a la unión de los ligandos BMP: los receptores de BMP tipo IA (BMPRI1A/ALK-3); los receptores tipo IB (BMPRI1B/ALK-6) y los receptores de Activina tipo IA (ActRI1A/ALK-2). Si bien las proteínas BMP presentan mayor afinidad por los receptores tipo I, ésta puede verse afectada por los receptores tipo II. Son los primeros los que condicionan el tipo de ligando que se une y los patrones de expresión y distribución varían entre los tres receptores. Así, el grupo BMP-2/4 se une preferentemente a BMPRI1A y BMPRI1B, mientras que BMP-6 y BMP-7 presentan mayor afinidad por ActRI1A. Del mismo modo, BMPRI1A tiene un patrón de expresión muy amplio, mientras que BMPRI1B está restringido a ciertos tipos celulares<sup>98, 107</sup>. En cuanto a los receptores tipo II, se han identificado tres receptores: BMPRI1I, ActRI1IA y ActRI1IB, el primero de ellos exclusivo para los ligandos BMP<sup>21</sup> (Figura 3).

La transducción de la señal BMP está mediada por las BR-Smads, SMAD1, SMAD5 y SMAD8. Estas proteínas son estructuralmente muy similares, con un dominio MH1 en la región N-terminal, implicado en la translocación al núcleo y la unión al ADN, y un dominio MH2 responsable de la interacción con los receptores y la formación de complejos con otras Smads. Sus diferencias funcionales, sin embargo, se desconocen hasta la fecha. Las BR-Smad se mantienen ancladas a la membrana celular en una

conformación autoinhibidora, en la que sus dos dominios interaccionan entre sí hasta que son fosforiladas por el receptor tipo I. Se produce entonces un cambio conformacional que facilita la unión con la única Co-Smad presente en mamíferos, la SMAD4. El complejo formado por BR-Smad y Co-Smad se transloca al núcleo y regula la transcripción génica <sup>21</sup> (Figura 3).

Entre las principales dianas de esta vía de señalización se encuentran los genes ID (*ID 1-4*) y RUNX (*RUNX1-3*), inducidos en diversos tipos celulares en respuesta a la señalización BMP. Tanto las proteínas ID como RUNX son factores fundamentales en la regulación de diferentes procesos biológicos inducidos por los ligandos BMP, entre ellos la hematopoyesis, la angiogénesis y la osteogénesis <sup>108, 109</sup>. Del mismo modo, la señalización BMP está implicada en la regulación de la transcripción de microRNAs involucrados en procesos celulares como la proliferación, diferenciación y desarrollo de diferentes tejidos y órganos <sup>110</sup>.

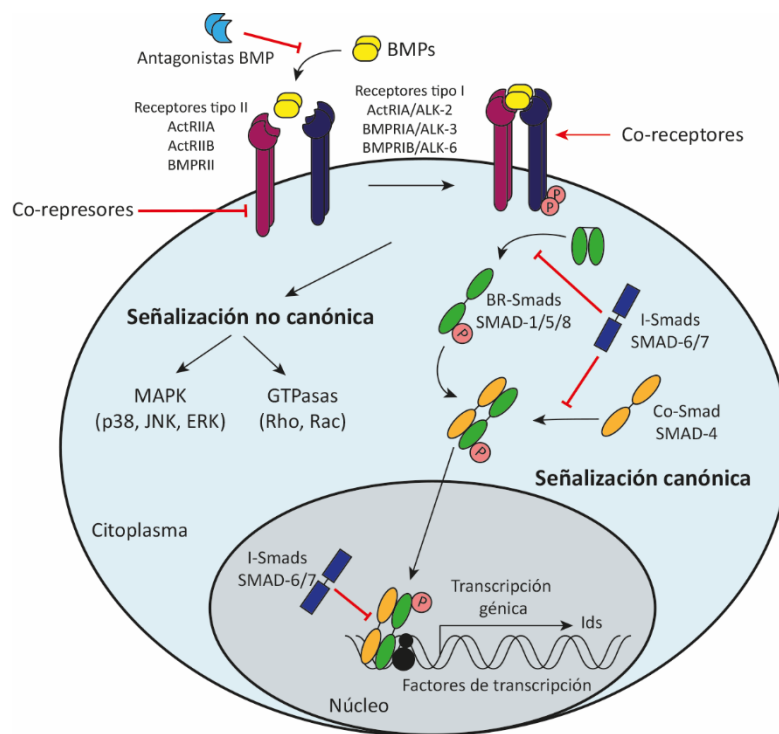
Como se indicaba anteriormente, los ligandos BMP pueden activar también rutas de señalización no canónicas, independientes de las proteínas Smad, en las que la transducción de la señal tiene lugar a través de las proteínas MAPK p38, JNK y ERK, entre otras, que activarían en último término la transcripción de NF- $\kappa$ B <sup>98, 111</sup>. También se ha descrito que las BMPs pueden transmitir su señal a través de las proteínas PI3K/Akt, y GTPasas <sup>111, 112</sup>(Figura 3).

El papel de las proteínas BMP es fundamental en números procesos celulares desde las primeras etapas del desarrollo hasta la etapa adulta, lo cual pone de manifiesto la necesidad de una estricta regulación de la señalización de estas proteínas tanto a nivel extracelular como a nivel intracelular. A nivel extracelular, los antagonistas de BMP se clasifican en tres grupos: la familia de proteínas Noggin/Chordin, Twisted Gastrulation y la familia Dan. Estos son factores solubles que se unen a los ligandos BMP con alta afinidad impidiendo su interacción con los receptores y en consecuencia la activación de la vía. La promiscuidad de estos antagonistas, la diferente afinidad entre ligandos y la capacidad para inducir respuestas no antagónicas de éstos hacen referencia a la complejidad del sistema <sup>113, 114</sup>. También se han identificado numerosos microRNAs que regulan la expresión de BMPs, de los receptores de membrana y de los antagonistas BMP<sup>115</sup>. Además, en los últimos años se ha atribuido un papel regulador de la señalización BMP a los distintos componentes de la matriz extracelular. La regulación de la señalización de los ligandos y de la activación de sus receptores depende de la composición, las propiedades bioquímicas y físicas de la matriz extracelular<sup>116</sup> (Figura 3).

A nivel de membrana, otros reguladores de BMP pueden actuar para activar o inhibir la ruta de señalización BMP, bien uniéndose a la molécula BMP o al complejo ligando-receptor. La familia de proteínas RGM o la proteína endoglina son co-receptores que regulan positivamente la intensidad de señal <sup>117, 118</sup>. Por el contrario, existen otras proteínas transmembrana que regulan negativamente la señalización BMP. Es el caso de BAMBI, un pseudorreceptor con un dominio extracelular similar al de los receptores tipo I pero carente del dominio intracelular, que interacciona con los receptores tipo I y tipo II

de manera estable bloqueando su función<sup>113, 119</sup>. Asimismo, se incluyen en este grupo de antagonistas de la señal BMP algunas tirosín quinasas como la TrkC o Ror2<sup>120, 121</sup> (Figura 3).

Finalmente, la regulación a nivel intracelular esta mediada por un tercer grupo de proteínas Smad, compuesto por SMAD6 y SMAD7, las Smad inhibidoras (I-Smad). Los mecanismos utilizados por éstas para inhibir la señalización incluyen: la unión a los receptores tipo I activados impidiendo la fosforilación de las BR-Smads<sup>122, 123</sup>; la competencia con las Co-Smad para formar complejos con las BR-Smads<sup>124</sup>, y, a nivel nuclear, el bloqueo de la formación de los complejos Smad- ADN inducida por los ligandos BMP<sup>125</sup>. Alternativamente, las I-Smad favorecen el reclutamiento de las proteínas SMURF1 y SMURF2, proteínas E3 ubiquitín ligasas encargadas de la poliubiquitinación de las SMAD1 y SMAD5 para su degradación vía proteosoma, promoviendo, por tanto, la unión de éstas a los receptores de BMP tipo I y favoreciendo la posterior degradación del complejo receptor<sup>124, 126</sup> (Figura 3).



**Figura 3. Transducción de la señal BMP.** Los ligandos BMP en su forma activa se unen a los complejos de receptor induciendo la fosforilación de los receptores tipo I a cargo de los receptores tipo II, activando la señalización BMP, bien a través de la vía de señalización canónica o mediante la vía no canónica. La ruta canónica se inicia con la fosforilación de las BR-Smads (SMAD1/5/8) por los receptores de BMP tipo I y la posterior unión a la Co-Smad (Smad4) formando un complejo que se transloca al núcleo. Allí, junto con otros factores de transcripción regulan la transcripción génica. Las proteínas I-Smads (SMAD6 y SMAD7), son proteínas encargadas de regular negativamente esta ruta. La activación de los receptores BMP también puede inducir la transducción de la señal a través de las diferentes vías no canónicas, lo que implica la activación de proteínas MAP quinasa (p38, ERK, JNK) y GTPasas (Rho, Rac). La señalización de BMP también puede ser regulada extracelularmente positiva o negativamente, a través de diferentes antagonistas y, a nivel de membrana, mediante los co-receptores y los co-represores.

### 6.2 Papel de los ligandos BMP

Inicialmente, los ligandos BMP fueron descubiertos por su capacidad para inducir la formación ectópica de hueso y cartílago. En esta línea, numerosos trabajos han descrito la capacidad de esta familia de proteínas para inducir la diferenciación osteogénica y condrogénica de células estromales mesenquimales (MSCs) dando lugar, posteriormente, a la formación del hueso y cartílago durante el desarrollo embrionario, así como su participación en procesos de reparación ósea y mantenimiento del cartílago en la etapa adulta <sup>127-129</sup>. Entre los ligandos que exhiben una mayor capacidad osteogénica se encuentran BMP2 y BMP4, mientras que BMP7 parece tener un papel fundamental en el mantenimiento del cartílago articular<sup>129</sup>. Sin embargo, con el paso de los años, una amplia variedad de funciones biológicas ha sido atribuidas a esta familia de morfógenos, más allá de la formación del hueso y cartílago. Durante la embriogénesis, los ligandos BMP participan de forma activa en la regulación de procesos esenciales como el establecimiento de la asimetría derecha-izquierda, la formación del mesodermo, del patrón neural y esquelético, el desarrollo de las extremidades, la gametogénesis y la organogénesis <sup>130</sup>. Prueba de la importancia de esta vía de señalización es que los ratones deficientes para los ligandos BMP2, BMP4, BMP7 o para los receptores BMPR1A y BMPR2 presentan un fenotipo letal consecuencia de defectos que tienen lugar en la gastrulación y la formación del mesodermo <sup>131, 132</sup>.

Asimismo, los ligandos BMP son cruciales en las etapas post-natal y adulta, durante las cuales participan en el mantenimiento de la homeostasis de diferentes órganos y sistemas regulando la proliferación, diferenciación, quimiotaxis y apoptosis de diversos tipos celulares. En este sentido, destaca su participación en procesos como la neurogénesis y la hematopoyesis <sup>133, 134</sup>.

Tras el nacimiento, la neurogénesis se mantiene principalmente en dos áreas especializadas del cerebro, la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular (SGZ)<sup>135, 136</sup>. Numerosos trabajos han puesto de manifiesto la expresión de los ligandos y receptores de la vía de señalización BMP en los progenitores neurales y otros componentes celulares de ambas zonas. Además, se ha descrito la importancia de la estricta regulación de la señalización BMP, para el mantenimiento, junto con otros factores, del balance quiescencia/proliferación en los nichos neurogénicos, pues mientras el antagonista de BMP, Noggin, es necesario para el mantenimiento de la proliferación y la autorrenovación de las células madre neurales, los ligandos BMP, fundamentalmente BMP4, promueven la quiescencia y el mantenimiento de la capacidad neurogénica <sup>134, 137-140</sup>.

Por otra parte, la familia de ligandos BMP es parte fundamental del microambiente característico de la médula ósea que mantiene y regula la hematopoyesis adulta. La vía de señalización BMP es relevante en el mantenimiento y la expansión de los progenitores hematopoyéticos, en su compromiso hacia el linaje mieloide/linfoide, así como en el control del tamaño del nicho hematopoyético. Asimismo, los ligandos BMP regulan el *homing* y la movilización de los progenitores hematopoyéticos. Sin embargo, los efectos individuales de cada componente varían en función de las interacciones con otros factores del

microambiente y los efectos de éstos, del grado de diferenciación celular, de la concentración, así como de su producción autocrina o paracrina. Así, mientras bajas concentraciones de BMP4 inducen la diferenciación de los progenitores, altos niveles inhiben su proliferación y diferenciación<sup>141-144</sup>.

Las numerosas evidencias de la participación de los componentes de la vía de señalización BMP en multitud de procesos biológicos justifica que un gran número de patologías de origen variable se asocien a alteraciones en esta vía, entre ellas los procesos tumorales.

### 6.3 BMPs y cáncer

A lo largo de los últimos años, el número de trabajos que asocian alteraciones de los diferentes componentes de la vía de señalización BMP con procesos tumorales se ha ido incrementado de manera progresiva. A su función anteriormente descrita, tanto durante el desarrollo como en otros procesos biológicos en etapas posteriores, se añade el papel que los ligandos BMP parecen jugar en la progresión de tumores, así como en procesos metastásicos. Los datos disponibles hasta la fecha, principalmente procedentes de tumores sólidos, ponen de manifiesto un papel dual de esta vía de señalización, habiéndose descrito efectos tanto pro-tumorales como anti-tumorales asociados a ella. Aunque estos resultados pueden parecer contradictorios, son un claro reflejo de la complejidad de la vía, pues un mismo componente puede tener uno u otro efecto dependiendo del tipo de tumor, del estadio, de la recurrencia del mismo o del microambiente tumoral<sup>23, 145</sup>.

Algunos trabajos describen una expresión aberrante de los ligandos BMP en distintos tipos de cáncer y lo asocian con un buen o mal pronóstico en función de la progresión de éste y la supervivencia de los pacientes. Así, BMP2 y BMP4 aparecen sobreexpresados en un amplio número de tumores. En ocasiones, estas proteínas se relacionan con acciones específicas en la biología tumoral, tales como la proliferación, angiogénesis, viabilidad, migración y diferenciación<sup>146-149</sup>. Del mismo modo, la modulación de los receptores BMP localizados en la membrana plasmática puede conducir a una mayor unión de los ligandos BMP o viceversa, induciendo alteraciones en las funciones celulares, como ocurre en algunos tipos de neoplasias<sup>145, 150, 151</sup>. También se han descrito alteraciones asociadas a otros componentes implicados en la transducción de la señal, como ocurre con la expresión reducida de las BR-Smads y las Co-Smads en el cáncer colorrectal<sup>145, 150-152</sup>. Aunque los mecanismos que conducen a la regulación positiva o negativa de uno o varios componentes de la señalización BMP aún no se han descrito completamente, existen evidencias que asocian mutaciones, polimorfismos de un solo nucleótido y microRNAs con dichas alteraciones<sup>22, 153</sup>. Otros trabajos describen diferentes grados de metilación como los responsables de las alteraciones observadas, implicando generalmente la inactivación de diferentes genes de la vía BMP, como ocurre con la pérdida de expresión de *BMP2* en el carcinoma renal o con el silenciamiento de *SMAD8* en el cáncer de mama y de colon<sup>154, 155</sup>.

En cuanto a los tumores hematológicos, aunque el papel de la señalización BMP ha sido menos estudiado, modificaciones en los diferentes elementos de esta ruta también parecen estar implicadas en su mantenimiento, progresión y en posteriores recaídas <sup>156-159</sup>. De nuevo, altos niveles de expresión de *BMP2*, *BMP4* y en menor medida *BMP7*, se asocian con algunas de estas patologías <sup>157, 160, 161</sup>. Además, en estos tumores se han descrito alteraciones en la expresión de los receptores de BMP. Las células tumorales de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) exhiben mayores niveles de expresión de BMPRII <sup>160</sup>, del mismo modo que en la leucemia linfocítica crónica tipo B (LLC-B), niveles incrementados de los receptores BMPRII/BMPRII se correlacionan con la progresión de la enfermedad, sugiriendo un efecto inductor de la proliferación <sup>162</sup>. Por el contrario, el análisis de los receptores de la vía en las células de pacientes con leucemias agudas (Leucemia mieloide aguda (LMA) y LLA) ha puesto de manifiesto que, en estos tumores, niveles altos de *BMPRII*, *BMPRII* y *BMPRII* se asocian a mayores tasas de supervivencia y de remisión completa y, a un menor riesgo de recaída <sup>163</sup>. Más allá de los cambios identificados en los receptores de membrana, también se han encontrado alteraciones en las proteínas transductoras de la señal BMP, de hecho, una regulación positiva de las BR-smads (SMAD1 y SMAD8) se correlaciona con una menor expresión de SMAD4 en pacientes con LLC, asociándose con un mal pronóstico de la enfermedad <sup>164</sup>. Por el contrario, en pacientes con LMC, las células tumorales presentan niveles de SMAD1 y SMAD8 significativamente menores que los controles sanos, lo que se traduce en importantes cambios en la expresión de los genes diana <sup>160</sup>. Por otra parte, algunos trabajos han descrito la implicación de algunos reguladores negativos de la vía BMP, tanto intracelulares como extracelulares. Así, los efectos apoptóticos de BMP7 descritos en las células de linfoma tipo B se contrarrestan con una sobreexpresión de la I-smad SMAD7 en estas células que inhibe la señalización a través de SMAD1/5/8 <sup>165, 166</sup>. Esta sobreexpresión también se ha observado en células leucémicas tipo T <sup>167</sup>. Sin embargo, en otros tumores, como la leucemia mieloide, aparecen regulados positivamente SMAD6 y el antagonista Gremlin, asociados al mantenimiento de las células madre leucémicas y al avance de la enfermedad <sup>160</sup>.

En paralelo a los estudios del estado de la vía de señalización BMP en las células tumorales, se han desarrollado trabajos dirigidos a estudiar las modificaciones de la vía en el resto de los componentes del nicho tumoral, evaluando así la influencia que éstos tienen en el desarrollo y la evolución de la enfermedad <sup>156</sup>. En este contexto, Laperrousaz *et al.* han descrito un aumento de los niveles de BMP2 y BMP4 en la médula ósea de pacientes con LMC en fase crónica. Éstos están producidos por distintos componentes del estroma y parecen favorecer el mantenimiento y la expansión de las células tumorales <sup>160</sup>. Por el contrario, en la leucemia mieloide aguda, los ligandos BMPs son producidos por las propias células leucémicas que inducen, mediante la activación de la señalización canónica de BMP, la diferenciación osteogénica de las MSCs que secretan factores de crecimiento que promueven la proliferación de las células tumorales <sup>168, 169</sup>. Además, en este contexto, estudios realizados por nuestro grupo ponen de manifiesto que las MSCs de la médula ósea de pacientes pediátricos de LLA presentan

una elevada producción BMP4 en el momento del diagnóstico que se reduce progresivamente tras el tratamiento quimioterápico <sup>170</sup>.

En relación con todos estos cambios que sufre el microambiente en el contexto tumoral, a lo largo de la última década han emergido trabajos que apuntan a los componentes de la ruta de señalización BMP como factores fundamentales en el desarrollo de un microambiente protector que contribuye al desarrollo de resistencia frente a la quimioterapia, favoreciendo las recaídas. En el caso de las neoplasias hematológicas, dada la importancia del microambiente de la médula ósea y el papel que esta vía de señalización tiene en el mantenimiento del mismo, no es sorprendente que alteraciones en estos componentes conduzcan al establecimiento de un microambiente adecuado para la progresión del tumor y el desarrollo de resistencia a la quimioterapia de las células tumorales. En este sentido, Dosen-Dahl *et al.* demostraron que el tratamiento de células de LLA con BMP6 las protegía de la muerte celular inducida por citarabina <sup>171</sup>. Algunos trabajos indican que los pacientes de LMC resistentes a la terapia presentan una elevada producción de BMP4 por parte de las MSCs y altos niveles de expresión de BMPRII en las células leucémicas. Ambas alteraciones parecen ser responsables de la supervivencia de las células tumorales escapando así a los efectos de la quimioterapia a través de un mecanismo que implica la sobreexpresión de *TWIST-1*, previamente identificado como un factor predictivo de la resistencia al tratamiento en estos pacientes <sup>158, 172</sup>. Otros, sin embargo, señalan que la quimioprotección ofrecida por las células estromales requiere del contacto célula- célula y es dependiente de la vía de señalización BMP canónica <sup>173</sup>. En el contexto de la leucémica promielocítica aguda, se ha descrito que en la resistencia al tratamiento con ácido trasnretinoico están implicadas las proteínas BMP2, BMP4 y BMP6 que inducen la regulación positiva de genes que bloquean la diferenciación, como *ID1* e *ID2* <sup>174</sup>.

En conjunto, estos estudios ponen de manifiesto la implicación de la vía de señalización BMP en diversos procesos tumorales, con un papel tanto pro-tumoral como anti-tumoral, y apuntan, por un lado, a los distintos componentes de la vía como potenciales factores pronósticos de la enfermedad y, por otro, a la regulación de esta vía de señalización como posible diana terapéutica.



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La infiltración de células leucémicas en el SNC representa uno de los principales desafíos clínicos en el tratamiento y la remisión definitiva de la LLA. En este sentido, los regímenes contemporáneos de tratamiento se dirigen tanto a la enfermedad sistémica como a la del SNC, independientemente de la participación del SNC en el diagnóstico. Estos protocolos han conducido a un control efectivo de la enfermedad, también en el SNC, reduciéndose en éste la incidencia de la misma de forma muy notable<sup>1, 68, 175, 176</sup>. A pesar de todo ello, la recaída en el SNC sigue siendo la causa más importante de morbimortalidad, ya que ocurre entre el 2 y el 7 % de los pacientes con LLA (más del 30% de todas las recaídas). Por tanto, como hemos señalado, este es uno de los principales desafíos en la oncología pediátrica, debido a las bajas tasas de curación y a los efectos secundarios del tratamiento a largo plazo<sup>71</sup>. Definir los mecanismos que dirigen el tráfico de células leucémicas desde la sangre a este compartimento es relevante para comprender la biología y la fisiopatología de la leucemia. Sin embargo, las observaciones clínicas y experimentales sugieren un valor pronóstico y terapéutico relativamente limitado de estos datos en cuanto a la recaída de la LLA en el SNC. En este sentido, a pesar de que la infiltración del SNC rara vez se detecta en el diagnóstico inicial debido, fundamentalmente, a las limitaciones de los métodos empleados para ello, la quimioterapia intratecal profiláctica dirigida al SNC es necesaria para la supervivencia libre de enfermedad (50-75% de los pacientes de LLA presentaban metástasis en SNC antes del desarrollo de dichas terapias<sup>5, 175</sup>) indicando la existencia de manifestación subclínica ya en el momento del diagnóstico en un elevado porcentaje de pacientes<sup>92, 177</sup>. Si bien hay cierta controversia, tampoco parece que sean determinados clones los que adquieran esta capacidad<sup>12, 19</sup>. Así, la composición de células leucémicas en el SNC es policlonal y similar a las del fémur o el bazo indicando, que el tropismo hacia el SNC es probablemente una característica omnipresente en blastos LLA<sup>12</sup>. En la misma línea, resultados obtenidos utilizando el modelo xenogénico de LLA indican que hasta el 80% de los ratones trasplantados con muestras primarias de pacientes con LLA-B presentan células tumorales en el SNC a pesar de que la mayoría de las muestras de leucemia procedían de pacientes con resultado negativo en el análisis del LCR<sup>12</sup>.

En conjunto, estas observaciones sugieren que las células de LLA que son refractarias a la terapia o particularmente receptivas a señales protectoras derivadas del microambiente donde se localizan, pueden sobrevivir en nichos del SNC durante períodos prolongados como EMR extramedular y ser responsables de la recaída en el SNC, sin tener que involucrar necesariamente a la médula ósea (recaída aislada en el SNC<sup>178</sup>).

Por todo ello, se hace necesario estudiar las posibles localizaciones de las células leucémicas en el SNC que les sirven de santuario, permitiéndolas sobrevivir a la quimioterapia y a la respuesta inmune del paciente, una cuestión que, en el caso de la LLA, a día de hoy no ha sido desentrañada. En este sentido, conocer las interacciones que, en dichos nichos, establecen las células leucémicas y las células del SNC, así como el resultado de las mismas, puede resultar fundamental tanto para abordar los nuevos tratamientos en fase de ensayo clínico como para desarrollar, en un futuro, nuevas estrategias

terapéuticas más efectivas a la hora de controlar la EMR extramedular. Por otra parte, todos los trabajos que analizan la condición neurológica de los pacientes de LLA a lo largo de la vida atribuyen las alteraciones encontradas al tratamiento quimioterápico, siendo muy pocos los trabajos que recogen el daño en el SNC producido directamente por la propia infiltración leucémica en un cerebro aún en desarrollo (pacientes pediátricos) y, cuyos efectos no serán anulados con la reducción de los efectos secundarios de la actual quimioterapia intratecal.

A tenor de lo anterior, los objetivos del presente trabajo son:

1. Estudiar la localización de las células leucémicas en el SNC en un modelo animal de LLA.
2. Evaluar los cambios histológicos y funcionales en el SNC como consecuencia de la infiltración leucémica abordando sus efectos en la neurogénesis.
3. Analizar el plexo coroideo como nicho para células leucémicas.
4. Evaluar la relevancia de BMP4 y su vía de señalización en la infiltración leucémica.
5. Validar prospectivamente el valor pronóstico de BMP4 y el estado de la vía canónica de señalización de BMP4 en los blastos leucémicos en niños diagnosticados de LLA.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Muestras de pacientes

Las muestras primarias utilizadas en este estudio proceden del aspirado de médula ósea de pacientes pediátricos diagnosticados de LLA, sin hacerse, en ningún caso, extracciones adicionales. Las muestras han sido proporcionadas por el Hospital Niño Jesús de Madrid con la participación del Grupo de Estudios Biológicos de la LLA infantil que agrupa a todos los laboratorios españoles dedicados al diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad. El presente estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Niño Jesús de Madrid y, en todos los casos se obtuvo el consentimiento informado previo de padres o tutores.

Para los estudios de expresión génica, se han analizado un total de 174 muestras procedentes de tres centros diferentes, el Hospital Universitario Niño Jesús de Madrid, el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona y el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia. Las características de los pacientes están recopiladas en las (Tablas 2 y 3).

Grupo	n	%
Niños	93	53,14
Niñas	82	48,86
LLA-B	145	82,86
LLA-T	29	16,57
Riesgo no alto	146	83,43
Riesgo alto	29	16,57
EMR- (día 33)	93	79,49
EMR+ (día 33)	24	20,51
No recaída	153	87,43
Recaída	22	12,57
Vivos	167	95,43
Fallecidos	8	4,57

**Tabla 2. Características de los pacientes de LLA. Mediana de seguimiento 1322 días.**

Grupo	n	%
Niños	67	54,92
Niñas	55	45,08
LLA-B	122	100
EMR- (día 33)	72	88,89
EMR+ (día 33)	9	11,11
No recaída	107	87,7
Recaída	15	12,3
Vivos	118	96,72
Fallecidos	4	3,28

Tabla 3. Características de los pacientes de LLA-B del grupo de riesgo no alto. Mediana de seguimiento 1322 días.

## 2. Estudios in vivo

### 2.1 Animales de experimentación

Para el desarrollo del presente trabajo se han utilizado ratones inmunodeficientes NSG (NOD.Cg-Prkdc scid IL2rg tm1Wjl /SzJ) y ratones C57/BL6 de entre 8 y 12 semanas suministrados por Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EE.UU) y mantenidos en el animalario del CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas) y en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) en un ambiente libre de patógenos en el caso de los ratones inmunodeficientes, y en condiciones estándar de humedad y temperatura, con acceso libre a comida y agua, así como ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos animales han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad Complutense de Madrid y de la Comunidad de Madrid.

### 2.2 Modelo xenogénico de leucemia linfoblástica aguda

Para el establecimiento del modelo xenogénico de LLA, los ratones NSG fueron trasplantados con  $0.5-5 \times 10^6$  células de muestras primarias de leucemia linfoblástica aguda (Tabla 4) o células de la línea celular Nalm6 mediante inyección intravenosa en la vena de la cola. En los casos en los que se indica, las células fueron marcadas con CFSE antes del trasplante. El injerto de las células leucémicas se comprobó mediante el análisis, por citometría de flujo, de la presencia de éstas en sangre periférica semanal o quincenalmente, según el diseño experimental. A continuación, los ratones fueron monitorizados regularmente hasta la aparición de síntomas clínicos (pelo erizado, aturdimiento, letargo, parálisis) que determinaron el momento de eutanasia mediante dislocación cervical. En los casos en los que se indica, los animales fueron sacrificados antes de la aparición de esta sintomatología.

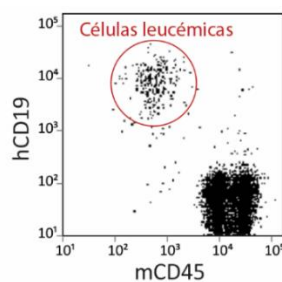
Paciente	Fenotipo	Sexo	Blastos (%)	Riesgo	Afectación SNC	EMR	Recaída	SLE (días)
1	B	F	90	Alto	-	+	+	280
2	B	F	90	No alto	-	-	-	2592
3	B	M	90	No alto	-	-	-	2920
4	B	M	95	Alto	-	+	-	2555
5	B	M	90	No alto	-	-	-	2957
6	B	M	90	No alto	-	-	-	1280
7	B	M	95	No alto	-	-	-	1277
8	B	F	90	No alto	-	-	-	1095
9	B	M	95	No alto	-	-	-	1058
10	B	M	95	No alto	-	-	-	620
11	B	M	90	-	-	-	+	1004

**Tabla 4. Características de los pacientes de LLA-B cuyas células fueron utilizadas en el modelo xenogénico de LLA.**  
SLE: Supervivencia libre de enfermedad.

### 2.3 Recolección de muestras biológicas

Para comprobar el injerto de las células leucémicas, así como para hacer un seguimiento de la enfermedad, se extrajeron periódicamente muestras de sangre de unos 100 µl mediante punción en la vena de la cola. Esto se llevó a cabo utilizando una cámara de metacrilato como medio de sujeción que, además, facilitaba la exposición de la cola. A continuación, las células fueron marcadas con dos anticuerpos, uno frente a la molécula CD45 de ratón (Ly5.1) y otro frente al antígeno CD19 de las células humanas, distinguiendo así las células sanguíneas del ratón y las células leucémicas humanas que habían injertado como se muestra en la Figura 4.

Antes de ser sacrificados, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (50mg/kg) y medetomidina (0,5mg/kg) para proceder, a continuación, a la obtención de sangre periférica mediante un corte en la vena subaxilar. En algunos casos, los animales fueron perfundidos con tampón fosfato 0,1M (PBS) seguido de una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. A continuación, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se extrajeron: el fémur de ambas patas para la posterior extracción de la médula ósea, el bazo y el cerebro. De todos ellos se llevó a cabo el consiguiente análisis histológico y/o por citometría de flujo.



**Figura 4. Cuantificación del porcentaje de injerto (células hCD19<sup>+</sup> mCD45<sup>-</sup>) en sangre periférica.**

### 2.4 Obtención de suspensiones celulares a partir de tejido

Las muestras de cerebro extraídas de los animales fueron disgregadas, en la mayor parte de los casos, mecánicamente con el émbolo de una jeringa estéril y la suspensión celular resultante filtrada a través de una membrana porosa (40µm de diámetro del poro). En los casos en los que se llevó a cabo el estudio del nicho neurogénico de la SVZ, tanto el cerebro como la SVZ fueron disgregados utilizando un kit comercial de disociación de tejido neural según las recomendaciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Brevemente, el tejido fue troceado y digerido en una solución con tripsina-EDTA (0,1mM) (Lonza) con la ayuda de un disociador (GentleMACS Octo Dissociator, Miltenyi Biotec). Una vez filtrada la muestra, las células muertas fueron eliminadas (Dead Cell Removal Kit; Miltenyi Biotec). En los casos en los que se pretendía excluir del análisis las células que se depositan sobre la superficie cerebral pero que no habían penetrado en el parénquima, los cerebros fueron sometidos a varios lavados con PBS - ácido etildiamino tetraacético (5mM) (PBS-EDTA) antes de ser disgregados.

En cuanto a los bazos, una vez extraídos eran disgregados mecánicamente con un homogenizador tipo Potter. Por su parte, las células procedentes de médula ósea se obtuvieron a partir del fémur. Para ello, las epífisis del hueso fueron eliminadas mediante un corte, permitiendo así la entrada de una jeringa por uno de los extremos hacia la cavidad medular del hueso. El contenido de ésta (PBS 1%EDTA 1%BSA) se vació en el interior del hueso para lavar el mismo y posteriormente, recoger la suspensión celular obtenida a través del extremo contrario del hueso.

Las suspensiones celulares obtenidas, fueron filtradas y utilizadas para determinar el porcentaje de infiltración leucémica en cada uno de los órganos, así como para realizar el estudio fenotípico de las poblaciones celulares infiltrantes mediante citometría de flujo.

### 2.5 Administración subcutánea de tratamientos

La administración *in vivo* de DMH1 (Tocris, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), un inhibidor de la señalización canónica de BMP o su vehículo, DMSO, se llevó a cabo mediante la implantación de bombas microosmóticas (ALZET, modelo 1002) que permitían la liberación diaria del tratamiento a un flujo constante de 0,25µl/hora durante 14 días. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, las bombas se cargaron el día anterior al implante y se mantuvieron durante 12 horas en una solución salina a 37 °C para equilibrarlas y asegurar la correcta liberación del tratamiento.

Antes de la implantación, los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina (50mg/kg) y medetomidina (0,5mg/kg) inyectada intraperitonealmente y se les aplicó lubricante oftalmológico para evitar el daño ocular. Tras rasurar la zona y esterilizarla, se realizó una pequeña incisión en la zona media interescapular y se separó la piel del tejido conjuntivo para poder insertar la bomba en posición subcutánea. Finalmente, se suturó la piel, se administró atipamezol (0,5mg/ml) para revertir la anestesia

y los animales fueron depositados en una cama calefactora con el objetivo de mantener la temperatura corporal y evitar la hipotermia hasta su completa recuperación.

Los animales fueron tratados con 3mg/kg de DMH1 al día. En los casos en los que se indica, el inicio del tratamiento tuvo lugar una vez detectado el injerto y se mantuvo hasta el momento de la eutanasia, determinado por la aparición de síntomas clínicos en los individuos del grupo control. Transcurridos 14 días después del implante, las bombas subcutáneas fueron sustituidas por nuevas bombas previamente cargadas para asegurar el mantenimiento del tratamiento. En ocasiones, sin embargo, estos dispositivos subcutáneos se implantaron 3 días antes del trasplante de las células leucémicas, manteniéndose de nuevo hasta el momento en el que los animales fueron sacrificados, 16 horas después de la infusión.

## **2.6 Administración intra-cerebroventricular de tratamientos (ICV)**

Una vez comenzaban a detectarse los primeros síntomas clínicos en los animales que estaban desarrollando la enfermedad, el inhibidor DMH1 (3,5mg/ml) o su diluyente, DMSO, así como los mismos fármacos utilizados en la TIT como parte del protocolo de tratamiento de los pacientes pediátricos, se administraron a los ratones mediante inyección intra-cerebroventricular. Los fármacos utilizados fueron: metotrexato (3,2mg/ml; Pfizer, Nueva York, NY, EEUU), citarabina (6,4 mg/ml; Pfizer, Nueva York, NY, EEUU), e hidrocortisona (10mg/ml). Por su parte, el grupo control recibió el mismo volumen de solución salina (0,09% NaCl). Para ello, los animales se colocaron en un estereotáxico (KOPF Instruments, EE.UU.) y se mantuvieron anestesiados con una mezcla de isoflurano en oxígeno (5% inducción, 1-3% mantenimiento) a lo largo de toda la cirugía. La piel de la zona superior al cráneo fue rasurada y desinfectada antes de realizar una incisión anteroposterior que dejase éste al descubierto. En cada animal se calcularon las coordenadas correctas para realizar la inyección en el ventrículo lateral, usando el Bregma como referencia (antero-posterior = -0.58, medio-lateral = +1 y dorso-ventral = -2.3). Una vez localizadas éstas, se realizó un orificio para permitir la entrada de una jeringa Hamilton (32G) y proceder a la administración del tratamiento en un volumen de 2µl y a una velocidad controlada de 0,2µl/min. Durante todo el proceso, la temperatura corporal del ratón fue monitorizada para asegurar que se mantenía dentro de un rango apropiado. Una vez finalizada la inyección, se suturó la piel y los animales se depositaron en una cama calefactora hasta su completa recuperación. Los animales fueron sacrificados 48 horas después de la administración del tratamiento y sus órganos procesados para el análisis histológico y por citometría de flujo.

## 2.7 Tests de comportamiento

### 2.7.1 Test de la cuerda transversal

La evaluación de los déficits funcionales en la coordinación motora se realizó colocando a los animales con sus patas delanteras en el centro de una cuerda de 60 cm de largo unida a dos plataformas, según lo descrito anteriormente por Doepfner *et al.* <sup>179</sup>. Para evitar que los animales pudieran sufrir daños derivados de la caída de la cuerda, el test se llevó a cabo sobre una superficie acolchada. En esta prueba se analizaron dos parámetros: el tiempo que los animales se mantenían en la cuerda y la llegada o no a una de las dos plataformas situadas a cada extremo de la cuerda. El tiempo máximo de duración de la misma era de 60 segundos y, teniendo en cuenta ambos parámetros, a cada animal se le asignaba una puntuación de 0 a 20, según se detalla en la tabla 5. Cada animal fue evaluado semanalmente desde el trasplante de las células leucémicas hasta la aparición de los síntomas que comprometía su supervivencia.

Puntuación	Tiempo (seg)	Llegada a la plataforma
20	1-6	+
19	7-12	+
18	13-18	+
17	19-24	+
16	25-30	+
15	31-36	+
14	37-42	+
13	43-48	+
12	49-54	+
11	55-60	+
10	55-60	-
9	49-54	-
8	43-48	-
7	37-42	-
6	31-36	-
5	25-30	-
4	19-24	-
3	13-18	-
2	7-12	-
1	1-6	-
0	0	-

Tabla 5. Criterios de evaluación para el test de la cuerda transversal.

### 2.7.2 Prueba de fuerza de agarre

Para identificar cambios en la fuerza de los roedores derivados del desarrollo de la enfermedad, éstos fueron sometidos a una prueba de fuerza de agarre o *Grip Strength Test*. Al inicio del test, los animales se colocaron sobre la cara superior de la rejilla de una jaula sostenida horizontalmente a 20 cm por encima de ésta. A continuación, se giraba la rejilla 180° a lo largo de su eje horizontal y se mantenía en esta

posición durante un tiempo de 60 segundos para determinar el tiempo que los animales eran capaces de mantenerse agarrados. Con el objetivo de evitar posibles daños en caso de caída, la jaula fue recubierta por una superficie acolchada durante el desarrollo de la prueba. Cada roedor fue evaluado semanalmente desde la infusión de células leucémicas hasta la aparición de los síntomas y, cada vez, la prueba se repitió dos veces para calcular la media de tiempo que cada uno se mantenía agarrado a la rejilla.

### 2.7.3 Prueba de discriminación olfativa

La capacidad para discriminar diferentes olores se evaluó utilizando una adaptación de los test de habituación/deshabituación anteriormente descritos<sup>180</sup>. Para ello, se usaron jaulas completamente limpias en las que los ratones fueron expuestos individualmente a diversos odorantes impregnados en bastoncillos de algodón que se depositaban en la parte superior de la jaula. Dos días antes de la realización de la prueba, se llevó a cabo una sesión de familiarización con el procedimiento en la que se mantuvo a cada ratón en la jaula con un bastoncillo impregnado de aceite mineral durante 10 minutos. Asimismo, el día de la prueba de discriminación olfatoria, ésta se inició con un periodo de exposición al aceite mineral durante 5 minutos. A continuación, éste se fue sustituyendo por nuevos bastoncillos empapados con 10µL de diferentes odorantes diluidos en aceite mineral siguiendo la siguiente secuencia: cuatro exposiciones sucesivas al primero (Octanal, Sigma); una exposición a un segundo olor similar al primero, un enantiómero del mismo (Heptanal, Sigma); dos nuevas exposiciones al primer odorante; y una última exposición a un olor completamente diferente (Anisole, Sigma). Cada exposición tuvo una duración de 90 segundos dejándose un intervalo de dos minutos entre una y otra. El test completo se registró con una videocámara y se cuantificó manualmente el tiempo que cada animal invertía en la exploración del bastoncillo impregnado con el odorante, olfateando o dirigiéndose hacia el mismo, acercándose (2-3cm) o contactando con él. Al finalizar la prueba, la caja se limpió cuidadosamente con etanol 70% para eliminar olores y restos orgánicos que pudieran influir en la realización del test al siguiente animal.

### 2.8 Técnicas histológicas

Las muestras de tejido extraídas inmediatamente después de sacrificar a los animales se sumergieron en una solución fijadora de PFA al 4% en PBS durante 24 horas a 4°C. A continuación, se lavaron con abundante PBS y el tejido fue transferido a una solución de sacarosa al 30% en PBS donde se mantuvo durante 48 horas. Finalmente, las muestras se sumergieron en OCT (Tissue-Tek, Miles, Elkhart, In., EEUU), se congelaron rápidamente y se mantuvieron almacenadas a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Posteriormente, criosecciones de 8-10 µm fueron obtenidas en un criostato (Shandon Cryotome E; Thermofisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA). Estas se mantuvieron a -20°C hasta el momento en el que se realizó la inmunodetección.

Algunas muestras de tejido fueron incluidas en parafina. Para ello, tras permanecer durante 24h en solución fijadora de PFA al 4% en PBS, se llevó a cabo la deshidratación de la muestra en alcoholes de

graduación creciente (etanol 50%- 100%) y su posterior aclaramiento en Clear-Rite 3 (Thermofisher Scientific). Después, las piezas fueron sumergidas en distintas soluciones de parafina líquida durante, al menos, 3 horas para finalmente colocarlas en la orientación deseada y formar un bloque sólido de parafina. La muestra incluida en parafina fue seccionada en un microtomo (Shandon Finesse 325; Thermofisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) en el que se obtuvieron cortes con un grosor de 10  $\mu\text{m}$ .

### 2.8.1 Tinción con hematoxilina-eosina

Las secciones obtenidas a partir de piezas incluidas en parafina fueron desparafinadas antes de teñirse con hematoxilina-eosina (H-E). Para ello, éstas fueron sumergidas en xileno (3min x 3) y en alcoholes de graduación decreciente (100%- 30%). A continuación, fueron lavadas e incubadas con hematoxilina (15min) y eosina (7min) y, tras eliminar los restos de colorante, los cortes se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol (96%-100%) y xileno (3 lavados). Finalmente, las preparaciones se montaron con bálsamo de Canadá (Merck S.L) que permite la preservación de la muestra.

### 2.8.2 Inmunofluorescencia

En las secciones congeladas obtenidas, las uniones inespecíficas fueron bloqueadas mediante su incubación en una solución que contenía suero de burro al 5%, (Jackson Immunoresearch), glicina al 1%, TritonX-100 al 0,1% y azida sódica al 0,05% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incubaron durante 24 horas a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en la solución bloqueo (Tabla 6). Tras realizar 3 lavados de 5 minutos en PBS, los cortes se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a distintos fluorocromos (Alexa-Fluor 488, Alexa-Fluor 594, DyLight™ 405) (Tabla 7) y diluidos en la solución bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. En los casos en los que se indica, se utilizó el kit comercial *In Situ Cell Death Detection Kit* (Roche) de acuerdo con las indicaciones del fabricante para la detección de células apoptóticas mediante el método TUNEL (dUTP-X nick end labeling). Los núcleos de las células se tiñeron con Hoechst 33258 (Molecular Probes, Invitrogen) durante 10 minutos para identificar todas las células presentes en las secciones de tejido y, finalmente, las preparaciones se montaron con un medio específico para preservar la fluorescencia (FluorSave Reagent; Calbiochem).

El estudio mediante fluorescencia de la localización de las células leucémicas, así como de los cambios histológicos producidos por la leucemia se llevó a cabo en, al menos, 3 animales trasplantados con cada una de las muestras primarias utilizadas en este trabajo y, en paralelo, en animales infundidos con la línea celular Nalm6.

El análisis de las secciones se realizó con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ci. La adquisición de las imágenes con una cámara *Nikon Digital sight DS-U3* y el software *Nis-Elements D*. Asimismo, para el procesamiento de las imágenes se utilizó el software *Fiji*.

Anticuerpos primarios					
Antígeno	Huésped	Clon	Dilución	Casa Comercial	Referencia
Pan-CK	Ratón	C11	1:400	Sigma	F3418
Laminina	Conejo	policlonal	1:300	Sigma	L9393
Iba1	Conejo	NCNP24	1:500	DAKO	019-19741
Ki67	Conejo	policlonal	1:100	abcam	ab15580
GFAP	Pollo	policlonal	1:200	Merck Millipore	AB5541
Colágeno tipo 1 alfa 1	Conejo	policlonal	1:100	Sigma	HPA011795
CD19	Ratón	A3-B1	1:100	Immunostep	19PU-01MG
MAP2	Pollo	policlonal	1:500	abcam	HPA011795
ER-TR7	Rata		1:50	Santa Cruz	sc-73355
CD31	Rata	MEC 13.3	1:100	BD Biosciences	550274
Caspasa 3	Conejo	policlonal	1:400	Sigma	C8487
$\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA)	Conejo	EPR5368	1:100	Merck Millipore	MABT381
Vimentina	Conejo	monoclonal	1:100	CellSignaling	5741

Tabla 6. Listado de anticuerpos primarios.

Anticuerpos secundarios					
Nombre	Antígeno	Huésped	Dilución	Casa Comercial	Referencia
Alexa Fluor 594 Highly Cross-Adsorbed	Conejo IgG (H+L)	Burro	1:500	ThermoFisher Scientific	A21207
Alexa Fluor 488 Highly Cross-Adsorbed	Conejo IgG (H+L)	Burro	1:500	ThermoFisher Scientific	A-21206
Alexa Fluor® 488 AffiniPure	Pollo IgY (IgG) (H+L)	Burro	1:500	Jackson Immunoresearch	703-545-155
DyLight™ 405 AffiniPure	Pollo IgY (IgG) (H+L)	Burro	1:500	Jackson Immunoresearch	703-475-155
Alexa Fluor® 594 AffiniPure	Pollo IgY (IgG) (H+L)	Burro	1:500	Jackson Immunoresearch	703-585-155
Alexa Fluor 488 Highly Cross-Adsorbed	Rata IgG (H+L)	Burro	1:500	ThermoFisher Scientific	A-21208
Alexa Fluor 488 Highly Cross-Adsorbed	Ratón IgG (H+L)	Burro	1:500	ThermoFisher Scientific	A-21202
Alexa Fluor 594 Highly Cross-Adsorbed	Ratón IgG (H+L)	Burro	1:500	ThermoFisher Scientific	A-21203

Tabla 7. Listado de anticuerpos secundarios.

### 2.8.3 Microscopía electrónica de transmisión

Para el estudio mediante microscopía electrónica, los cerebros obtenidos de animales que habían desarrollado la enfermedad a partir del trasplante de muestras primarias de LLA-B se fijaron por inmersión en tampón cacodilato 4% de glutaraldehido, la postfijación se llevó a cabo con tetróxido de osmio al 1% y, por último, las muestras fueron deshidratadas en acetona para su posterior inclusión en resina Araldite (Sigma-Aldrich). En un ultramicrotomo OM-U3 (Reichert Inc., Buffalo, NY, EEUU) se obtuvieron secciones ultrafinas que se contrastaron doblemente con acetato de uranilo y citrato de plomo para su análisis en un microscopio electrónico JEM 1010 (JEOL, Tokio, Japón) en el ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica en la UCM.

### 2.8.4 Cuantificación semicuantitativa de la infiltración en el cerebro

A partir de los cerebros extraídos de animales trasplantados con muestras primarias de LLA-B, se analizaron al menos 10 secciones representativas de uno de los dos hemisferios cerebrales para identificar las zonas en las que las células tumorales se localizaban con mayor frecuencia y realizar una cuantificación semicuantitativa de la carga tumoral en cada una de éstas. Así, el grado de infiltración se clasificaba en: ausencia de células (-), pequeños grupos de 2- 10 células (+), grupos de 10-50 células (++) y grandes acúmulos de células leucémicas (+++), basado en el marcaje con un anticuerpo frente al antígeno CD19 (n= 3-5 animales/muestra).

### 2.9 Resonancia magnética

Los experimentos de imagen de resonancia magnética (IRM) se llevaron a cabo en el equipo Biospec BMT 47/40 (Bruker Biospin, Ettlingen, Alemania) del CAI de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín electrónico de la UCM, que posee un campo magnético de 4.7 Teslas. Se empleó un sistema de gradientes de 6 cm de diámetro interno capaz de alcanzar un gradiente máximo de 450 mT/m. Los animales se anestesiaron mediante una mezcla de isoflurano en oxígeno y se dispusieron en posición decúbito prono en el interior de una antena de radiofrecuencia de volumen de 3 cm de diámetro interno. Los animales se mantuvieron anestesiados a lo largo de todo el experimento. Se les colocó una cánula no magnética en la vena lateral de la cola para la inyección del agente de contraste. Durante el tiempo de duración del experimento se monitorizó la respiración de los animales y la temperatura corporal se mantuvo a 36 °C mediante un sistema de recirculación de agua caliente.

Antes de la inyección del agente de contraste se adquirieron imágenes de RM potenciadas en T1 y en T2 del cerebro completo de los animales empleando secuencias de espín y de eco de espín rápido (RARE, rapid acquisition with relaxation enhancement), respectivamente. Para el caso de las imágenes potenciadas en T1, el tiempo de repetición (TR) y el tiempo de eco (TE) fueron 539 y 8.5 ms. Para las imágenes potenciadas en T2: TR/TE=2735/75.36 ms. Los planos de las imágenes fueron los mismos para ambos experimentos: campo de visión o field of view (FOV) = 2.56 x 2.56x1.5 cm<sup>3</sup>, matriz de imagen = 256x256x15. El tiempo total de ambos experimentos fue aproximadamente de 11 minutos. Al finalizar la adquisición de las imágenes pre-contraste se hizo una inyección intravenosa de 0.1 ml/kg del agente del contraste basado en Gd (gadobenato de dimeglumina, Multihance, Bracco Imaging S.p.A., Milán, Italia) y se repitió la secuencia de los dos experimentos de eco de espín potenciados en T1 y T2 a lo largo del tiempo. El tiempo total varió desde 1 hora hasta 2 horas, dependiendo de la severidad de la enfermedad.

Los datos se analizaron empleando el programa ImageJ 1.52h (NIH, Bethesda, EEUU).

El agente de contraste basado en Gd produce una disminución del tiempo de relajación T1 lo que se traduce un aumento de la señal en las imágenes potenciadas en T1. Por tanto, para el cálculo de la severidad del daño en las barreras cerebrales se emplearon las imágenes potenciadas en T1, ya que en

aquellas regiones del cerebro en las que las barreras no estén intactas se producirá un aumento de la señal en la imagen T1 debido a que el agente de contraste basado en Gd difundirá del sistema vascular al espacio intersticial.

En primer lugar, se corrigieron los posibles movimientos de traslación y rotación de las imágenes post-contraste en las tres direcciones espaciales, tomando como referencia las imágenes previas a la inyección del agente de contraste. Luego, se definieron regiones de interés (ROIs) en diferentes zonas del cerebro y en todos los cortes (Figura 5). Finalmente se calculó el valor, relativo respecto al valor pre-contraste, de la intensidad media de cada ROI en cada punto temporal. Este valor relativo se calcula según la fórmula:

$$I_{rel}=(I_i-I_0)/I_0$$

Donde  $I_{rel}$  corresponde a la intensidad relativa de cada ROI y punto temporal,  $I_i$  es la intensidad media del ROI en dicho punto temporal e  $I_0$  es la intensidad media del ROI en la imagen previa a la inyección del contraste.

De este modo aquellos ROIs en zonas cerebrales en las que las barreras cerebrales no están intactas se observa un aumento del valor de  $I_{rel}$ . Además, este aumento es mayor cuanto mayor sea la severidad del daño en la barrera.

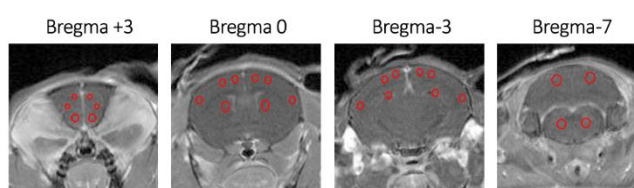


Figura 5. Imágenes representativas en las que se muestran los ROIs definidos para el análisis.

### 3. Estudios in vitro

#### 3.1 Obtención y cultivo de líneas celulares leucémicas

Las células leucémicas utilizadas para los ensayos *in vitro* fueron líneas leucémicas establecidas debido a la imposibilidad para mantener las células primarias en cultivo. También se utilizaron en algunos estudios *in vivo*, como se ha indicado anteriormente. Tanto las células leucémicas Nalm6 (ACC128) como las células Tom1 (ACC578) proceden de pacientes diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B) obtenidas en DMSZ (Brunswick, Alemania) (Tabla 8). Estas células se expandieron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 (Lonza Hopkinton, MA, EEUU) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, 2mM de L-glutamina, 100 U/MI de penicilina y 100µg/ml de estreptomycin. Se mantuvieron para ello en un incubador de 37°C, en una atmósfera húmeda y al 5% de CO<sub>2</sub>.

Línea leucémica	Inmunofenotipo	Origen	Alteración genética	Riesgo de recaída	Fenotipo	
					Negativo	Positivo
Nalm6	LLA pre-B	Establecida en 1976 a partir de sangre periférica de un varón de 19 años diagnosticado de LLA en fase de recaída	No descrita	RE	CD3; CD37; CD80; sm/cylG; sm/cylgM; sm/cykappa; sm/cylambda	CD10; CD19; CD138; cyC79a; cylgM; HLA-DR
Tom1	LLA pre-B	Establecida en 1983 a partir de aspirado de médula ósea de una mujer de 54 años diagnosticada de LLA BCR-ABL	t(9;22) BCR-ABL1	RA	CD2; CD3; CD7; CD80; CD138; sm/cylgG; sm/cylgM; sm/cykappa; sm/cylambda	CD10; CD13; CD19; CD20; CD34; CD37; CD38; cyCD79a; HLA-DR

**Tabla 8. Características de las líneas celulares leucémicas.**

Posteriormente, estas células fueron sembradas en placa de 24 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en su medio de cultivo suplementado con diferentes dosis de BMP4 recombinante humano (0,01, 0,1, 1, 10 o 100ng/mL) (Humanzyme Inc., Chicago, EEUU) o con el inhibidor de receptores BMP tipo I, DMH1 (10 $\mu$ M; Tocris, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se contaron en viabilidad con azul tripán (Merck Millipore, Sigma-Aldrich, España). Los tiempos de cultivo se indican en cada caso.

### 3.2 Transducción de la línea celular Nalm6

El establecimiento de una línea leucémica (Nalm6) que sobreexpresase BMP4 (Nalm6-BMP4), se consiguió mediante la transducción de estas células con un vector lentiviral que contiene el gen de BMP4. Para ello se utilizó el plásmido comercial pCMV-SPORT6 que contenía el gen que codifica para BMP4 (Clone Id: 4399276; Termofisher) y, mediante el sistema de recombinación Gateway®, la secuencia codificante para el gen de interés fue transferida al plásmido de expresión lentiviral p-LNT-SFFV-WPRE. Esta tecnología está basada en dos reacciones de recombinación consecutivas: la reacción BR, mediante la cual el gen que codifica para BMP4 se transfiere desde el plásmido pCMV-SPORT6 al plásmido donante (pDONR™ 201; Invitrogen) para formar el plásmido de entrada que, posteriormente, en la reacción de recombinación LR, transfiere el gen BMP4 al plásmido lentiviral de destino p-LNT-SFW-WPRE obtenido del Dr. Adrian Thrasher a través del Dr. Peter van der Sluijs, (University College London, Londres, Reino Unido). Estas reacciones fueron catalizadas por las clonasas BP y LR, respectivamente (Termofisher Scientific). Bacterias competentes (DH5 $\alpha$ ) fueron transformadas mediante choque térmico con las reacciones de recombinación y, los plásmidos de entrada y de expresión lentiviral fueron seleccionados con el antibiótico correspondiente. Para la purificación de los plásmidos se utilizó el kit *High Pure Plasmid Isolation kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos lentivirales de expresión p-LNT-SFW-WPRE-BMP4 se confirmaron mediante secuenciación.

Los vectores lentivirales para la sobreexpresión de BMP4 fueron generados en células HEK-293T mediante la transfección conjunta de tres plásmidos de expresión: (1) p8.91, un plásmido que contiene los genes estructurales “Gag-Pol” del retrovirus de la inmunodeficiencia humana, necesarios para que se ensamblen

las partículas lentivirales; (2) pMDG, un plásmido que expresa la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular y cuya función consiste en proveer a los lentivirus de una envoltura diferente a la del retrovirus para poder infectar otras células diferentes de las que infecta el VIH, un proceso de cambio de envoltura conocido como pseudotipaje; (3) p-LNT-SFW-WPRE-BMP4, el plásmido de expresión lentiviral que contiene el gen BMP4, tal y como se ha descrito previamente<sup>181</sup>. En paralelo se generaron vectores lentivirales vacíos (p-LNT-SFW-WPRE). Para la transfección de las células HEK293T se utilizó Fugene-6 (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 48 y 72 horas de cultivo, el sobrenadante del cultivo con las partículas lentivirales generadas fue recogido y almacenado a -80°C hasta su utilización.

La transducción de las células Nalm6, se llevó a cabo sembrando 500.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos e infectando con diluciones seriadas de los lentivirus generados vacíos y que expresaban BMP4. A los 7 días tras la infección, los niveles de expresión del ARNm de BMP4 se evaluaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real, así como los niveles de proteína producidos por estas células que fueron cuantificadas por ELISA. Se observó un aumento tanto en los niveles de ARN mensajero como de la proteína BMP4 proporcional al número de partículas lentivirales con que fueron infectadas las células Nalm6. Las células Nalm6 que mostraron los máximos niveles de transducción y de expresión de BMP4 se utilizaron en posteriores experimentos.

En los ensayos de bloqueo de BMP4 producido por las células Nalm6-BMP4, éstas se sembraron en placa de 24 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en su medio de cultivo y en presencia de nanoanticuerpos C4C4, (proporcionados por la Dra. Silvia Calpe, Center for Experimental & Molecular Medicine, Amsterdam, The Netherlands) a una concentración de 1000ng/ml.

### 3.3 Obtención y cultivo de células neurales

Los diferentes tipos celulares procedentes del SNC utilizados se corresponden con células primarias aisladas por los laboratorios *ScienCell Research*. Las células endoteliales de la microvasculatura cerebral son, sin embargo, células inmortalizadas mediante el virus SV40 (Tabla 9). Todas ellas se han cultivado en el medio de cultivo indicado por el proveedor para su crecimiento en una monocapa adherente al plástico hasta alcanzar en torno al 90 % de confluencia. En los casos en los que así se recomendaba, la superficie de cultivo era tratada previamente con poli-L-lisina o fibronectina.

Tipo celular	Medio de cultivo
Células endoteliales de la microvasculatura cerebral humana (hMECs) (ABM)	PriGrow I (ABM)
Células endoteliales del plexo coroideo humano (HCEPC) (ScienCell Research Laboratories)	Medio de cultivo para células endoteliales (ScienCell Research Laboratories)
Fibroblastos del plexo coroideo humano (HCPF) (ScienCell Research Laboratories)	Medio de cultivo para fibroblastos (ScienCell Research Laboratories)
Células epiteliales del plexo coroideo humano (HCPEpiC) (ScienCell Research Laboratories)	Medio de cultivo para células epiteliales (ScienCell Research Laboratories)

**Tabla 9. Células del SNC utilizadas en los ensayos in vitro.**

### 3.4 Co-cultivos

Las co-cultivos de los diferentes tipos celulares del SNC con las células leucémicas Nalm6 o Tom1 se realizaron a una ratio 1:30 en placas de 24 pocillos. Las células del SNC se cultivaron previamente durante 48 horas a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en su medio correspondiente y, a continuación, las líneas celulares leucémicas fueron añadidas en soportes transwell con poros de 0.4 µm (Corning, NY, EEUU) resuspendidas en RPMI 1640 suplementado con 2% de SBF, 2mM de L-glutamina, 100 U/MI de penicilina y 100µg/ml de estreptomina. Los co-cultivos en sistema transwell fueron mantenidos en un volumen de 700 µL con los medios de cultivo de cada tipo celular al 50% durante distintos periodos de tiempo: 12 y 72 horas. En algunos casos, se establecieron co-cultivos en contacto directo, sin soportes transwell en un volumen de 500 µL. Para el posterior análisis por inmunofluorescencia de los co-cultivos, éstos fueron establecidos en cubreobjetos de cristal de 13mm de diámetro. En los experimentos en los que se indica, los co-cultivos se establecieron en presencia de alguno de los siguientes tratamientos: metotrexato, (0.01, 0.1, 1 µM), citarabina 0.01, 0.1, 1 µM), anticuerpo bloqueante, anti-VLA-4 (10µg/0,5x10<sup>6</sup>células; BD Biosciences), DAPT, inhibidor de la γ-secretasa (50µM; Calbiochem, Nottingham, RU).

Las células Nalm6 de los co-cultivos con los HCPFb fueron recogidas en dos fases en los experimentos en los que se indica. En primer lugar, se recogieron las células en suspensión y se realizó un lavado con PBS-EDTA (5mM) para recoger las células que no estaban adheridas fuertemente a la monocapa de HCPFb. A continuación, se recogieron las células leucémicas que requerían de un tratamiento enzimático con tripsina para separarse de los fibroblastos, incluidos también en esta segunda fase.

Finalmente, las células de los co-cultivos fueron recogidas para su análisis por PCR cuantitativa a tiempo real y/o citometría de flujo o fijadas con PFA al 4% en PBS para su análisis por inmunofluorescencia. En algunos casos, los sobrenadantes fueron recogidos para la posterior cuantificación de factores solubles.

Las imágenes de los co-cultivos fueron tomadas con una cámara *Nikon Digital Sight DS-Fi1* acoplada a un microscopio invertido de contraste de fases.

Para el estudio por inmunofluorescencia las células fueron incubadas con anticuerpos primarios (Tabla 6) durante 45 minutos y, tras sucesivos lavados con PBS, con anticuerpos secundarios (Tabla 7) durante 30 minutos. En los casos en los que se indica las células se marcaron con el reactivo Faloidina conjugado al fluorocromo "Texas-Red" (Invitrogen, Life Technologies). Todos los núcleos fueron teñidos con Hoechst.

### 3.5 Obtención y cultivo de células madre neurales adultas

El aislamiento de células madre neurales (NSCs) procedentes de la SVZ se realizó según lo descrito anteriormente por Belenguer *et al.*<sup>182</sup>. Ratones C57/BL6 de 2-4 meses de edad fueron sacrificados mediante dislocación cervical y sus cerebros extraídos rápidamente. A continuación, se llevó a cabo la disección de la SVZ de ambos hemisferios y se sometió a una digestión enzimática con tratamiento de papaína (12 u/ml; Worthington Biochemical Corporation) durante 30 minutos a 37°C para favorecer la disgregación del tejido. Tras ello, se realizó una disociación mecánica hasta la obtención de una suspensión de células que, tras ser lavadas, se cultivaron a una densidad de 15.000-20.000 células por cm<sup>2</sup> en su medio de crecimiento, previamente definido por Belenguer *et al.*, y en presencia de los mitógenos EGF (*Epidermal Growth Factor*) (20ng/ml) y FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) (10ng/ml) hasta la formación de neuroesferas como consecuencia de la proliferación de las NSCs. Cuando las neuroesferas alcanzaban un tamaño adecuado, se disgregaban con un tratamiento enzimático de 10 minutos con acutasa (Sigma) para obtener NSCs individuales que se sembraron de nuevo para su expansión.

### 3.6 Ensayos de autorrenovación

La capacidad proliferativa de las neuroesferas *in vitro* fue determinada tras el cultivo de las NSCs individuales a una densidad de 2,5 células/μl en su medio de crecimiento o en su medio previamente condicionado por las células leucémicas Nalm6 durante 48 horas. Tras 6-7 días de cultivo se cuantificó el número de neuroesferas formadas, así como se determinó el diámetro de las mismas. En algunos casos, las neuroesferas pre-tratadas con el medio condicionado se disgregaron y sometieron a un segundo ensayo de autorrenovación, a una autorrenovación secundaria, esta vez en su medio de cultivo para discriminar así los efectos en proliferación o supervivencia de los efectos en la capacidad de autorrenovación de NSCs.

### 3.7 Co-cultivos NSCs- NALM6

El establecimiento de los co-cultivos entre NSCs y la línea celular Nalm6 se llevó a cabo mediante el uso de insertos transwell con un diámetro de poro de 0,4μm (Corning). En primer lugar, las células leucémicas se sembraron en placas de 24 pocillos y, a continuación, se cultivaron las NSCs individuales a una densidad de 10000 células/cm<sup>2</sup> en el compartimento superior de insertos transwell en presencia de medio fresco o condicionado previamente por las células tumorales durante 48 horas. Después de 7 días de co-cultivo se analizó la formación y el tamaño de las neuroesferas presentes en los co-cultivos en las distintas condiciones.

### 3.8 Ensayos de proliferación

La capacidad proliferativa de las células fue determinada mediante la tinción con 7AAD (7-aminoactinomicina D; Sigma). Para ello las células recogidas de los cultivos se lavaron con PBS, se fijaron y permeabilizaron, incubándose durante 30 minutos a 4°C en etanol al 70% permitiendo así la incorporación de 7AAD al interior las células. Transcurrido ese tiempo, para eliminar los restos de etanol, las células fueron lavadas con PBS y, finalmente teñidas con 7AAD a una concentración de 25µg/ml. Para diferenciar la capacidad proliferativa de los diferentes tipos celulares presentes en un mismo cultivo, las células se marcaron previamente con anticuerpos monoclonales unidos a diferentes fluorocromos (Tabla 10). El análisis de la proliferación celular se realizó mediante citometría de flujo.

En ocasiones, el análisis de las células viables en proliferación se llevó a cabo utilizando el kit comercial *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (G-3580; Promega, Madison, WI). Este se basa en una reacción colorimétrica en la que se forma formazán, un compuesto coloreado, a partir de la reducción del [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) por acción de las enzimas deshidrogenasas de las células metabólicamente activas. Para ello, 20µl de una solución con MTS se incorporaron a los cultivos celulares y se incubaron durante 4 horas antes de medir la absorbancia a 450nm, en un lector de ELISA (Rayto RT-6100; Rayto Life and Analytical Sciences Co, Ltd)

### 3.9 Determinación de la viabilidad celular

La cuantificación del porcentaje de células apoptóticas en las distintas condiciones de cultivo se llevó a cabo mediante la tinción de las células con Anexina-V conjugada a un fluorocromo (Immunostep, Salamanca, España). Las células fueron incubadas en presencia de cantidades saturantes de Anexina-V en la solución tampón hepes durante 30 minutos a 4°C y, posteriormente, yoduro de propidio (IP; BioLegend, San Diego, CA, USA) fue añadido a la suspensión celular antes de ser analizada por citometría de flujo. De esta manera, las células necróticas fueron excluidas por su tamaño y complejidad, así como por la captación de IP, consecuencia de la pérdida de integridad de sus membranas. Las células apoptóticas, sin embargo, fueron definidas como aquellas positivas para Anexina-V dentro de la población de células que no incorporaba IP y, finalmente, se consideraron viables aquellas células que excluían IP y no presentaban Anexina-V unida a su membrana.

En los casos en los que se indica, para discriminar la viabilidad entre las poblaciones presentes en los cocultivos, las células se incubaron también con anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluorocromos (Tabla 12).

### 3.10 Tinción con CFSE

Para facilitar la identificación de las células leucémicas en los co-cultivos, éstas fueron marcadas, en los casos en los que se indica, mediante la incorporación del agente fluorescente intracelular CFSE, sin comprometer su viabilidad. Las células se incubaron con CFSE 2.5  $\mu$ M (BioLegend, San Diego, CA, USA) durante 10 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, el exceso de CFSE fue eliminado tras sucesivos lavados con PBS y añadidas a los co-cultivos. Posteriormente, fueron analizadas por citometría de flujo.

### 3.11 Ensayos de migración

Las células endoteliales fueron cultivadas en la cara inferior de los insertos transwell (Corning, NY, EEUU), con poros de 5 $\mu$ m, a una concentración de  $2 \times 10^4$  células/mL (500 $\mu$ l/pocillo) en su medio correspondiente durante 2 horas. En ese momento, los insertos transwell fueron recolocados en la placa de 24 pocillos. Tras 24 horas, las células fueron tratadas con TNF- $\alpha$  (10ng/mL; Immunotools, Friesoythe; Germany) durante 24h y, a continuación, las células leucémicas ( $0,3 \times 10^6$  células) previamente marcadas con CFSE, fueron añadidas al compartimento superior en RPMI-1640 sin SBF. Tras una incubación de 4 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> las células del compartimento superior fueron recogidas con PBS 1% EDTA (Fracción A), y las del compartimento inferior con un lavado RPMI 10% SBF 1% EDTA y tripsina (Fracción B). Por último, se pasaron las células por el citómetro a 12 $\mu$ l/min durante 102 segundos. Así, mediante el uso de la siguiente fórmula se obtuvo el número de células perteneciente a cada fracción:

$$(\text{n}^\circ \text{ células FSC/SCC}) / 20,4 \mu\text{l} * 200\mu\text{l}$$

donde n° células FSC/SSC corresponde al número de eventos CFSE positivos, 20,4 $\mu$ l es el volumen que pasa por el citómetro durante el tiempo establecido y 200 $\mu$ l hace referencia al volumen total en el que se encuentran las células.

### 3.12 Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real (PCRq)

El aislamiento y purificación del ARNm para el posterior análisis de la expresión génica a partir de células en cultivo se realizó utilizando el kit *Absolutely RNA MicroPrep* (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, EEUU) que incluye un paso para eliminar la contaminación con ADN genómico de digestión con ADNasa. Para la obtención de ARNm a partir de tejido, se utilizó el kit *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen).

A partir del ARN, se sintetizó el ADN complementario total (ADNc) con el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ADNc obtenidos se utilizaron como molde para el análisis por PCR cuantitativa empleando sondas Taqman (Tablas 10 y 11). Los controles endógenos que se utilizaron fueron los genes GNB2L1 y GAPDH (Applied Biosystem). Todas las PCRq se llevaron a cabo por duplicado utilizando el *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystem) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones,

detecciones y el análisis se realizaron en un 7.900HT Fast Real-time PCR System en el centro de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Los datos de expresión génica obtenidos (Ct) se relativizaron a los  $\Delta$ Ct y se normalizaron frente a los genes endógenos GNB2L1 y/o GAPDH.

Gen	Referencia	Gen	Referencia
<i>ACTA2</i> ( $\alpha$ -SMA)	Hs00426835_g1	<i>ID4</i>	Hs00155465_m1
<i>ACVR1A</i>	Hs00153836_m1	<i>IL1B</i>	Hs01555410_m1
<i>ADAM10</i>	Hs00153853_m1	<i>IL6</i>	Hs00985639_m1
<i>BMP4</i>	Hs00370078_m1	<i>IL8</i> ( <i>CXCL8</i> )	Hs00174103_m1
<i>BMPRII</i>	Hs00176148_m1	<i>ITGA4</i> ( <i>VLA-4</i> )	Hs00168433_m1
<i>CCL2</i>	Hs00234140_m1	<i>ITGB2</i> ( <i>LFA1</i> )	Hs00164957_m1
<i>CDH1</i>	Hs01023894_m1	<i>JAG1</i>	Hs01070032_m1
<i>CDH5</i> ( <i>VE-Cadherina</i> )	Hs00901463_m1	<i>LAMC1</i>	Hs00267056_m1
<i>CLDN11</i>	Hs00194440_m1	<i>MMP2</i>	Hs01548727_m1
<i>CLDN2</i>	Hs01549234_m1	<i>PDGFRB</i>	Hs01019589_m1
<i>CLDN5</i>	Hs01561351_m1	<i>PDPN</i>	Hs00366766_m1
<i>Col1A1</i>	Hs00164004_m1	<i>SELP</i>	Hs00927900_m1
<i>CXCL12</i>	Hs00171022_m1	<i>SMAD1</i>	Hs00195432_m1
<i>FGF1</i>	Hs01092738_m1	<i>SMAD7</i>	Hs00998193_m1
<i>FGF2</i>	Hs00266645_m1	<i>TGFB1</i>	Hs00998133_m1
<i>FN1</i>	Hs01549976_m1	<i>TNC</i>	Hs01115665_m1
<i>GNB2L1</i>	Hs00272002_m1	<i>TNFA</i>	Hs00174128_m1
<i>HSPG2</i>	Hs01078536_m1	<i>VCAM1</i>	Hs01003372_m1
<i>HSPG2</i>	Hs01078536_m1	<i>VEGFA</i>	Hs00900055_m1
<i>ICAM-1</i>	HS00164932_m1		

**Tabla 10. Ensayos Taqman utilizados para el análisis de expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real en muestras humanas.**

Gen	Referencia
<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1
<i>Cxcl10</i>	Mm00445235_m1
<i>Cxcl12</i>	Mm00445553_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1
<i>Il1b</i>	Mm00434228_m1
<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
<i>Tnfa</i>	Mm00443258_m1
<i>Vegfa</i>	Mm00437306_m1

**Tabla 11. Ensayos Taqman utilizados para el análisis de expresión génica por PCR cuantitativa a tiempo real en muestras de ratón.**

### 3.13 Citometría de flujo

Los estudios fenotípicos de los diferentes tipos celulares se llevaron a cabo mediante la incubación, previo bloqueo de los receptores Fc con el *FcR Blocking Reagent* (Miltenyi Biotec), de células en suspensión con concentraciones saturantes de los anticuerpos (Tabla 12) diluidos en PBS-EDTA 5mM, durante 30 minutos a 4°C. En los casos en los que los anticuerpos nos estaban directamente conjugados a un fluorocromo, se

realizaba una segunda incubación con fragmentos F (ab')<sub>2</sub> frente a IgG de la especie en la que estaba hecho el anticuerpo primario y conjugados a un fluorocromo.

Para las tinciones intracelulares las células fueron tratadas con la solución Citofix/Cytoperm (BD Biosciences) durante 5 minutos siguiendo las instrucciones del fabricante para permeabilizarlas y, a continuación, incubadas con los anticuerpos correspondientes.

Para el análisis fenotípico de muestras de sangre periférica o de suspensiones celulares a partir de otros tejidos, tras el marcaje con los anticuerpos, las células fueron tratadas durante 20 minutos con una solución de lisis (Quicklysis, Cytognos, Salamanca, España) para eliminar los eritrocitos.

La estrategia para el análisis por citometría de flujo de las diferentes poblaciones celulares aisladas de la SVZ se detalla en la Figura 6.

El análisis de los resultados se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

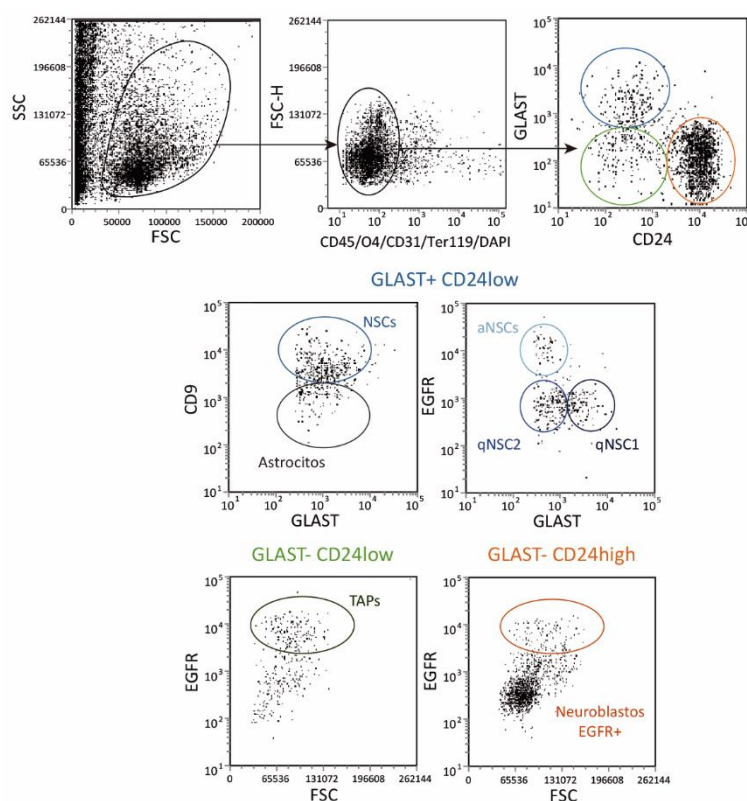


Figura 6. Identificación y cuantificación de las distintas poblaciones en la SVZ.

Antígeno	Clon	Casa Comercial	Referencia
BAX	B-9	Santa Cruz Biotechnology	sc-7480
BCL-2	Bcl-2/100	BD Pharmingen	51-65115X
BCL-XL	H-5	Santa Cruz Biotechnology	sc-8392
BMP4	EPR6211	Abcam	ab124715
CD10	HI10a	BD Pharmingen	341112
CD106 (VCAM1)	51-10C9	BD Biosciences	551147
CD19	HIB19	Biologend	302206
CD19	HIB19	BD Pharmingen	562440
CD24	M1/69	BD Bioscience	553262
CD31	MEC 13.3	BD Biosciences	550274
CD34	8G12	BD Pharmingen	347222
CD38	HB7	BD Pharmingen	656646
CD45	A20	Biologend	110708
CD54 (ICAM1)	HCD54	Biologend	322714
CD9	SN4 C3-3A2	Miltenyi Biotec	130-103-957
EGF	-	Molecular probes	E35351
GLAST	ACSA-1	Miltenyi Biotec	130-095-814
O4	O4	Miltenyi Biotec	130-119-896
Ter119	TER-119	BD Biosciences	563827

**Tabla 12. Listado de anticuerpo utilizados en citometría de flujo.**

### 3.14 Cuantificación de factores solubles.

Los sobrenadantes de distintos cultivos celulares fueron recogidos en los tiempos indicados en cada caso y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis. Los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF $\alpha$  y VEGFA presentes en los sobrenadantes fueron determinados mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (BioLegend) y utilizando un lector de ELISA. Para la cuantificación de CCL2, IL-6, TGF $\beta$  se utilizó, sin embargo, el sistema *Cytometric Bead Array Flex Set (CBA)* (BD Biosciences). En estos casos, las muestras fueron analizadas en un citómetro FACScalibur.

La cuantificación de las citoquinas inflamatorias presentes en el suero de los animales que desarrollan leucemia linfoblástica aguda se llevó a cabo utilizando un kit específico para ratón (Mouse Inflammation kit) basado en el sistema CBA.

## 4. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo se comprobó, en primer lugar, la normalidad de los datos y se aplicaron diferentes pruebas estadísticas utilizando el software *GraphPad Prism 8.0*. Así, la prueba paramétrica T de Student se aplicó para comparar variables paramétricas. En los casos en los que los datos no se ajustaban a una distribución normal, se utilizaron tests no paramétricos, la prueba U de Mann Whitney para la comparación de variables independientes y la prueba de suma de rangos de Wilcoxon cuando se comparaban variables relacionadas. El análisis de dos variables se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías seguido del test de Bonferroni.

Las curvas de supervivencia y de recaídas se calcularon según el modelo de Kaplan Meier y las comparaciones de las curvas de supervivencia entre grupos fueron realizadas con la prueba Log-Rank.

Por otra parte, para analizar la relación existente entre dos variables se utilizaron las pruebas de Pearson y Spearman para calcular el coeficiente de correlación (r) en función del cumplimiento o incumplimiento de normalidad, respectivamente. Cuando procedía, a continuación, se realizó el análisis de regresión lineal.

Los niveles de significación considerados fueron los siguientes: \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



# RESULTADOS

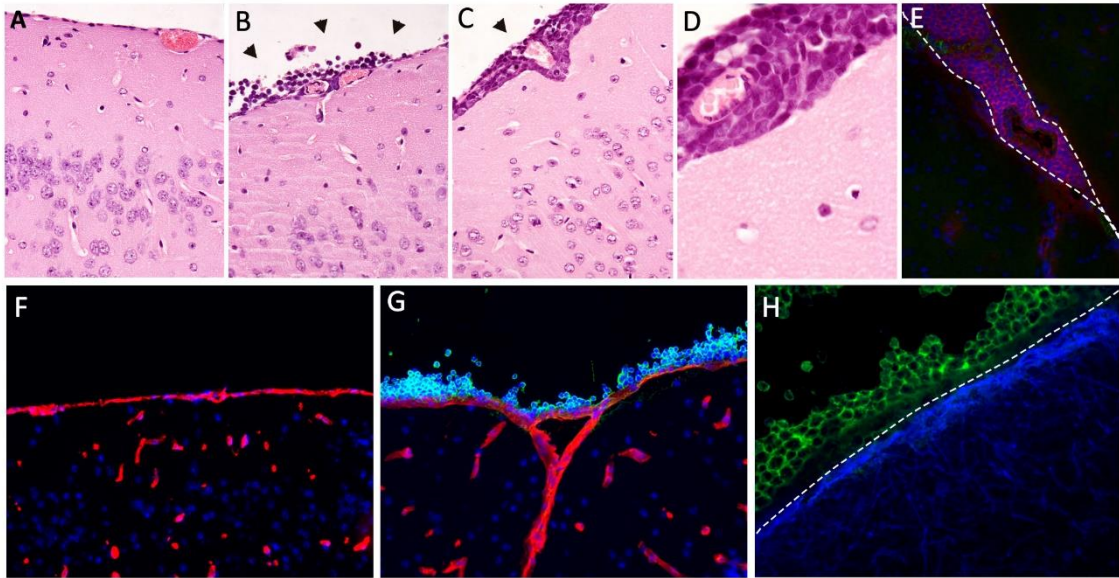


## 1. Localización y distribución de las células leucémicas en el sistema nervioso en un modelo *in vivo*

Para el estudio de la localización de las células leucémicas en el cerebro utilizamos un modelo xenogénico de LLA previamente descrito y ampliamente utilizado<sup>183, 184</sup>. Muestras primarias de células leucémicas obtenidas de aspirados de médula ósea en el momento del diagnóstico o células de la línea leucémica Nalm6, fueron infundidas por vía intravenosa en ratones inmunodeficientes NSG, sin acondicionamiento previo, para evitar posibles daños en la BHE causados por la irradiación. Los ratones fueron monitorizados cada 15 días para comprobar el injerto y sacrificados cuando mostraban síntomas típicos de la enfermedad, algunos de los cuales sugerían afectación neurológica. En paralelo, los mismos estudios se llevaron a cabo en animales sanos (grupo control). Los cerebros de todos los animales fueron procesados para la realización de diferentes técnicas histológicas.

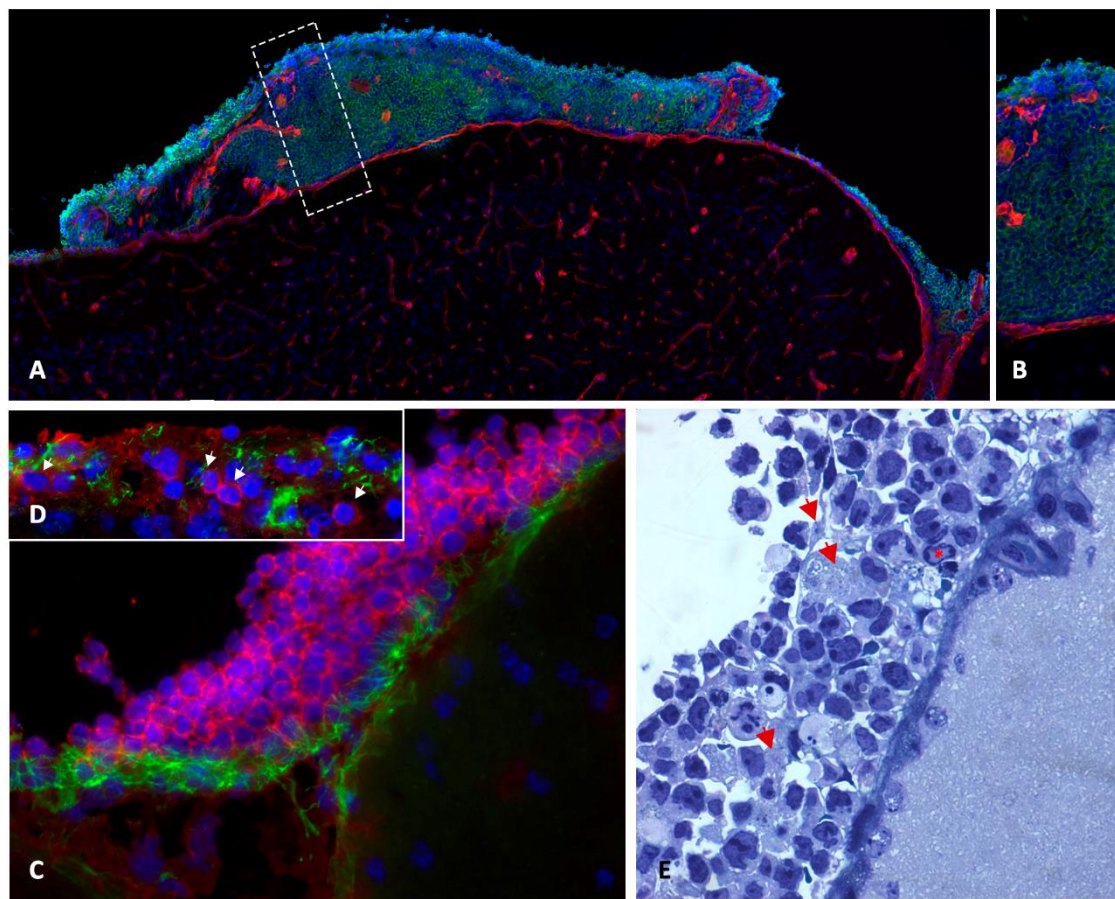
El análisis de las secciones histológicas del cerebro de ratones infundidos con células primarias o con líneas leucémicas ponía de manifiesto un patrón general común de distribución de las células tumorales, en todos los animales estudiados.

Las células leucémicas se encontraban mayoritariamente localizadas en el espacio subaracnoideo, en contacto con las leptomeninges, bien como células aisladas o formando pequeños grupos de células dispuestos sobre la piamadre y separados del parénquima nervioso por la limitante glial-pial (Figura 7). En ocasiones, las células leucémicas penetraban desde el espacio subaracnoideo hacia el espacio de Virchow-Robin, alcanzando zonas profundas del parénquima nervioso y separadas del mismo tan sólo por la limitante glial (Figura 7E). En los animales que no eran perfundidos, sólo de forma ocasional se hallaban células leucémicas en la luz de las arterias que se adentran hacia el interior del parénquima nervioso. Asimismo, se identificaron células leucémicas presentes en la luz de los ventrículos tanto en relación directa con las células endimarias que tapizan el ventrículo, como con el epitelio del plexo coroideo (véase apartado 9).



**Figura 7. Localización leptomenígea de las células leucémicas. A-D)** Cortes histológicas de corteza cerebral teñidos con H-E, donde se pueden observar las células leucémicas dispuestas estrechamente sobre la piamadre (flechas) (A, animal control; B-D, animal LLA). **E)** Las células leucémicas (CD19<sup>+</sup>; rojo) ocupan el espacio de Virchow-Robin sin que se observen células positivas en la luz de los vasos. Los núcleos están marcados con Hoechst (azul). **F-H)** Mantenimiento de la integridad de la limitante glial pial. **F-G)** Inmunofluorescencia frente a laminina (rojo) y CD19 (verde). Los núcleos celulares se marcaron con Hoechst. La laminina conforma una barrera continua que separa a las células leucémicas del parénquima nervioso (F: control; G: LLA. **H)** Inmunofluorescencia frente a GFAP (azul) y CD19 (verde). Obsérvese la continuidad de la limitante glial astrocitaria GFAP<sup>+</sup> (línea discontinua) que mantiene a las células leucémicas, en este caso, fuera del parénquima nervioso. A-C: x20; D: x40; E: x20; F-H: x40.

Por otra parte, las células leucémicas se disponían con frecuencia formando grandes acúmulos estrechamente adheridos a la superficie de la piamadre coincidiendo con las principales cisuras del cerebro donde se forman espacios más grandes llenos de LCR (cisternas subaracnoideas). En estas zonas, las células leucémicas se organizaban formando un entramado con las células meníngeas y componentes de matriz extracelular, presumiblemente de las trabéculas aracnoideas, dando lugar a estructuras grandes y complejas que podrían restringir su movimiento en el LCR (Figura 8). Además, en estos acúmulos aparecían vasos sanguíneos de pequeño calibre correspondientes a la vascularización presente en el eje de las trabéculas aracnoideas y la piamadre.

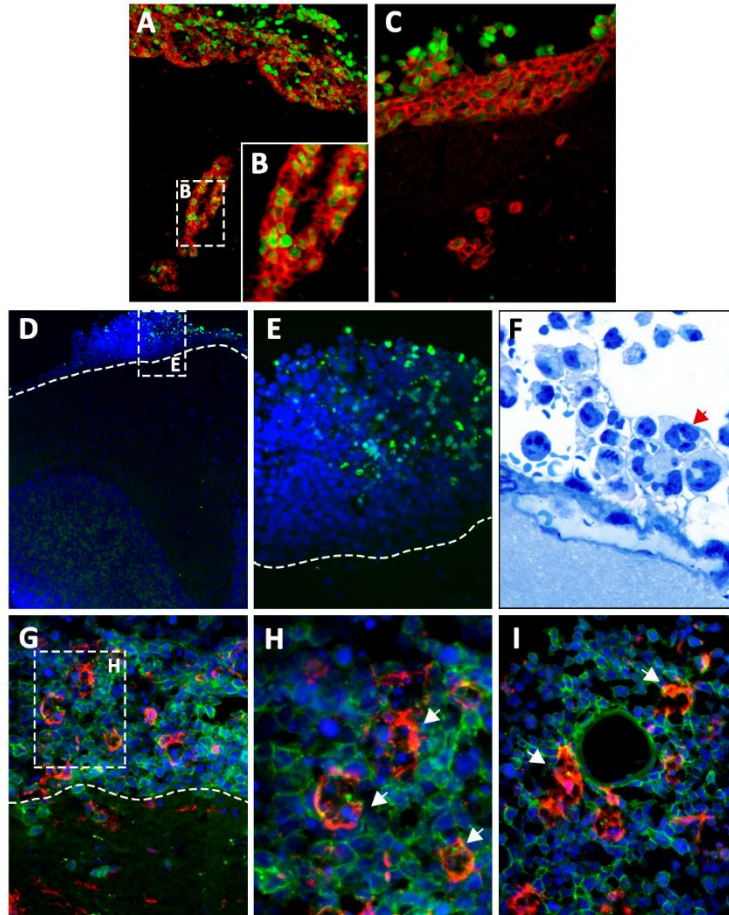


**Figura 8. Grandes complejos de células leucémicas, leptomeníngicas y componentes de matriz extracelular se disponen sobre la piamadre. A-B)** Inmunofluorescencia frente a CD19+ (verde) y laminina (rojo). Hoechst marca los núcleos de todas las células presentes en los cortes. Obsérvese el denso acúmulo de células leucémicas CD19+ en un entramado de laminina. **C-D)** Otros componentes de matriz extracelular están también presentes en estos acúmulos; Inmunofluorescencia para fibras reticulares ER-T7+ (verde) y CD19 (rojo) (flechas blancas). **E)** Corte semifino de tejido nervioso teñido con azul de metileno en el que se observa un acúmulo de células leucémicas dispuesto sobre la meninge. Se distinguen junto a las células leucémicas basófilas, células pálidas leptomeníngicas (flechas rojas) así como vasos sanguíneos (\*). A: x10; B: x20; C: x40; D: x60; E: x100.

Se observaba una distribución asimétrica de las células Ki67<sup>+</sup>, de forma que aquellas células más próximas a la piamadre presentaban una reducida tasa proliferativa, mientras que aquellas que, formando parte del acúmulo, se hallaban más alejadas de la meninge, presentaban una mayor tasa proliferativa, siendo en su mayoría Ki67<sup>+</sup>. Estos resultados sugieren una sensibilidad diferencial de las células leucémicas a los tratamientos quimioterápicos intratecales dentro del acúmulo (Figura 9A, C). Asimismo, en los espacios perivasculares la mayoría de las células CD19<sup>+</sup> mantenían una baja tasa proliferativa (Figura 9B).

En los acúmulos encontrados adheridos a la meninge también se observaban células leucémicas muertas marcadas mediante la técnica de TUNEL y, al igual que ocurría con las células Ki67<sup>+</sup>, estas células se distribuían principalmente en el centro y límite exterior del acúmulo, alejadas de la piamadre (Figura 9D,

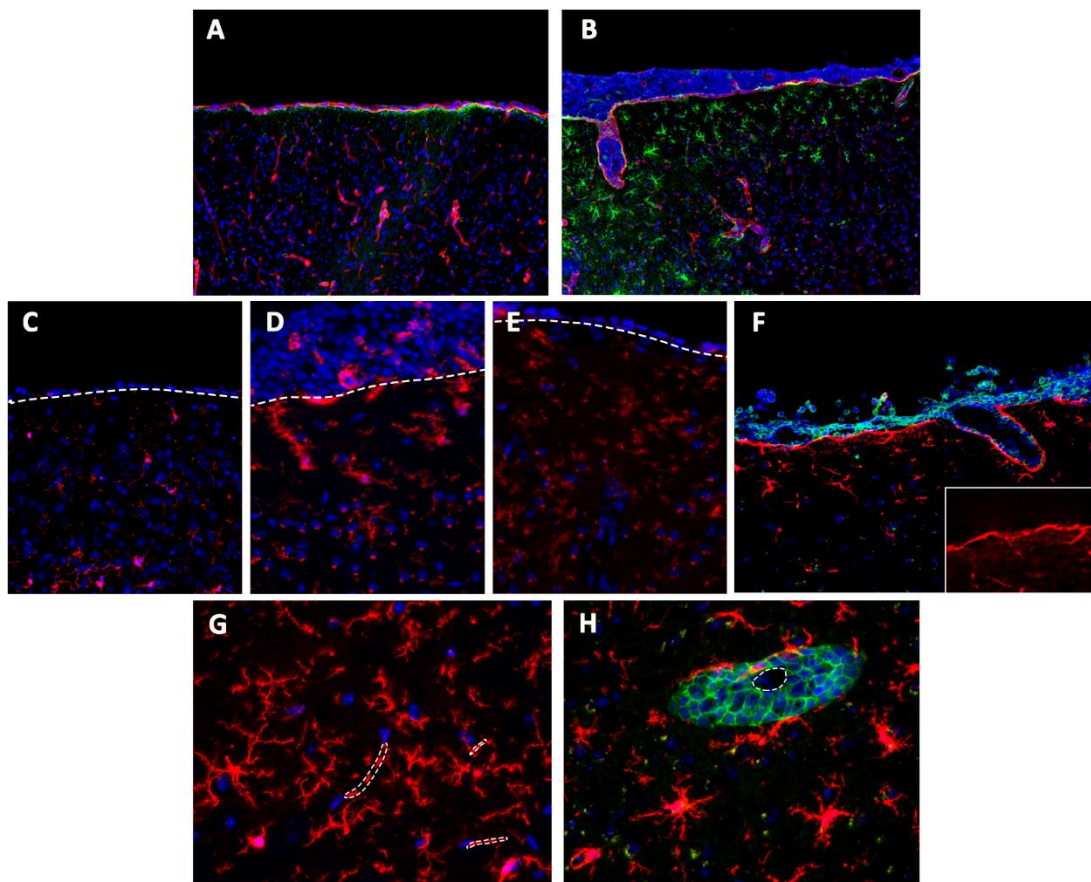
E). En el interior del agregado leucémico, se observaban células fagocíticas Iba-1<sup>+</sup> con restos celulares fagocitados en su citoplasma (Figura 9F-I), tanto entre las células leucémicas como en la periferia de la pared de pequeños vasos sanguíneos menínges localizados en el interior de los mismos.



**Figura 9. Proliferación y muerte de las células leucémicas presentes en los acúmulos adheridos a las leptomeninges.** A-C) Inmunofluorescencia frente a CD19 (rojo) y Ki67 (verde). Se observan células leucémicas CD19+Ki67+ dispuestas principalmente en la parte más alejada de la piamadre mientras que, aquellas más próximas a la leptomeninge son Ki67+ reflejando el diferente estatus proliferativo de las células leucémicas dentro de los acúmulos. Esporádicamente se observan células CD19+Ki67+ en los espacios perivasculares (B) mientras que los blastos presentes en el parénquima son mayoritariamente Ki67+ (C). D-E) Tinción de TUNEL (verde) que pone de manifiesto las células muertas dentro de un acúmulo leucémico dispuesto en este caso, en la piamadre que envuelve el cerebelo. Núcleos marcados con Hoechst (azul). F) Corte semifino donde se observa una célula fagocítica con restos de células muertas en su interior (flecha roja). G-I) Inmunofluorescencia frente a CD19 (verde) e Iba-1 (rojo). Se observan células Iba-1+ distribuidas entre las células leucémicas y en torno a pequeños vasos (flechas blancas). Algunas células Iba-1+ presentan signos de actividad fagocítica (flechas en H). Los núcleos celulares están marcados con Hoechst. A: x20; B-C: x40; D: x10; E: x40; F: X100; G: x20; H-I: x40.

Del mismo modo, como ponían de manifiesto las imágenes de inmunofluorescencia en las zonas donde se localizaban grandes acúmulos leucémicos adheridos a la meninge, era frecuente observar una reacción astrogliar en el parénquima nervioso situado inmediatamente por debajo de los mismos (Figura 10A, B).

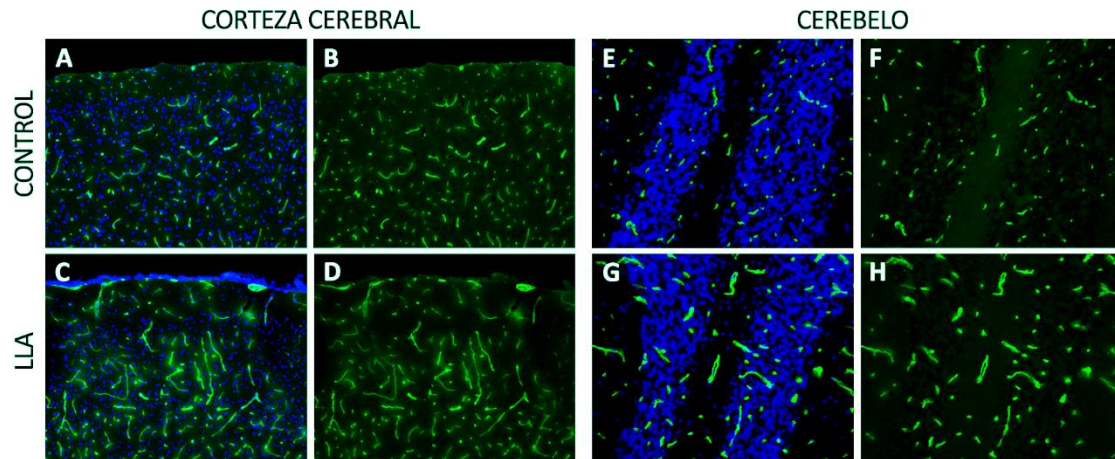
Numerosas células microgliales se localizaban también cercanas a estas mismas regiones meníneas (Figura 10D, E). En algunas ocasiones, en estas localizaciones las células de microglía adquirían una morfología polar que recordaba a la microglía en bastón (Figura 10F). Por otra parte, células de microglía de aspecto ameboide, con prolongaciones más cortas y engrosadas que las que presentaban estas mismas células en los animales sanos estaban presentes en zonas del parénquima próximas a espacios perivascularales ocupados por blastos leucémicos (Figura 10G, H). En general, la respuesta tanto astrogliar como microglial era proporcional al tamaño de los acúmulos (Figura 10).



**Figura 10. Respuesta glial en el parénquima nervioso próximo a los acúmulos leucémicos adheridos a la piamadre.**

**A-B)** Inmunofluorescencia frente a laminina (rojo) y GFAP (verde) en secciones de corteza cerebral de animales control (A) y enfermos (B). Obsérvese la agrupación de células astrogliales GFAP<sup>+</sup> en las capas I y II del cortex cerebral inmediatamente bajo el cúmulo de células leucémicas adherido a la piamadre (B). La limitante glial-pial a este nivel aparece ininterrumpida, formada por un entramado continuo de laminina correspondiente a la membrana basal de la piamadre y otro formado por las proyecciones astrocitarias GFAP<sup>+</sup> similar a la imagen observada en los animales control. **C-H)** Inmunofluorescencia frente a Iba-1 (rojo) y CD19 (verde) en secciones de corteza cerebral (control C y G; enfermos D, E, F y H). Obsérvese las numerosas células Iba-1<sup>+</sup> con soma y proyecciones celulares engrosadas que aparecen inmediatamente debajo de la piamadre (línea discontinua, C-E) adquiriendo en algunos casos una morfología polar (F, detalle). Compárese el aspecto ameboide menos ramificado de la microglía presente en los animales enfermos (H) frente a los animales control (G). Los núcleos celulares se marcaron con Hoechst. A-B: x10; C-F: x20; G-H: x40.

Por otra parte, el marcaje con anticuerpos anti-CD31 puso de manifiesto un incremento notable del tamaño de los vasos sanguíneos presentes en el parénquima nervioso de los animales enfermos respecto a los animales control. Este incremento en el entramado vascular ocurría tanto en las proximidades de la zona meníngea, donde podría existir una influencia directa de las células leucémicas (Figura 11A, D) como en zonas más profundas y alejadas de la meninge (Figura 11E-H, véase también Figura 50).



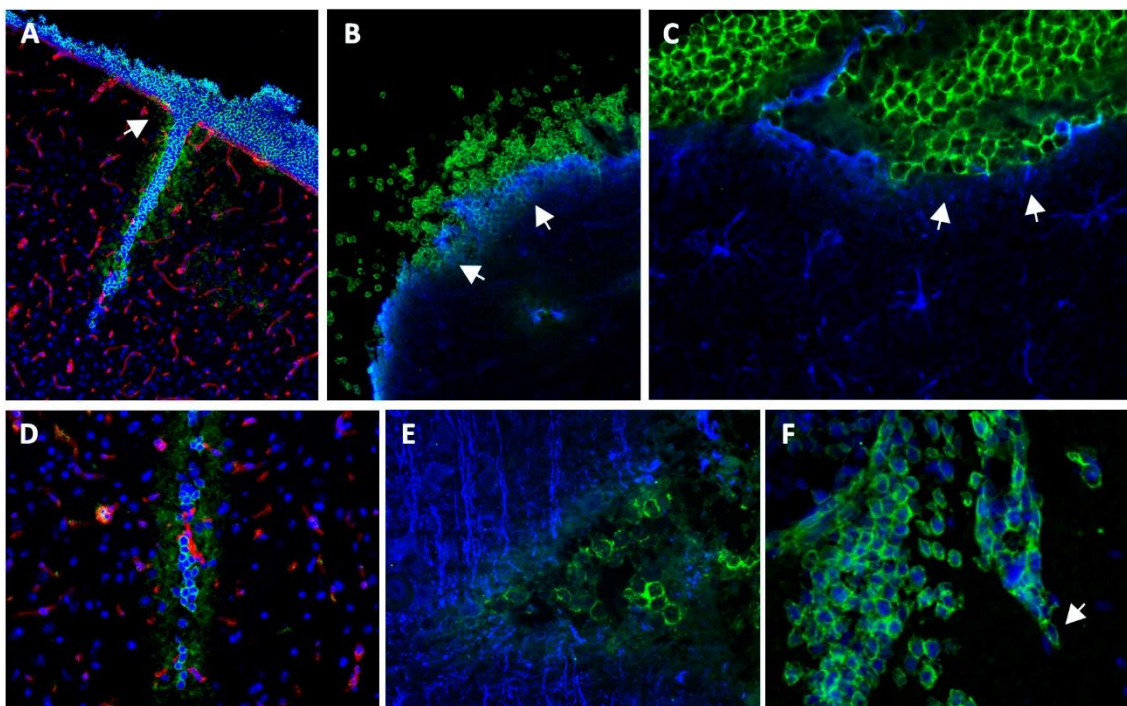
**Figura 11. Cambios en la vasculatura cerebral en animales con infiltración leucémica en el SNC.** Secciones cerebrales de animales sanos y animales que habían desarrollado la enfermedad, fueron teñidas mediante inmunofluorescencia frente a CD31 (verde) y los núcleos marcados con Hoechst (azul). **A-D)** Imágenes representativas de la corteza cerebral de animales sanos (A-B) y animales enfermos (C-D). **E-H)** Imágenes del cerebelo de los animales control (E-F) y animales con LLA (G-H). Las imágenes muestran el marcaje frente a CD31 en combinación con la tinción de núcleos (A, C y E, G) y sin ella (B, D y F, H). A-D: x10; E-H: x20.

## 2. Entrada de las células leucémicas al parénquima nervioso a través de la limitante glial-pial

Si bien las células leucémicas metastásicas presentes en el cerebro se hallaban principalmente en relación con el espacio subaracnoideo y con los espacios perivasculares, la tinción específica con anticuerpos contra el antígeno CD19 reveló la presencia de grupos de células leucémicas penetrando hacia el parénquima, principalmente desde la piamadre y, en menor medida desde el espacio perivascular, en todos los animales estudiados. El estudio histológico indicaba además, que las áreas en las que era más frecuente observar la entrada de las células tumorales desde la piamadre coincidían con las regiones en las que aparecían los grandes acúmulos descritos en el apartado anterior. Aunque el número de células que infiltran el parénquima nervioso variaba entre los animales infundidos con diferentes muestras de LLA-B, en todos los animales trasplantados con la misma muestra primaria, el patrón de infiltración era muy similar.

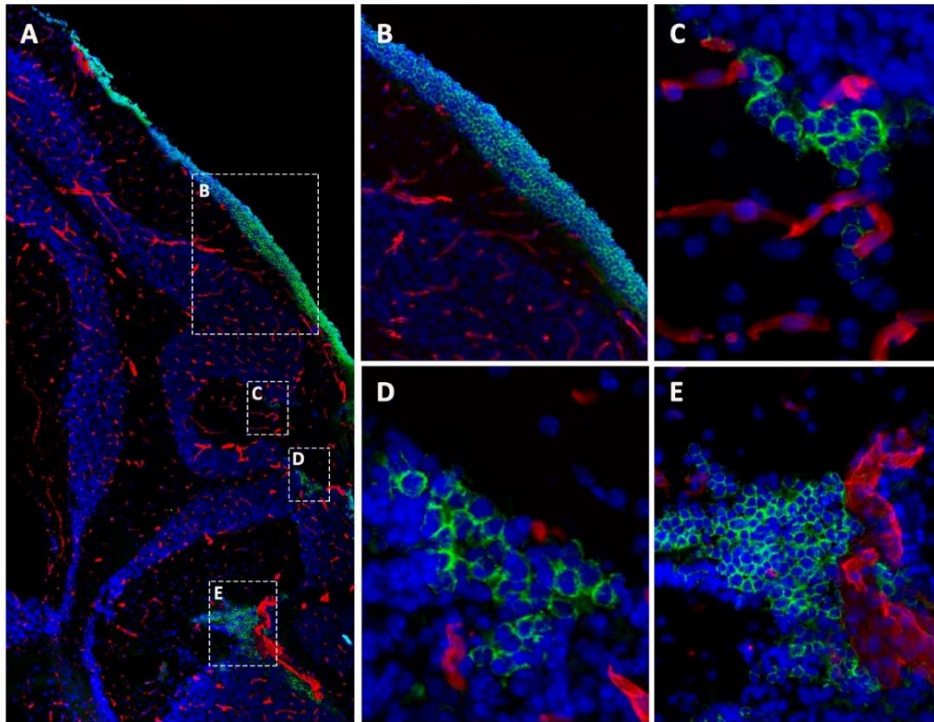
Como se observa en las imágenes de inmunofluorescencia (Figura 12), en las zonas de entrada de las células tumorales, la limitante glial-pial aparecía interrumpida, poniéndose de manifiesto

discontinuidades tanto en la matriz extracelular (laminina, Figura 12A) como en la limitante glial formada por las proyecciones astrocitarias (Figura 12B, C). Es precisamente en estas localizaciones donde las células leucémicas invadían el tejido cerebral hasta alcanzar zonas profundas del parénquima nervioso, discurrendo en muchos casos como cadenas celulares entre los cuerpos neuronales (Figura 12D-F). Si bien éstas se mantenían normalmente restringidas a la sustancia gris, en ocasiones llegaban a alcanzar las capas de neuronas piramidales más profundas en la corteza cerebral. En muchos casos, la morfología irregular de las células leucémicas en el frente de avance indicaba el comportamiento invasivo de éstas (Figura 12F). Asimismo, el estudio del parénquima nervioso puso de manifiesto la presencia de pequeños grupos aislados de células leucémicas CD19<sup>+</sup> en diferentes ubicaciones encefálicas, siendo frecuente su identificación en zonas próximas a las cisuras cerebrales, fundamentalmente a las cisuras interhemisférica o longitudinal, rinal, pontina, hipocámpica y la trasversa (Figura 16). Las imágenes revelaban también la presencia de células tumorales en zonas próximas a los ventrículos laterales, en el entorno de la SVZ (Figura 14). En este caso, cadenas de células leucémicas se disponían entre el SVZ y el bulbo olfatorio, lugar en el que también era muy frecuente encontrar pequeños acúmulos de células leucémicas a nivel de la capa granular (Figura 14F). El impacto de las células leucémicas en el nicho neurogénico será tratado en el apartado 8.

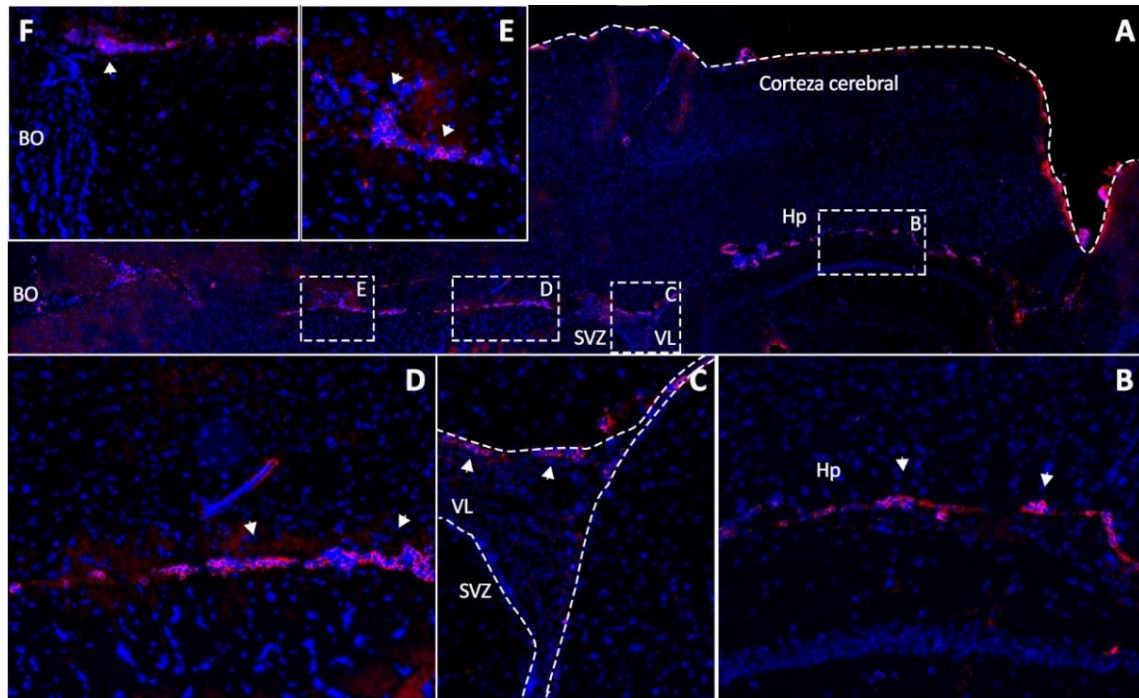


**Figura 12. Invasión del parénquima nervioso por células leucémicas localizadas en la piamadre. A)** Inmunofluorescencia frente a CD19 (verde) y laminina (rojo). Se observa la interrupción de la limitante subpial (flecha) puesta de manifiesto con anticuerpos anti-laminina (rojo) y la invasión de la corteza cerebral por células leucémicas (CD19<sup>+</sup>, verde). **B-C)** Desorganización de la limitante astroglial (GFAP, azul) e invasión de la sustancia gris cortical por las células leucémicas (CD19<sup>+</sup>, verde; flechas). **D)** Cadena de células leucémicas CD19<sup>+</sup> (verde) recorriendo la sustancia gris cortical. Se muestra la lámina basal, puesta de manifiesto con anticuerpos anti-laminina, de los vasos sanguíneos (rojo). **E)** Grupo de células leucémicas CD19<sup>+</sup> (verde) dispuestas entre cuerpos neuronales MAP2<sup>+</sup> (azul). **F)** Morfología

invasiva en las células leucémicas presentes en el frente de avance (flecha) x40. En A, D y F, los núcleos celulares se marcaron con Hoechst. A, B: x10; D: x20; C, E, F: x40;



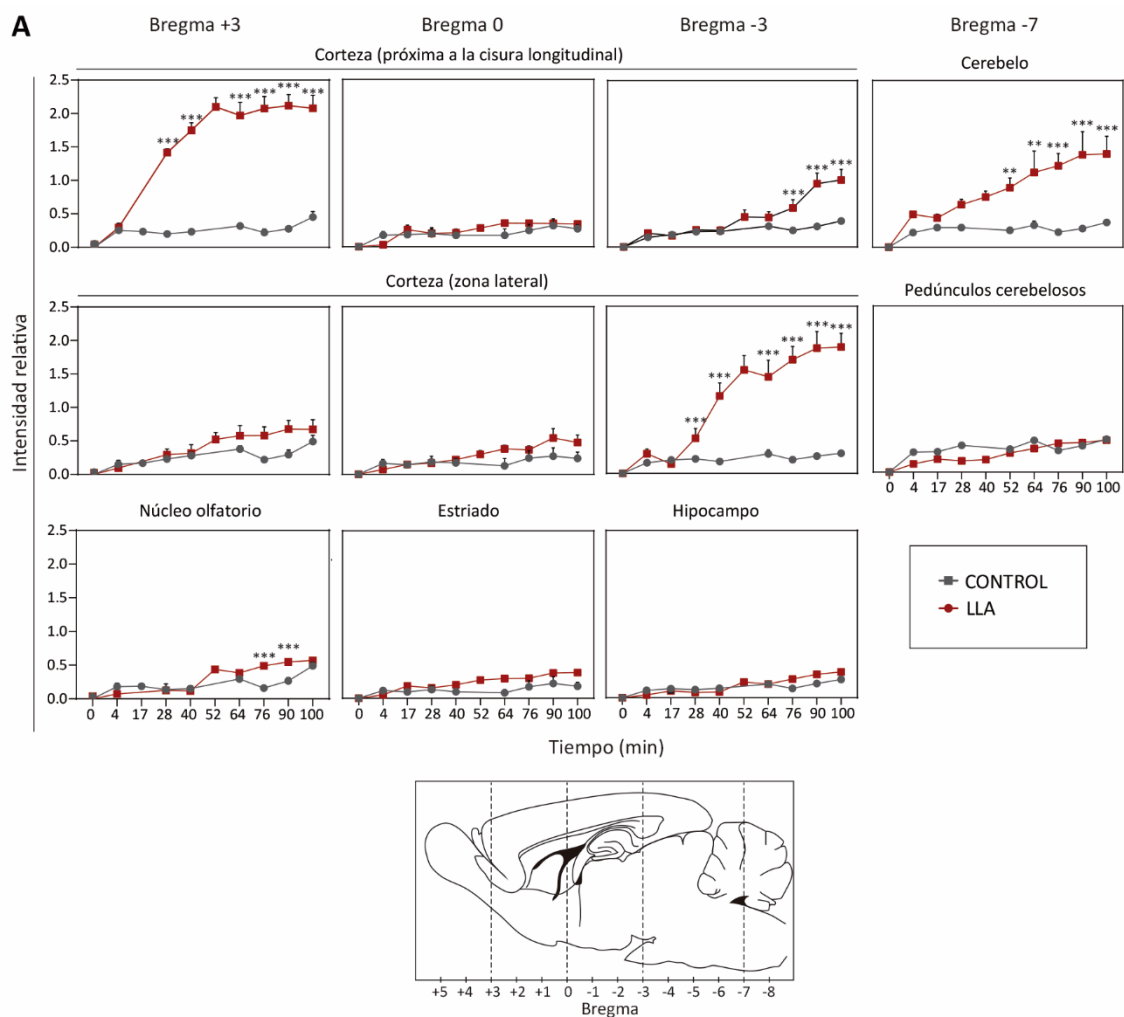
**Figura 13. Infiltración leucémica en diferentes áreas del cerebelo.** Se muestra imagen panorámica (A) y detalles de diferentes zonas del cerebelo marcadas con anticuerpos anti-CD19 (verde), anti-laminina (rojo), y Hoechst para teñir los núcleos celulares. B) Detalle de acúmulo de células leucémicas en la piamadre. C-E) Acúmulos de células leucémicas CD19+ situados en las diferentes capas de la sustancia gris del cerebelo. Obsérvese como aparecen “camufladas”, por ejemplo, entre las células de los granos siendo sólo posible su identificación mediante técnicas de inmunofluorescencia. B, E: x20; C-D: x40

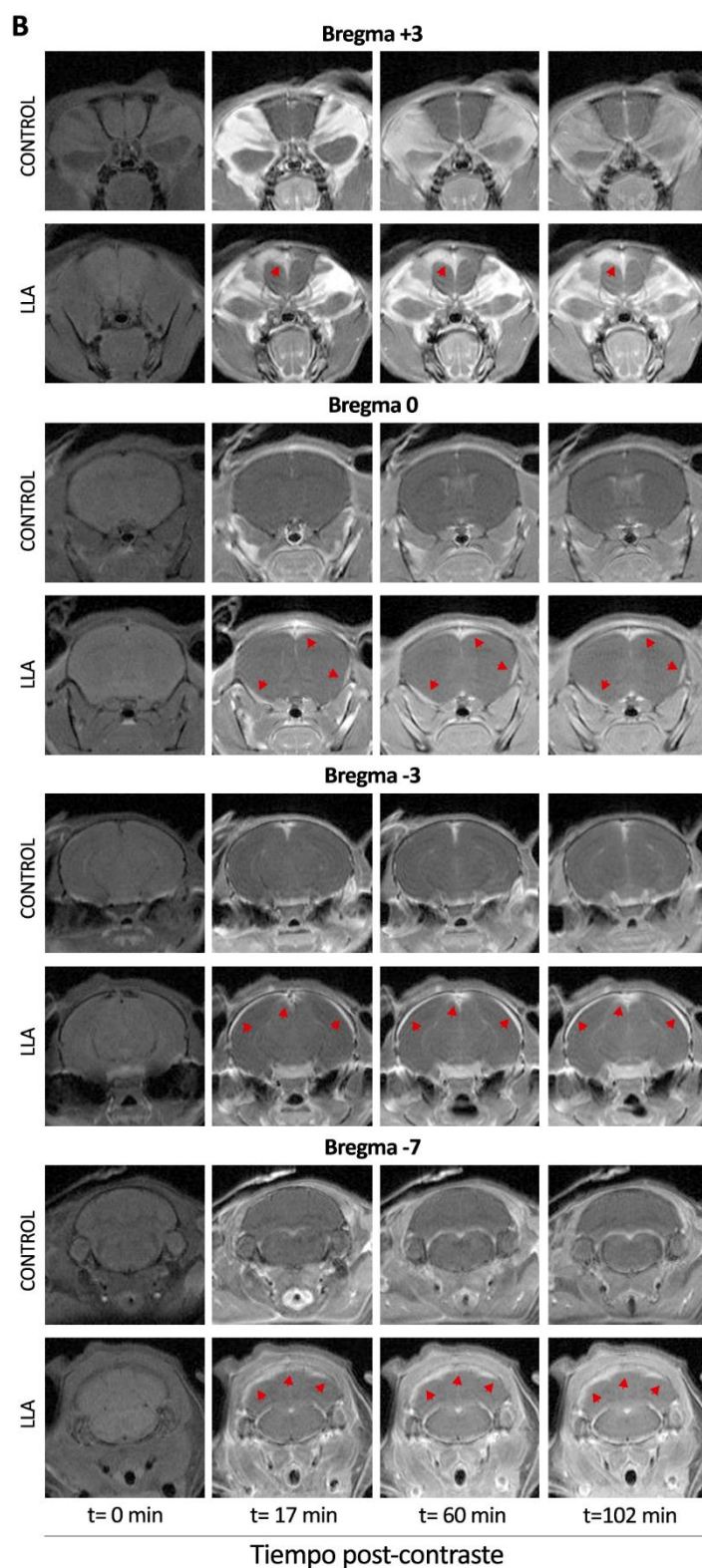


**Figura 14.** La disposición de cadenas de células leucémicas localizadas entre el ventrículo lateral y el bulbo olfatorio recuerda la corriente migratoria rostral seguida por los neuroblastos. Se muestra imagen panorámica y detalles de dicha cadena (A-E) en la que las células leucémicas aparecen marcadas con anticuerpos anti-CD19 (rojo) (flechas). F) Imagen de células leucémicas (flecha) en el bulbo olfatorio. Los núcleos celulares se marcaron con Hoechst. Hp: Hipocampo; SVZ, zona subventricular; VL: ventrículo lateral; BO: bulbo olfatorio. A: reconstrucción fotos x10; B-F: x10.

### 3. Rotura de la barrera glial-pial

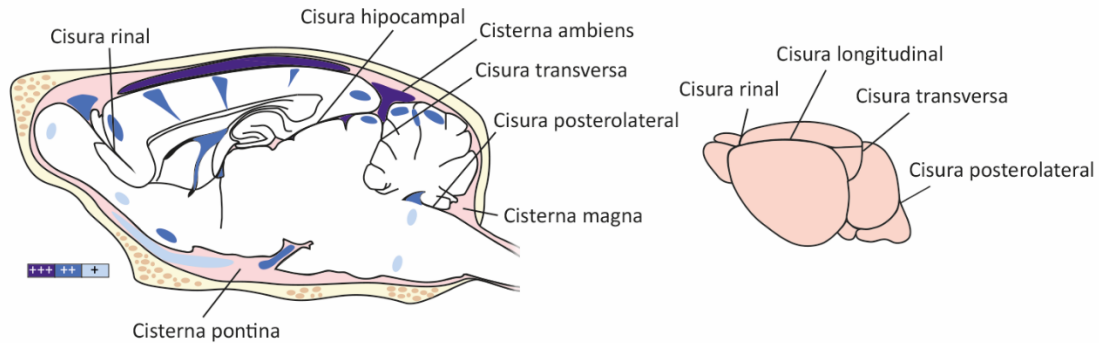
Puesto que los datos histológicos ponían de manifiesto la capacidad de las células leucémicas para penetrar al parénquima nervioso a través de la piamadre nos planteamos comprobar, mediante estudios de resonancia magnética con contraste (IRM-Gd), la existencia de un daño en la barrera glial-pial tras la infiltración leucémica en el SNC. Como se observa en la Figura 15, en el caso de los animales enfermos, el agente de contraste difundía desde la meninge hacia el parénquima nervioso permaneciendo la señal incluso 100 min después. La mayor intensidad de la señal se correspondía con zonas corticales cercanas a la fisura longitudinal, la fisura rinal y a la fisura posterolateral. Estos resultados, en correlación con los datos obtenidos en el estudio de inmunofluorescencia, indican que la infiltración leucémica provoca la rotura de la barrera glial-pial. Por el contrario, no se observó en ningún caso, incremento en la intensidad de la señal en zonas más profundas del parénquima nervioso, sugiriendo el mantenimiento de la integridad de la BHE en los animales enfermos.





**Figura 15. Estudio por resonancia magnética del mantenimiento de la barrera glial pial tras la infiltración leucémica en el SNC. A) Cuantificación de la intensidad de la señal en las diferentes áreas cerebrales indicadas en 5 secciones coronales (Bregma +3, 0, -3 y -7) de cerebro de animales sanos y animales con LLA en diferentes momentos temporales tras la inyección del agente de contraste. Los valores de intensidad están normalizados respecto al t=0 en cada**

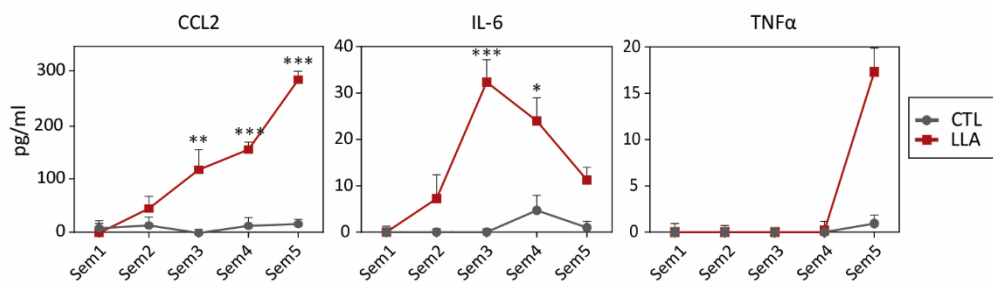
individuo. **B)** Imágenes representativas de resonancia magnética de las 5 secciones coronales analizadas antes ( $t=0$ ) y después de la inyección del agente de contraste en tres puntos de tiempo representativos en animales control y animales enfermos. Nótese el incremento de la intensidad de señal a lo largo del tiempo como consecuencia de la difusión del agente de contraste en las zonas indicadas con las flechas. ( $n=3$  animales por grupo)  $**p\leq 0,01$ ;  $***p\leq 0,001$ .



**Figura 16. Distribución de las células leucémicas en el cerebro.** Esquema representativo de un corte sagital próximo a la cisura longitudinal o interhemisférica. Las diferentes tonalidades azules indican las zonas donde las células leucémicas se encontraban mayoritariamente y con mayor frecuencia, representando el azul oscuro grandes acúmulos de células leucémicas y el azul claro, grupos de 2-10 células. En los esquemas se indican también las principales cisuras y cisternas del cerebro.

#### 4. Respuesta inflamatoria en el SNC como consecuencia de la infiltración leucémica

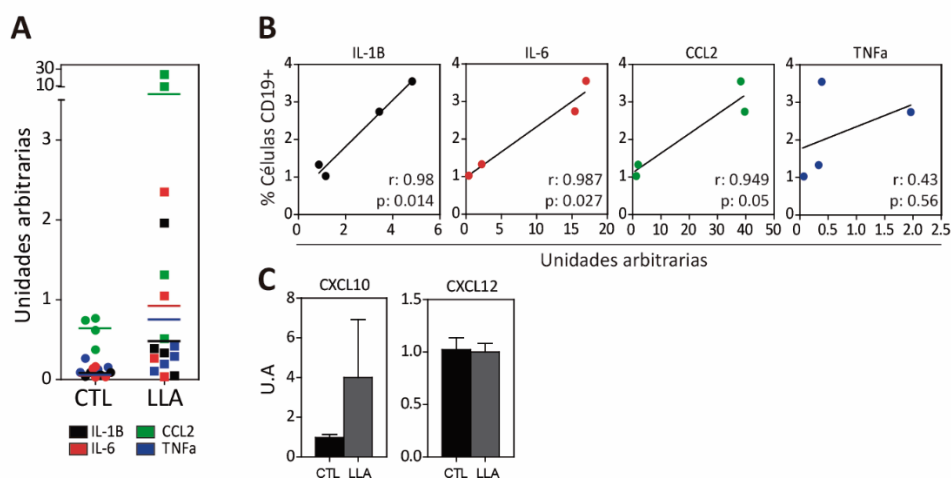
El estudio de los niveles de citoquinas inflamatorias en suero sanguíneo mostraba un incremento progresivo de los niveles de las mismas tras la infusión de células leucémicas (semana 1) en los animales enfermos, a diferencia de los animales del grupo control, en los que los niveles de las mismas eran prácticamente indetectables (Figura 17). En el grupo de animales LLA, mientras que los niveles de CCL2 e IL-6 se incrementaron ya en la primera semana tras la infusión de las células leucémicas, los niveles de TNF- $\alpha$  lo hicieron drásticamente sólo en el momento de la aparición de los síntomas de la enfermedad, en la semana en la que los animales fueron sacrificados, momento en el que también los niveles de CCL2 alcanzaban el máximo (Figura 17). Por el contrario, los niveles máximos de IL-6 en suero se alcanzaron en la tercera semana tras la infusión de las células leucémicas, coincidiendo con un importante incremento de células tumorales en la sangre de estos animales (Figura 17).



**Figura 17.** Evaluación temporal de los niveles de los factores inflamatorios CCL2, IL-6 y TNF- $\alpha$  en el suero de animales control y animales tras la infusión de células leucémicas. El suero sanguíneo de los animales control y los animales que han desarrollado la enfermedad fue obtenido semanalmente y los niveles de las diferentes citoquinas y quimioquinas analizadas por ELISA. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de los niveles de proteína en los diferentes momentos de tiempo analizados. ( $n=4-5$  animales por grupo). \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

En consonancia con la respuesta glial observada en el estudio histológico por inmunofluorescencia, la respuesta inflamatoria era también patente en el SNC, como demostraba el incremento en el ARNm de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y CCL2 en el cerebro de los animales enfermos en el momento del sacrificio (Figura 18A). El aumento de expresión de *Il-1b*, *Il-6* y *Ccl2* observado se correlacionaba directamente con el porcentaje de infiltración de células leucémicas en el SNC como puede observarse en la Figura 18B, sugiriendo la implicación de la infiltración leucémica en la respuesta inflamatoria desencadenada en el SNC.

Además, puesto que datos previos publicados indicaban que los mayores niveles de quimioquinas en el LCR de pacientes le correspondían a CXCL10 y CXCL12<sup>81</sup>, analizamos también los niveles de expresión a nivel de ARNm para dichas quimioquinas en el cerebro completo. Como se observa en la Figura 18.C, mientras que la expresión de *Cxcl12* era similar en el cerebro de animales control y LLA, la expresión de *Cxcl10* estaba incrementada en estos últimos, aunque este aumento no llegaba a ser significativo.

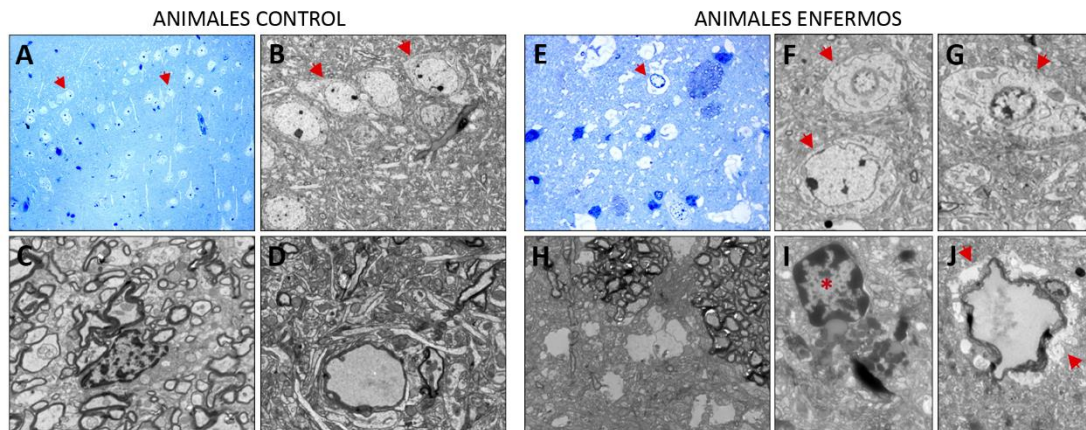


**Figura 18.** Niveles de expresión de ARNm de diferentes citoquinas y quimioquinas en el cerebro de animales control y animales LLA. A) Análisis por PCRq de la expresión de *Il-1b* (negro), *Il-6* (rojo), *Ccl2* (verde) y *Tnfa* (azul) en el cerebro

de animales control y LLA. **B)** Correlaciones entre porcentaje de células CD19<sup>+</sup>, determinados por citometría de flujo, y los niveles de expresión de diferentes factores en el cerebro de animales LLA. **C)** Niveles de expresión de ARNm de las quimioquinas Cxcl10 y Cxcl12 en el cerebro de animales control y animales LLA. (n=4 animales por grupo).

### 5. La infiltración leucémica en SNC provoca muerte neuronal

El estudio mediante microscopía óptica y electrónica de los cortes histológicos de los animales que desarrollaron la enfermedad mostraba la presencia de áreas de la sustancia gris del tejido nervioso con una evidente desorganización de su citoarquitectura (Figura 19), pudiéndose observar también espacios perivasculares dilatados y macrófagos con restos fagocitados en su interior (Figura 19I-J). Además, podían observarse grupos de neuronas muertas, así como fibras nerviosas degeneradas y zonas de edema (Figura 19H, J). Estas zonas de daño se evidenciaban incluso en ausencia de células leucémicas en regiones próximas.



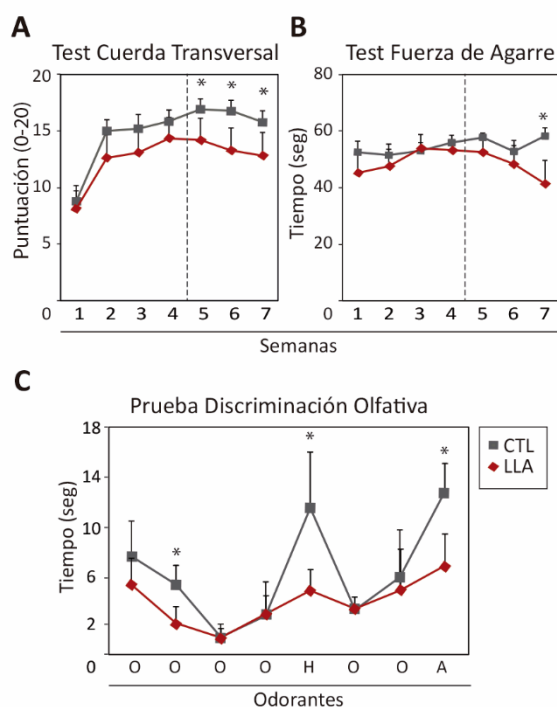
**Figura 19. Estudio histológico del tejido nervioso de animales control (A-D) y enfermos (E-J).** A, E) Cortes seminifinos teñidos con axul de metileno de corteza cerebral de animales control (A) y enfermos (E) donde se pone de manifiesto la desorganización de la citoarquitectura de las capas de neuronas piramidales en estos últimos, así como la presencia de células apoptóticas (flechas). B-C y F-H) Fibras nerviosas degeneradas (H) y somas neuronales apoptóticos (F-G) presentes en la corteza cerebral de animales con infiltración leucémica en el SNC (flechas). D e I-J) Espacios perivasculares dilatados (flechas) y presencia de macrófagos (asterisco) con actividad fagocítica en el tejido nervioso de animales con infiltración leucémica en el SNC. A: x20; B: x3000; C, F: x8000; E: x40; D, G, I: x12000; H: x12000; J: x5000.

### 6. La infiltración leucémica provoca alteraciones sensitivas y motoras

Puesto que los resultados anteriores ponían de manifiesto que la infiltración leucémica en el SNC provocaba un daño neuronal, nos planteamos a continuación analizar las posibles consecuencias funcionales del mismo. Para ello, se evaluaron las capacidades motoras y sensitivas de los animales durante el desarrollo de la enfermedad utilizando diferentes test comportamentales. En este sentido, los animales enfermos que presentaban infiltración en el SNC mostraban, por una parte, una reducción

significativa en la capacidad para mantener el equilibrio (*Tightrope test*) desde el momento en que el injerto era detectable en sangre, y por otra, los animales presentaban una disminución de la fuerza de agarre (*Grip Strength test*) cuando presentaban una importante carga leucémica en sangre (Figura 20A, B). La infiltración de células leucémicas en el parénquima nervioso no sólo provocaba alteraciones en el comportamiento motor de los animales, sino que también eran detectadas disfunciones en su comportamiento olfativo, observándose alteraciones significativas en la capacidad para discriminar los diferentes olores a los que eran expuestos (Figura 20C).

No se obtuvieron, por otra parte, diferencias significativas entre animales control y animales a los que se les habían infundido las células leucémicas pero que estas no habían injertado.



**Figura 20. Diferentes test comportamentales ponen de manifiesto alteraciones sensitivas y motoras en los animales como consecuencia de la infiltración leucémica en el SNC.** **A)** La capacidad para mantener el equilibrio se analizó semanalmente con el test de la cuerda transversal. En la gráfica se muestra la media  $\pm$  desviación estándar de la puntuación otorgada a cada animal. **B)** La fuerza de agarre de los ratones se valoró en función del tiempo (segundos) que cada individuo conseguía mantenerse suspendido de una rejilla a la que se había agarrado previamente. La gráfica muestra la media  $\pm$  desviación estándar del tiempo en cada grupo de animales. La línea discontinua indica el momento en el que la mayoría de los animales empezaron a presentar injerto en sangre y empiezan a mostrar los primeros síntomas de la enfermedad. **C)** Prueba de discriminación olfativa. Se evaluó la capacidad de los animales que desarrollaban la enfermedad para discriminar diferentes estímulos olorosos, no observándose un incremento en el tiempo de exploración cuando se exponía a estímulos nuevos. La

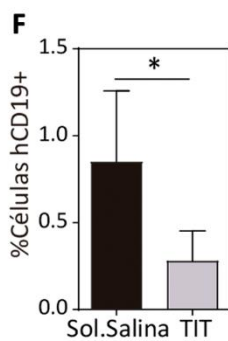
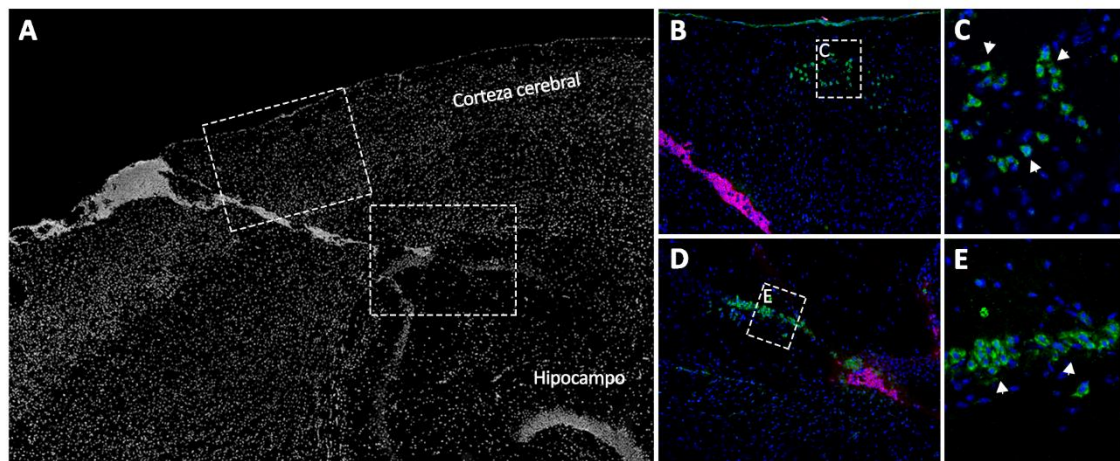
gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar del tiempo empleado por el conjunto de ratones de cada grupo en la exploración de bastoncillos de algodón impregnados con diferentes odorantes: octanal (O), heptanal (H) y anisole (A) en la quinta semana post-trasplante ( $n=5-7$  animales por grupo)  $*p \leq 0,05$ .

## 7. Las células leucémicas que alcanzan el parénquima nervioso son resistentes a los tratamientos quimioterápicos utilizados en la terapia intratecal

Para conocer si las células leucémicas que alcanzan el parénquima nervioso son resistentes a los fármacos utilizados en el tratamiento quimioterápico, ratones a los que se les habían infundido células leucémicas

primarias o células de la línea Nalm6, fueron inyectados intratecalmente con metrotexato, citarabina e hidrocortisona (TIT) cuando aparecían los primeros síntomas de la enfermedad y tras haber comprobado el injerto en sangre. Los ratones fueron sacrificados 48 horas después y los hemisferios cerebrales procesados para su análisis por citometría de flujo y para estudios histológicos mediante inmunofluorescencia.

La cuantificación por citometría de flujo puso de manifiesto una reducción significativa en el porcentaje de células leucémicas presentes en el cerebro de los animales que habían sido tratados con quimioterapia intratecal frente a los controles inyectados con solución salina (Figura 21F). El estudio de las secciones criocongeladas reveló, sin embargo, que las células leucémicas infiltradas en el parénquima nervioso eran mayoritariamente negativas para el marcador de muerte, caspasa 3, (Figura 21B, D), sugiriendo la quimiorresistencia de estas células. Por el contrario, pequeños grupos de neuronas caspasa 3 positivas eran detectados en regiones cercanas a las zonas de infiltración leucémica (Figura 21C, E).



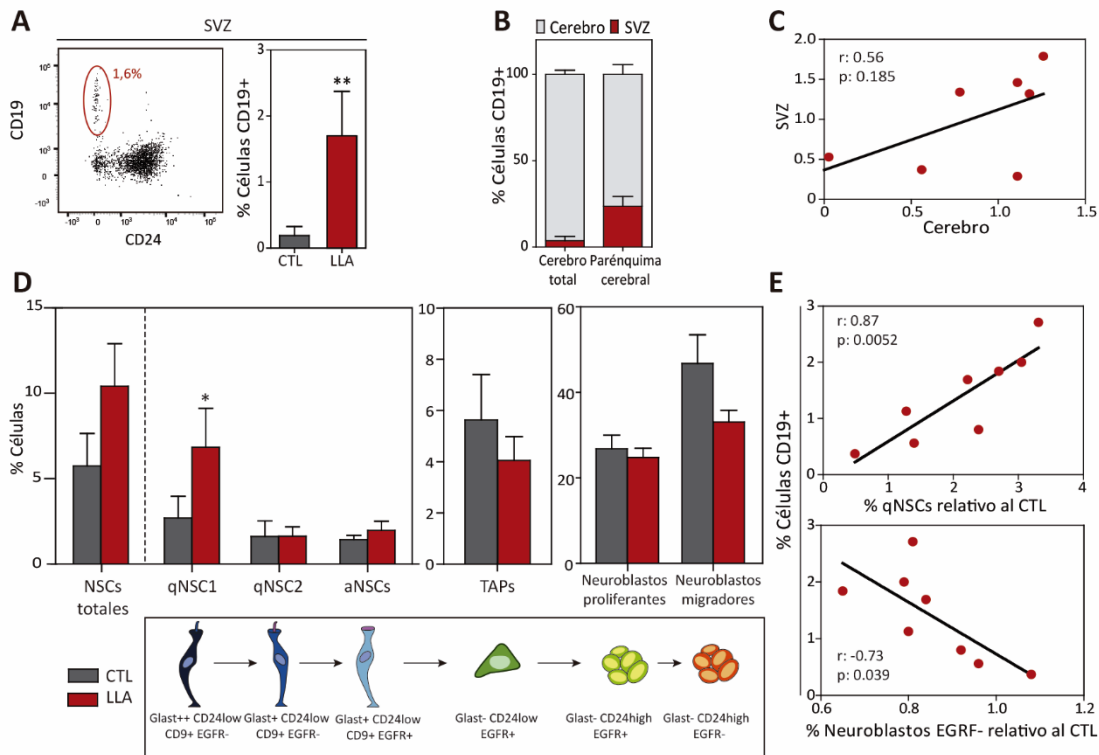
**Figura 21** Las células leucémicas que infiltran el parénquima nervioso son quimiorresistentes. **A)** Imagen panorámica y detalles de diferentes zonas de la corteza cerebral con infiltración leucémica en la que los núcleos se muestran en blanco. **B)** Presencia de células muertas (caspasa-3+, verde) (detalle en **C**) en la corteza cerebral próxima al acúmulo de células leucémicas, marcadas con anticuerpos anti-CD19 (rojo) y negativas para caspasa-3. **D)** Localización de células marcadas con anticuerpos anti-caspasa 3 (verde)(detalle en **E**) en las proximidades del hipocampo y, de nuevo cercanas a un acúmulo de células tumorales (caspasa 3-) **F)** Porcentaje de células leucémicas en animales enfermos y tratados con TIT o con suero salino. La gráfica representa la media de 4 animales por grupo. A, B, C y E:x10; D y F:x40.

## 8. El nicho neurogénico aloja células leucémicas. Impacto en la neurogénesis

Dado que los estudios de inmunofluorescencia ponían de manifiesto que algunas células leucémicas que invaden el parénquima nervioso serían capaces de alcanzar las proximidades del nicho neurogénico de la

SVZ (apartado 2), nos planteamos estudiar esta región en los animales que desarrollaban la enfermedad a partir del trasplante con células Nalm6. Para ello llevamos a cabo diferentes aproximaciones experimentales ampliamente utilizadas en estudios de neurogénesis. El estudio por citometría de flujo de células procedentes de la disgregación de la SVZ, puso de manifiesto que el 100% de los animales enfermos con infiltración leucémica en el SNC, presentaba células leucémicas CD19<sup>+</sup> en esta localización. Las células localizadas en el SVZ representaban entre un 1,4 y un 6,6% del total de células infiltradas en el SNC. Este rango alcanzaba hasta un 6-28% cuando se eliminaban, mediante sucesivos lavados, las células leucémicas presentes en las meninges (localización mayoritaria) considerándose entonces como células totales infiltradas, sólo las que habían invadido el parénquima nervioso, así como las que alcanzaban los ventrículos (Figura 22A, B). Por otra parte, no se observó una correlación entre la infiltración de células CD19<sup>+</sup> en el total del cerebro y el porcentaje de células leucémicas presentes en la SVZ (Figura 22C). Estos resultados apuntan a la SVZ como un microambiente donde las células leucémicas pueden mantenerse y sobrevivir.

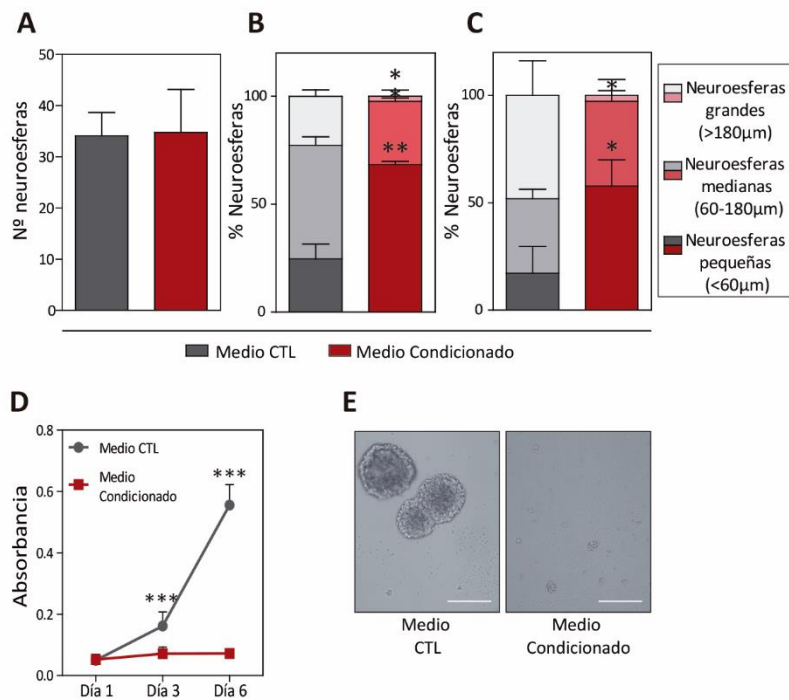
Si bien la mayor parte de las neuronas son generadas antes del nacimiento, nuevas células son generadas continuamente en áreas concretas del cerebro, al menos, en los años previos a la adolescencia. En este periodo de vida, todos los estudios publicados demuestran la presencia de neuronas inmaduras<sup>135, 136</sup>. Por lo tanto, y a tenor de los resultados descritos anteriormente en el modelo *in vivo* de LLA infantil que indican que la infiltración del nicho neurogénico es un evento común, nos planteamos analizar el impacto de esta infiltración leucémica sobre la diferenciación neurogénica de las NSCs presentes en la SVZ. Como puede observarse en la Figura 22D, el porcentaje de NSCs aisladas de la SVZ de estos animales fue significativamente superior en los animales enfermos siendo la población de células neurales más quiescentes (qNSC1) la responsable de dicho incremento. En correlación, los progenitores intermedios de rápida amplificación (TAPs) y los neuroblastos proliferantes (EGFR<sup>+</sup>) se encontraban reducidos en estos animales. Esta inhibición de la neurogénesis en los animales enfermos parecía consecuencia directa de la infiltración de células leucémicas en la SVZ ya que los animales más afectados eran aquellos que presentaban porcentajes mayores de células CD19<sup>+</sup> en el nicho como puede observarse en la Figura 22E que se correlacionan directamente con el porcentaje de qNSC e inversamente con los neuroblastos migradores.



**Figura 22. Las células leucémicas alcanzan la zona subventricular y provocan cambios en las poblaciones del nicho neurogénico. A)** El análisis por citometría de flujo de la SVZ revela la presencia de células leucémicas CD19<sup>+</sup> en los animales trasplantados con células Nalm6. **B)** Porcentaje de células Nalm6 en la SVZ respecto al total de células cuantificadas en el cerebro eliminando o no las células adheridas a la meninge que no han penetrado en el parénquima nervioso. **C)** Análisis de correlación entre el porcentaje de células leucémicas en la SVZ y el porcentaje en cerebro ( $p=0,185$ ; no significativo). **D)** Las diferentes poblaciones del nicho fueron analizadas mediante citometría de flujo en la SVZ aislada de los animales LLA y los animales CTL. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar de los porcentajes de las diferentes poblaciones. El esquema muestra los marcadores que definen cada una de las poblaciones analizadas (Modificado de Codega et al. 2014).  $*p \leq 0,05$ . **E)** Correlación positiva entre el porcentaje de infiltración en la SVZ y la población de NSCs más quiescentes (qNSC1) y negativa entre las células CD19<sup>+</sup> y el porcentaje de neuroblastos migradores (EGFR<sup>-</sup>). El porcentaje de qNSCs y de neuroblastos representados fueron relativizados respecto al grupo control (% de células en los animales LLA/ Media del % de la misma población en el grupo CTL). (n= 8 animales por grupo).

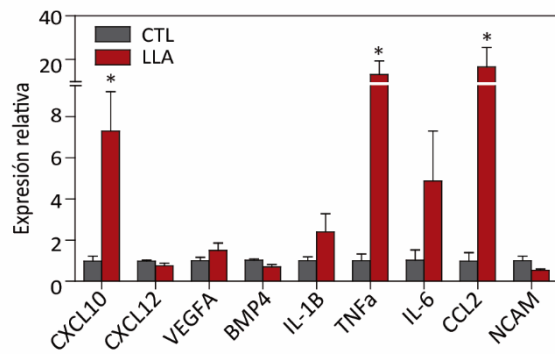
Para confirmar que eran las células leucémicas presentes en la SVZ las responsables directas de la inhibición de la neurogénesis se establecieron co-cultivos entre las NSCs aisladas de ratones sanos y células leucémicas Nalm6, observándose una reducción significativa en el diámetro, aunque no en el número, de las neuroesferas formadas (Figura 23A, B, E). Los ensayos de proliferación realizados en estas condiciones indicaban una disminución de la proliferación de las NSCs manteniéndose viables (Figura 23D) lo que sugería que las células leucémicas regulaban negativamente la autorrenovación de éstas. Apoyando esta idea, al realizar un ensayo de autorrenovación secundaria las células pre-tratadas con el medio condicionado dieron lugar, de nuevo, a neuroesferas con un tamaño significativamente inferior al

que presentan las NSCs que no habían sido pre-tratadas con el medio condicionado por las células leucémicas (Figura 23C).



**Figura 23. Ensayos de neuroesferas. Efecto del medio condicionado por Nalm6.** NSCs aisladas de la SVZ de 3 animales fueron sembradas en presencia o ausencia de medio condicionado por las células leucémicas Nalm6. **A)** Cuantificación del número de neuroesferas formadas en las dos condiciones tras 6-7 días de cultivo. **B)** Análisis del tamaño alcanzado por las neuroesferas en presencia del medio condicionado. La gráfica muestra la proporción de neuroesferas según su diámetro (grandes:  $\geq 180 \mu\text{m}$ ; medianas:  $60-180 \mu\text{m}$ ; y pequeñas:  $\leq 60 \mu\text{m}$ ). **C)** Las neuroesferas formadas en presencia o ausencia del medio condicionado fueron disgregadas y las células obtenidas sembradas de nuevo en un ensayo de autorrenovación secundaria; en este caso con el medio de cultivo característico para las NSCs fresco. Los datos representan la proporción de neuroesferas en el cultivo tras 6-7 días en función de su diámetro. **D)** Proliferación de las NSCs en condiciones control y con el medio condicionado, analizado mediante ensayos MTS. **E)** Imágenes representativas de los cultivos de NSCs tras 6-7 días con el medio control o con el medio condicionado por las células leucémicas. Las barras de escala representan  $100 \mu\text{m}$ . Las gráficas muestran la media  $\pm$  desviación estándar de los datos obtenidos con neuroesferas generadas a partir de 3 animales y sembradas en 5-9 pocillos por condición. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

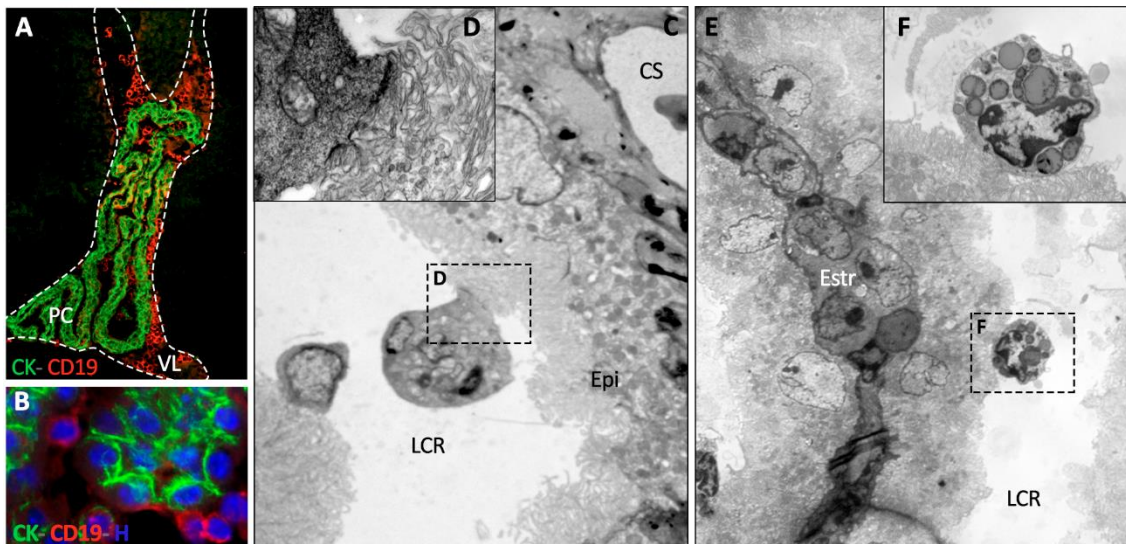
Puesto que los resultados anteriores ponen de manifiesto que el nicho neurogénico es colonizado por las células leucémicas que infiltran el cerebro, analizamos cómo la presencia de estas últimas altera el microambiente neurogénico. Como puede observarse en la Figura 24 la presencia de las células leucémicas provocaba un incremento en el ARNm de las citoquinas inflamatorias *IL-1 $\beta$* , *IL-6* y *TNF $\alpha$*  en la SVZ de forma similar a lo descrito en el apartado anterior en el cerebro completo. Nuevamente, se observaba una correlación entre el porcentaje de infiltración y la expresión de dichas citoquinas.



**Figura 24. Incremento de los niveles de expresión de diferentes factores en la SVZ de los animales con infiltración leucémica en cerebro.** Análisis mediante PCRq de la expresión de citoquinas inflamatorias, quimioquinas y otros factores característicos implicados en el mantenimiento del nicho neurogénico. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la expresión génica relativa a la de los animales control de 4-5 animales por grupo. \* $p < 0,05$ .

## 9. Localización de células leucémicas en los ventrículos cerebrales

Además de en el espacio subaracnoideo, las células leucémicas también estaban presentes en los ventrículos encefálicos en aquellos animales que presentaban infiltración leucémica en el SNC. Las imágenes de inmunofluorescencia revelaban que, si bien se observaban células leucémicas en suspensión en el LCR, estas células aparecerían mayoritariamente asociadas a la cara apical del epitelio del plexo coroideo (Figura 25A, B). Una estrecha interacción entre la membrana plasmática de la célula epitelial del mismo y la de la célula leucémica era evidente en las micrografías de microscopía electrónica (Figura 25C-F). Esporádicamente, en la cara apical del epitelio de plexo coroideo también se observaban células de Köhler repletas de vesículas de LCR pero sin signo alguno de fagocitosis de células leucémicas (Figura 25E, F).



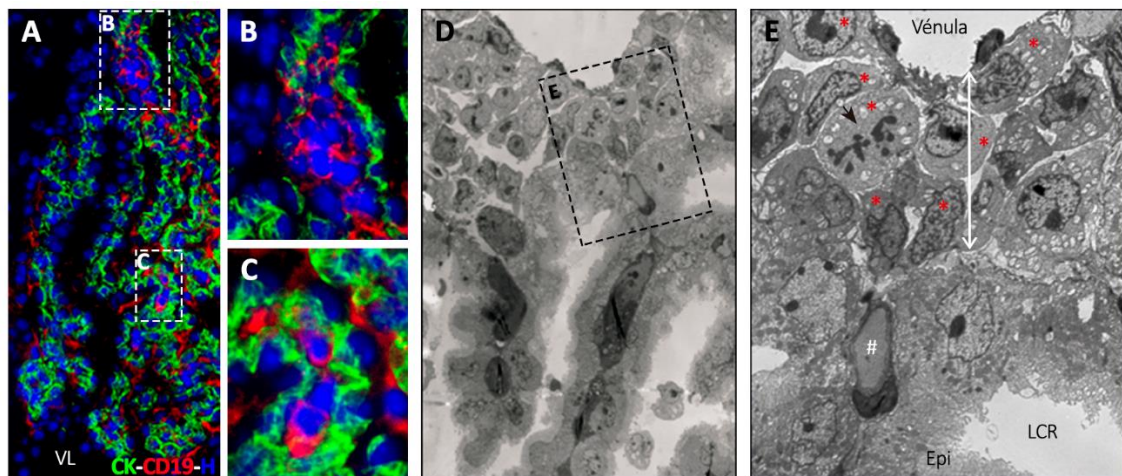
**Figura 25. Localización de células leucémicas en el líquido cefalorraquídeo en contacto directo con el plexo coroideo.** **A)** Panorámica del ventrículo lateral (VL). La línea discontinua indica el límite del mismo poniendo de manifiesto la presencia de células tumorales (rojo) en las proximidades del plexo coroideo (PC) en contacto con el epitelio del mismo (citoqueratina, verde) **(B).** **C-F)** Imágenes de microscopía electrónica en las que se muestran blastos leucémicos en el líquido cefalorraquídeo (LCR)(C) estableciendo contacto con las células epiteliales (D), así como la presencia de células

de Kölmer con vesículas en su interior en la cara apical del epitelio del plexo (E, F). Epi: Epitelio plexo coroideo; Estr: estroma plexo coroideo; CS: capilares sanguíneos. A:x10; B:x40; C:x6000; D: x15000; E: x3000; F: x15000.

## 10. El estroma del plexo coroideo es invadido por células leucémicas

En el 30% de los animales que presentaban infiltración leucémica se observaban además pequeños grupos de células leucémicas CD19<sup>+</sup> en el estroma de los plexos coroideos, principalmente en la zona de anclaje de los mismos (Figura 26). El tejido conjuntivo laxo presente en estas zonas deriva de la protusión papilar de las leptomeninges hacia el interior de la cavidad ventricular y está muy vascularizado. Aquí, las células leucémicas se alojaban entre la lámina basal de los capilares fenestrados y vénulas y la del epitelio del plexo, como se observa en las imágenes de microscopía electrónica. Algunos de los blastos leucémicos presentes en esta zona se encontraban incluso en mitosis (Figura 26E).

Si bien todos los animales a los que se les infundía la misma muestra primaria de LLA, como se ha señalado en apartados anteriores, presentaban un comportamiento similar en cuanto a los porcentajes de infiltración leucémica en el SNC, la presencia de células leucémicas en el estroma del plexo fue independiente de la muestra de LLA. En este sentido, sólo en un porcentaje, entre el 20-50%, de los animales a los que se les infundía células de una misma muestra primaria encontramos infiltración leucémica en el estroma conjuntivo del plexo coroideo.



**Figura 26. Presencia de células leucémicas en el estroma del plexo coroideo.** Estudio mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de la localización de las células leucémicas en el plexo coroideo. **A)** Imagen panorámica del plexo coroideo del ventrículo lateral (VL) con células tumorales (rojo) en el estroma **(B-C)**. **D-E)** Acumulación de células leucémicas (\*) en el espacio perivascular (flecha) entre las láminas basales del endotelio de la vénula y del epitelio del plexo coroideo. Presencia de células en división celular (flecha negra). Epi: Epitelio plexo coroideo; LCR: Líquido cefalorraquídeo; # vaso sanguíneo. A: x10; B-C: x20 D: x15000, E: x4000.

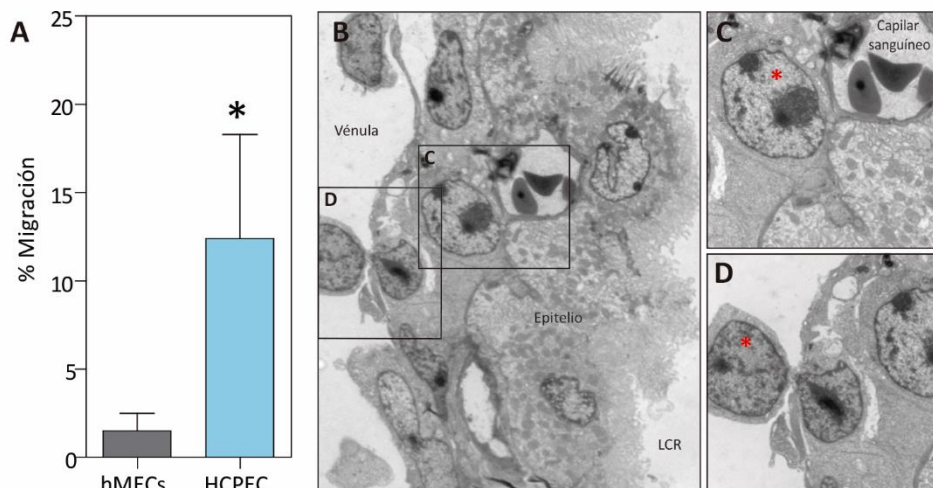
A continuación, nos planteamos analizar la llegada de las células leucémicas a este estroma conjuntivo. Puesto que el plexo coroideo representa una de las estructuras donde la BHE como tal está ausente, las

## Resultados

células leucémicas podrían alcanzar el estroma conjuntivo migrando a través de este lecho vascular menos restrictivo que incluye capilares fenestrados y vénulas.

Para ello analizamos comparativamente, en un ensayo *in vitro*, la migración de las células leucémicas a través del endotelio del plexo coroideo y del endotelio del parénquima nervioso. Si bien en este último caso, un número muy pequeño de células leucémicas migraba a través de la monocapa endotelial tras 4 horas de cultivo, hasta un 11% de las células leucémicas eran capaces de atravesar la monocapa de células endoteliales del plexo en este mismo periodo de cultivo, poniendo así de manifiesto la mayor permisividad de estos endotelios al paso de células, incluidas las células tumorales (Figura 27A).

El estudio *in vivo* utilizando el modelo xenogénico de LLA también apoyaba la hipótesis de que las células migran desde el torrente circulatorio hacia el estroma del plexo coroideo. Como se observa en la micrografía, en los animales con infiltración leucémica en el SNC era posible observar células de aspecto linfocítico transitando entre el lecho vascular del plexo y el estroma del mismo (Figura 27B-D).

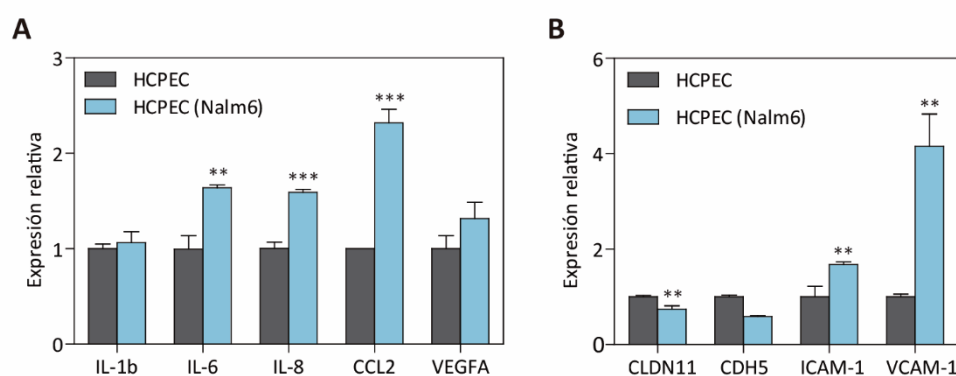


**Figura 27. Las células leucémicas atraviesan el endotelio de los capilares del plexo coroideo. A)** Células de la línea leucémica Nalm6 fueron sembradas sobre una monocapa de células endoteliales del plexo coroideo (HCPEC) o de células endoteliales de la microvasculatura cerebral (hMECs) adherida la membrana transwell (poro de 5µm de diámetro). Tras 4 horas de co-cultivo, las células que habían atravesado la monocapa fueron cuantificadas mediante citometría de flujo. La gráfica muestra la media ± desviación estándar del porcentaje de células Nalm6 que migran a través del endotelio del plexo coroideo en comparación con las que migran a través del endotelio cerebral en tres experimentos independientes (\* $p \leq 0.05$ ). **B-D)** Las imágenes de microscopía electrónica muestran la localización de células leucémicas (\*) en el estroma del plexo coroideo, en las proximidades de los capilares (C), así como atravesando el endotelio de la vasculatura allí presente (D). B: x5000; C-D: x12000.

Para evaluar cuáles eran las modificaciones sufridas por el endotelio del plexo que pudieran justificar los elevados números de células leucémicas capaces de migrar a su través, se establecieron co-cultivos en transwell de células endoteliales primarias del plexo coroideo humano y células de la línea Nalm6. En

estos, se llevó a cabo el análisis comparativo de la expresión en el endotelio de diferentes moléculas en presencia o ausencia de la línea leucémica.

La presencia de las células leucémicas inducía en este endotelio una expresión incrementada de citoquinas inflamatorias, así como de la quimioquina *CCL2* (Figura 28A). En consonancia con este microambiente inflamatorio, observamos una inducción significativa de las moléculas implicadas en la adhesión leucocito-endotelio, como son *VCAM-1* e *ICAM-1* acompañada de una significativa reducción de la expresión de aquellas moléculas implicadas en las uniones ocludens (Claudina11, *CLDN11*) y adherens (VE-Cadherina, *CDH5*) entre células endoteliales (Figura 28B). El conjunto de cambios experimentados por el endotelio en presencia de las células leucémicas facilitaría la migración paracelular de estas últimas a través de los capilares del plexo coroideo para alcanzar el estroma conjuntivo.

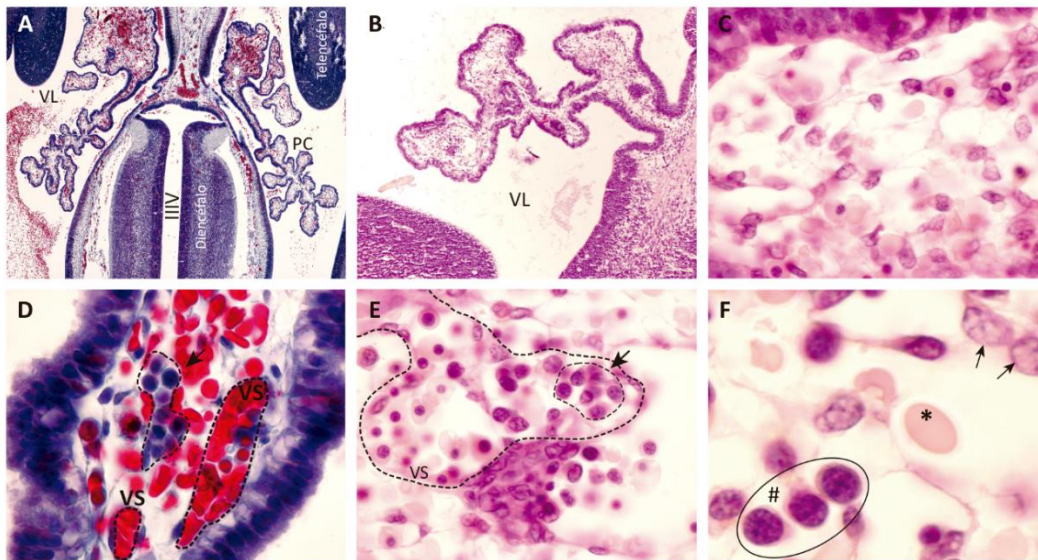


**Figura 28. Cambios en el perfil de expresión de las células endoteliales del plexo coroideo por la presencia de las células leucémicas.** Las células endoteliales del plexo coroideo (HCPEC) se cultivaron en presencia o ausencia de la línea leucémica Nalm6 durante 12 horas. **A)** A continuación, se llevó a cabo el análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de las citoquinas inflamatorias (IL-1b, IL-6, IL-8), así como de CCL2 y VEGFA, representados en la gráfica. **B)** También se cuantificaron los niveles de ARNm de las moléculas de uniones intercelulares (CLDN11, CDH5) y las moléculas de adhesión (ICAM1, VCAM1). Se muestra la media ± desviación estándar (3-5 experimentos) de la expresión en células endoteliales de los diferentes genes tras el co-cultivo con células leucémicas relativa a la expresión obtenida en los cultivos control. Los niveles de expresión génica fueron normalizados frente a la expresión de *GNB2L1* (\*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

## 11. Caracterización del estroma conjuntivo del plexo. Respuesta a la presencia de células leucémicas

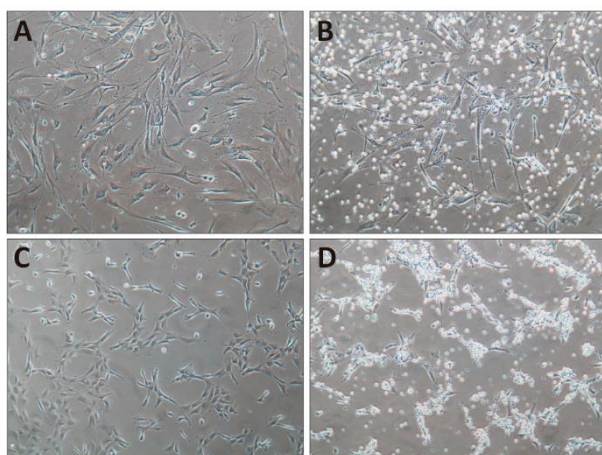
Los resultados anteriores sugieren que el estroma conjuntivo del plexo podría representar un nicho idóneo para el asentamiento de las células leucémicas en el cerebro. En este sentido, las primeras descripciones histológicas del desarrollo del plexo coroideo humano revelaban la existencia de hematopoyesis en el estroma conjuntivo del mismo entre las semanas 6-8 de desarrollo<sup>185</sup> (Colección de Groninger). Dado que nuestra facultad alberga una de las embriotecas mejor conservadas del mundo (Colección del Instituto de Embriología de la Universidad Complutense de Madrid), nos planteamos corroborar este extremo con las preparaciones histológicas de dicha colección. Encontramos pequeños

clusters de células que recuerdan a los islotes de hemangioblastos presentes en el saco vitelino o en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM), en el esbozo mesenquimal del plexo coroideo de los ventrículos laterales, en embriones de 6-7 semanas de desarrollo (Figura 29). Estas observaciones sugieren que, puesto que el estroma del plexo coroideo tiene las características para albergar células del linaje hematopoyético, podría constituir un microambiente favorable para albergar células leucémicas una vez que éstas alcanzaran el cerebro.



**Figura 29. Nichos hematopoyéticos en el estroma del plexo coroideo de los ventrículos laterales.** Estudio histológico del plexo coroideo humano en la semana 7 de desarrollo embrionario. **A-B)** Panorámica en la que se observa el esbozo de plexo coroideo en los ventrículos laterales (VL). **C)** Tejido mesenquimal característico del esbozo del estroma del plexo donde se pueden observar células de núcleo pálido correspondientes a células mesenquimales fibroblásticas. **D-E)** Islotes de células basófilas (flechas), que recuerdan a los islotes de hemangioblastos presentes en el saco vitelino. Nótese el íntimo contacto de estas células con la pared de capilares y vénulas (VS) presentes en el estroma del plexo, así como la presencia de células eritroides nucleadas. **F)** Detalle de células basófilas (#) en las que destaca un núcleo redondeado, basófilo, rodeado por un escaso citoplasma que recuerda a células del linaje hematopoyético. Eritrocitos (\*), células estromales (flechas). Azán (A y D); H-E (B, C, E, F). x4 (A); x10 (B); x20 (C-E); x40 (F).

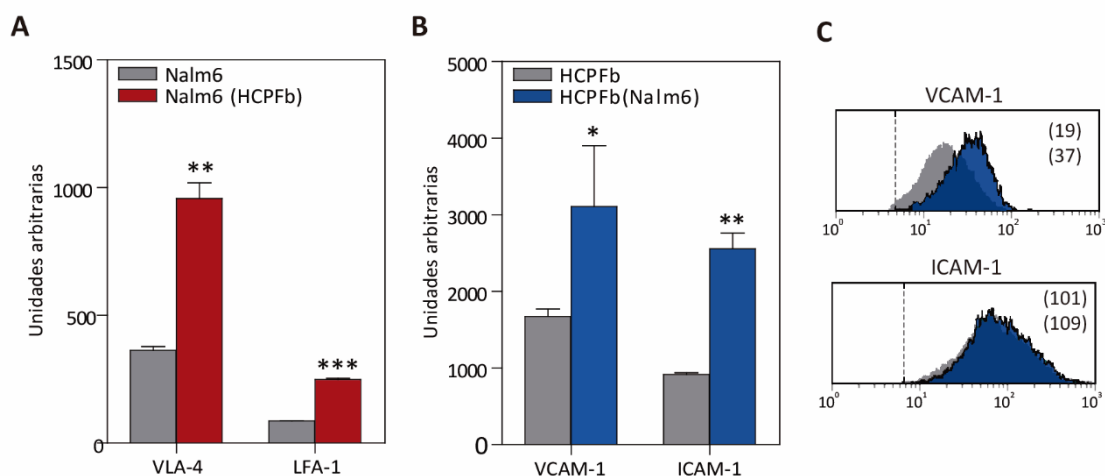
En este sentido, el establecimiento de co-cultivos de células leucémicas con células epiteliales del plexo coroideo humano o con fibroblastos del estroma conjuntivo del mismo, puso de manifiesto la mayor apetencia de las células tumorales por estos últimos. Como se observa en las imágenes tomadas en ambos tipos de cultivo, mientras que un importante porcentaje de las células leucémicas aparecían en suspensión en el cultivo con células epiteliales, la presencia de fibroblastos provocaba el reclutamiento de la mayoría de las células tumorales, quedando en muchos casos cubiertas por ellas (Figura 30).



**Figura 30. Interacción entre las células leucémicas y células del plexo coroideo en cultivo.** Células epiteliales (A, B) y fibroblastos (C, D) del plexo coroideo humano cultivados durante 24 horas en presencia o ausencia de células leucémicas de la línea Nalm6. Obsérvese la distinta disposición de las células leucémicas sobre los dos tipos celulares poniendo de manifiesto la mayor apetencia de las células leucémicas por los fibroblastos. A-D: x10.

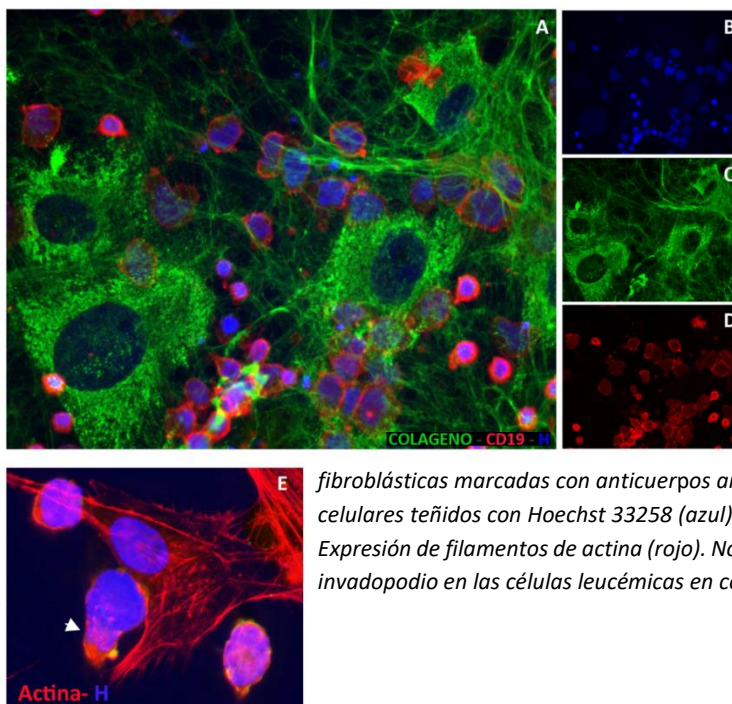
Nos planteamos entonces analizar las características de los fibroblastos del estroma conjuntivo y cómo éstos eran modificados por la presencia de las células leucémicas. Para ello se establecieron co-cultivos de fibroblastos derivados de plexo coroideo humano con células leucémicas de la línea Nalm6 o células primarias bajo diferentes condiciones.

Analizamos, en primer lugar, la expresión de los posibles mediadores moleculares responsables de la adhesión de las células leucémicas a los fibroblastos del plexo. La interacción entre ambos tipos celulares provocó un incremento significativo tanto en la expresión de *VLA-4* y *LFA-1* en las células leucémicas como en sus ligandos, *VCAM-1* e *ICAM-1* en los fibroblastos (Figura 31).



**Figura 31. Regulación de las interacciones célula-célula en los co-cultivos de fibroblastos del plexo coroideo y células leucémicas.** **A)** Análisis de expresión por PCRq de *VLA-4* y *LFA-1* en las células leucémicas (Nalm6) en condiciones basales o co-cultivadas durante 12 horas sobre insertos transwell con fibroblastos humanos del plexo coroideo (HCPFb) previamente sembrados en la cara inferior del inserto. **B)** Expresión comparada de *VCAM1* e *ICAM1* en los fibroblastos presentes en estos co-cultivos y aquellos cultivados en ausencia de células leucémicas. Los niveles de transcrito de los genes analizados fueron normalizados frente a los de *GNB2L1*. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ). **C)** La expresión de *VCAM-1* e *ICAM1* en los fibroblastos del plexo coroideo fue analizada mediante citometría de flujo tras 72h en contacto directo con las células leucémicas. La intensidad media de fluorescencia se indica en cada histograma. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

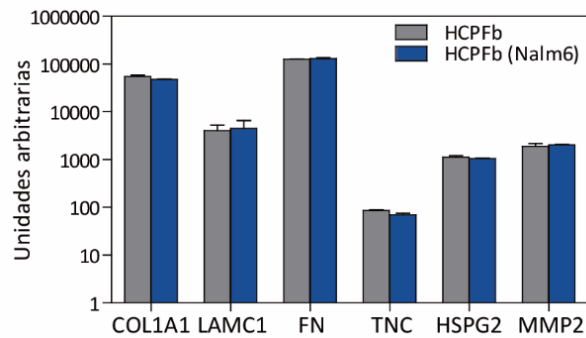
Más aún, como se observa en las imágenes de inmunofluorescencia (Figura 32), las células leucémicas no sólo aparecían estrechamente adheridas a los fibroblastos, sino que en muchas ocasiones se disponían en *clusters* situados por debajo de las células estromales e inmersas en un abundante lecho de matriz extracelular (Figura 32A-D). Estas imágenes recuerdan a los clásicos cultivos de *Whitlock/Witte* en los que células estromales de la médula ósea permiten el mantenimiento y diferenciación del linaje B, así como la supervivencia de células leucémicas <sup>186</sup>. Además, estas células expresaban niveles de CD19 muy inferiores a los exhibidos por las células que aparecían aisladas en el cultivo o que no presentaban un contacto tan estrecho con los fibroblastos (Figura 32). En estos *clusters* se observaban blastos leucémicos de gran tamaño y morfología irregular que, en ocasiones, presentaban proyecciones tipo invadopodio (Figura 32E) (ver apartado 12).



**Figura 32. Estudio de los cambios morfológicos de las células leucémicas en contacto con los fibroblastos del estroma del plexo coroideo.** Células Nalm6 y fibroblastos del plexo coroideo fueron co-cultivados durante 72 horas y analizados mediante inmunofluorescencia **A)** Triple inmunofluorescencia en la que se muestra las células tumorales marcadas con anticuerpos anti-CD19 (rojo), las células

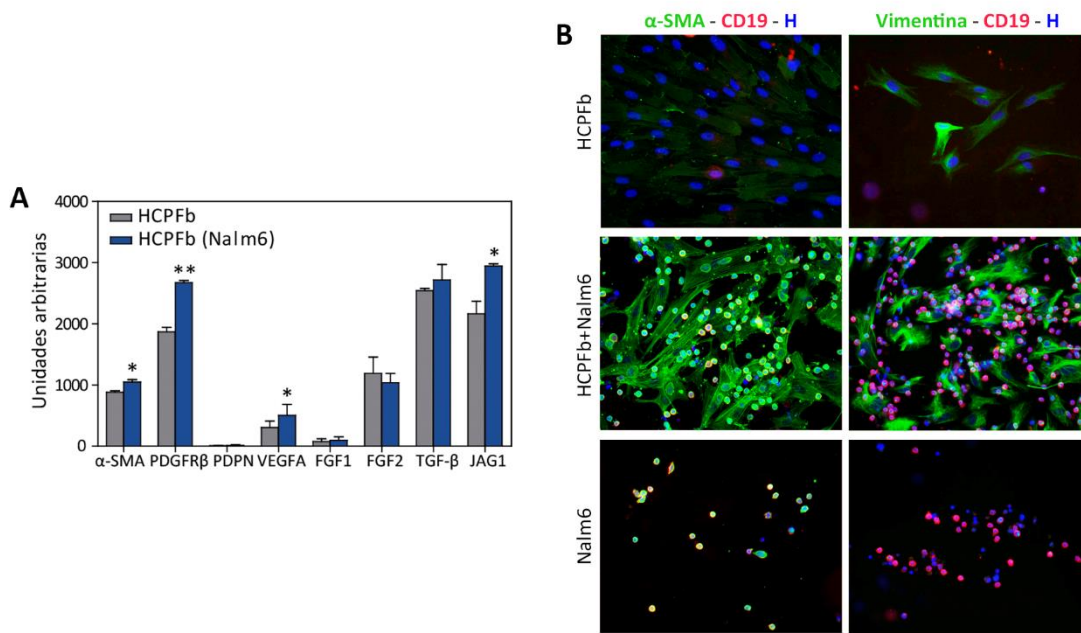
fibroblásticas marcadas con anticuerpos anti-colágeno tipo I (verde) y los núcleos celulares teñidos con Hoechst 33258 (azul). **B-D)** Inmunofluorescencias simples **E)** Expresión de filamentos de actina (rojo). Nótese la formación de proyecciones tipo invadopodio en las células leucémicas en contacto con los fibroblastos (flecha).

Puesto que los principales responsables de la síntesis y renovación de la matriz extracelular en los tejidos conjuntivos son los fibroblastos, analizamos también en los cultivos primarios de estas células la expresión de distintos componentes de matriz extracelular en presencia o ausencia de células leucémicas. Como se observa en la Figura 33, niveles elevados de ARNm de colágeno  $\alpha 1$ , laminina, fibronectina y tenascina C así como del componente proteico de algunos proteoglicanos y de la MMP2 fueron detectados en fibroblastos control de plexo coroideo humano. Sin embargo, esta expresión no se modificó en presencia de células leucémicas.



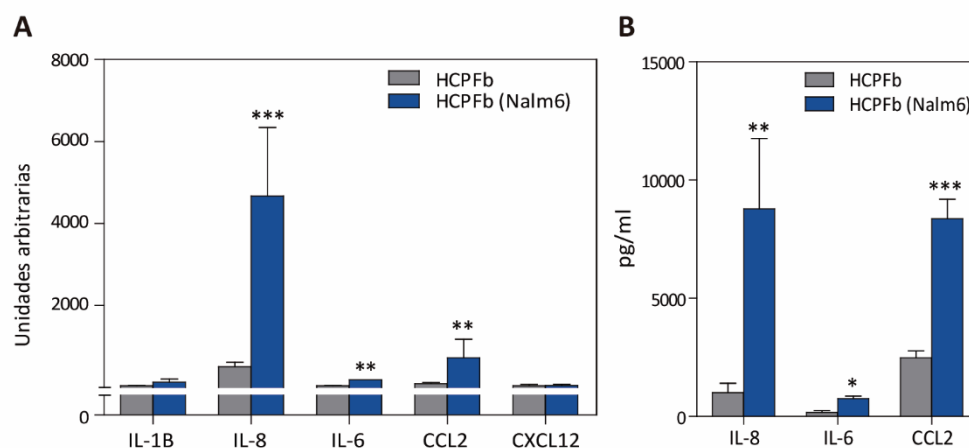
**Figura 33. Análisis de la expresión de componentes de matriz extracelular en los fibroblastos del plexo coroideo en presencia o ausencia de las células leucémicas.** Los fibroblastos (HCPFb) sembrados en la cara inferior de la membrana de un inserto transwell se co-cultivaron con la línea leucémica Nalm6 sembrada sobre la cara superior de la misma. Tras 12 horas, se cuantificó por PCRq la expresión de los distintos componentes de matriz extracelular arriba indicados en los fibroblastos del plexo coroideo, tanto en condiciones basales como en contacto con las células Nalm6. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar de la expresión de estos genes de 3-4 experimentos independientes. GNB2L1 fue empleado como control endógeno.

Utilizando esta misma estrategia experimental, evaluamos la expresión de diferentes marcadores descritos para fibroblastos y/o fibroblastos asociados a tumor (CAFs). Una expresión incrementada de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) y del factor de crecimiento derivado de plaquets ( $PDGFR\beta$ ) era patente en los fibroblastos cultivados con las células leucémicas frente a aquellos cultivos control. Entre los genes que incrementaban su expresión se encontraba también *VEGFA*. Además, se observó un significativo incremento en la expresión del ligando de la ruta de señalización Notch, *JAGGED1*. No encontramos diferencias, sin embargo, en la expresión de *FGF2* o *TGF- $\beta$*  que, si bien eran expresados en niveles elevados por los fibroblastos del plexo, su expresión no se veía modificada por la presencia de las células leucémicas (Figura 34A). Por otra parte, el análisis por inmunofluorescencia de estos co-cultivos evidenciaba un incremento de la expresión de  $\alpha$ -SMA y vimentina en los fibroblastos en contacto con las células tumorales (Figura 34B).

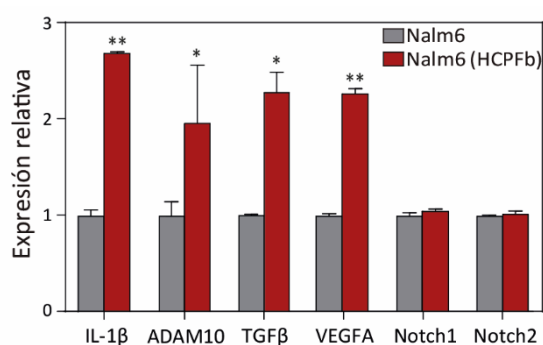


**Figura 34. Estudio de la expresión de marcadores de fibroblastos asociados a tumor y del ligando de la señalización Notch en los fibroblastos del plexo coroideo en presencia de células leucémicas. A)** Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión en las células fibroblásticas del plexo coroideo de los genes indicados en la gráfica tras su cultivo en presencia o ausencia de la línea leucémica Nalm6 en un sistema transwell que permitía el contacto entre ambos tipos celulares durante 12 horas. Los niveles de expresión fueron normalizados frente a la expresión del gen endógeno GNB2L1. La gráfica muestra la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ). **B)** Imágenes representativas del estudio mediante microscopía de fluorescencia de la expresión de  $\alpha$ -SMA (verde; derecha) y vimentina (verde, izquierda) en los fibroblastos en presencia o ausencia de las células Nalm6 (rojo).

Además, la presencia de las células leucémicas en el cultivo provocó en los fibroblastos un aumento significativo de la expresión de los genes de factores inflamatorios *IL-6*, *IL-8* y *CCL2* (Figura 35A) Estos incrementos fueron confirmados también a nivel de proteína, siendo la IL-8 la molécula que experimentó los mayores cambios (rango de 6 a 9 veces tanto de ARNm como de proteína (Figura35B). Esto implica que la presencia de la leucemia en el estroma del plexo coroideo genera en éste un ambiente pro-inflamatorio. Por su parte, en los cultivos control de células leucémicas no fue posible detectar de las citoquinas IL-6, IL-8 y CCL2 (datos no mostrados). Sin embargo, se detectó la expresión de *IL-1 $\beta$* , de *ADAM10*, *TGF- $\beta$*  y *VEGFA*, observándose una regulación positiva de éstos en presencia de los fibroblastos del plexo coroideo. También expresaban los receptores de la señalización Notch, Notch1 y Notch2, aunque no se detectaron cambios en sus niveles de expresión tras el co-cultivo con los fibroblastos del plexo coroideo (Figura 30). La expresión de receptores Notch3 y Notch4, sin embargo, se encontraba en el límite de detección (datos no mostrados).



**Figura 35. Producción de citoquinas inflamatorias por fibroblastos en presencia o ausencia de células leucémicas de la línea Nalm6. A)** Expresión de ARNm de IL-1β, IL-8, IL-6 y CCL-2 en fibroblastos del plexo coroideo humano (HCPFb) cultivados en contacto con células leucémicas en un sistema en transwell durante 12 horas. **B)** La producción de IL-8, IL-6 y CCL-2 fue analizada en los sobrenadantes recogidos tras 72 horas de cultivo mediante ELISA o CBA. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

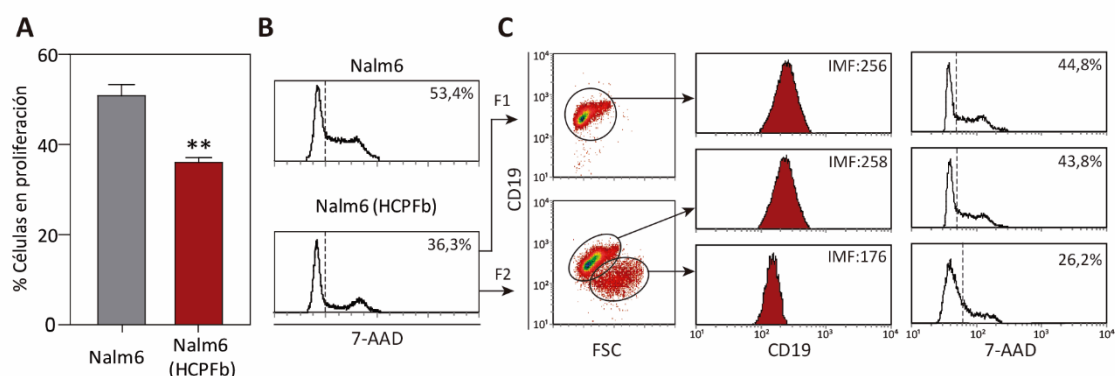


**Figura 36. Cambios en el perfil de expresión génica de las células leucémicas en presencia de los fibroblastos del plexo coroideo.** Tras el co-cultivo de las células Nalm6 con los fibroblastos del plexo coroideo durante 12 horas, la expresión génica de las moléculas indicadas en la gráfica fue cuantificada por PCRq. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de la expresión génica relativa a la de los cultivos control de 3 experimentos independientes. GNB2L1 fue empleado como control endógeno.

## 12. El estroma del plexo coroideo como santuario para las células leucémicas

Dado que las interacciones entre las MSCs y las células leucémicas en la médula ósea parecen ser responsables, al menos en parte, de la quimiorresistencia exhibida por las células tumorales en la LLA<sup>37</sup>, nos planteamos analizar si el contacto de las células leucémicas con los fibroblastos del plexo inducía efectos similares. Para ello analizamos, en primer lugar, la tasa proliferativa de las células leucémicas en presencia o ausencia de los fibroblastos observándose una significativa reducción en la proliferación de las células leucémicas como consecuencia de la presencia de los fibroblastos en el cultivo (Figura 37A, B). Para determinar si esta disminución en la tasa proliferativa se correlacionaba con la población de células leucémicas que más estrechamente interaccionaba con los fibroblastos, establecimos co-cultivos

similares a los anteriores, en los que tras 48 horas se recogían las células leucémicas separándolas en dos fracciones. En la primera (F1) se recogían aquellas que se encontraban en suspensión en el medio de cultivo junto a aquellas menos adheridas a las células estromales, y en la segunda (F2), aquellas más adheridas que requerían de tratamiento enzimático para su separación de los fibroblastos. Como se observa en la Figura 37C, en la F2 se identificaban dos poblaciones. La de mayor tamaño representaba un 15-20% de las células, y su intensidad media de fluorescencia para CD19 era inferior a la del resto de las células recuperadas del cultivo, tanto de la F1 como de la F2. Además, esta subpoblación presentaba una tasa proliferativa significativamente reducida.

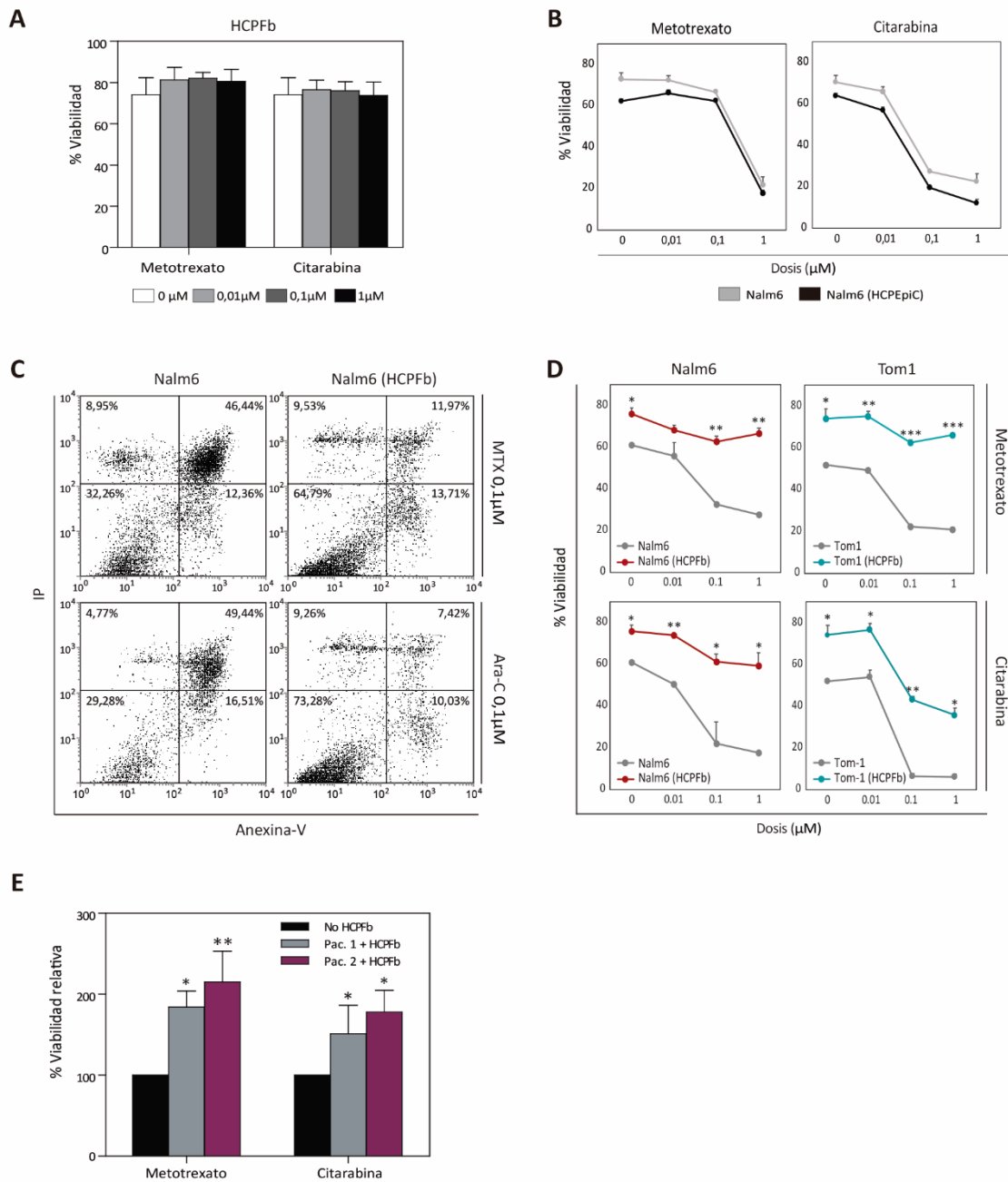


**Figura 37. La presencia de fibroblastos del plexo coroideo reduce la proliferación de las células leucémicas.** La línea leucémica Nalm6 fue cultivada de manera aislada o en co-cultivo con fibroblastos del plexo coroideo (HCPFb) durante 48 horas. Tras este periodo, el porcentaje de células en división fue cuantificado por citometría de flujo mediante la tinción del ADN con 7-AAD. **A)** La gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de células Nalm6 en proliferación de tres experimentos independientes. **\*\***  $p \leq 0,01$ . **B)** Histogramas representativos del porcentaje de células Nalm6 en la fase S/G2/M en presencia o ausencia de fibroblastos. **C)** Análisis del tamaño (FSC), la expresión de CD19 y el porcentaje de células en proliferación de las subpoblaciones de células Nalm6 presentes en la fracción de células en suspensión (F1) o interaccionando estrechamente con las células estromales del cultivo (F2). Se muestran datos representativos de 3 experimentos independientes.

Los resultados anteriores sugerían que estas células estromáticas podían ser capaces de proteger a las células tumorales de los agentes quimioterápicos utilizados convencionalmente en el tratamiento intratecal de la LLA. Por ello, a continuación, analizamos la viabilidad de las células leucémicas en presencia de dosis crecientes de agentes quimioterápicos. Como se observa en la Figura 38C, D, independientemente de la línea de LLA utilizada (Nalm6 o Tom1), la viabilidad de las células leucémicas fue significativamente superior en aquellos cultivos en los que estaban presentes células fibroblásticas del plexo coroideo, cuya viabilidad no se vio afectada por la presencia de los quimioterápicos (Figura 38A). Este drástico efecto protector se observaba incluso con las dosis mayores utilizadas de metotrexato o citarabina y tras 72 horas de cultivo. Así, mientras que en los cultivos control la viabilidad de las células de la línea Nalm6 expuestas a dosis de 0,1 y 1  $\mu$ M de ambos quimioterápicos era inferior al 30%, la presencia de los fibroblastos del plexo en el cultivo incrementó la supervivencia de estas células, alcanzándose valores muy similares a los cultivos control (70%). A diferencia de lo que ocurría con los

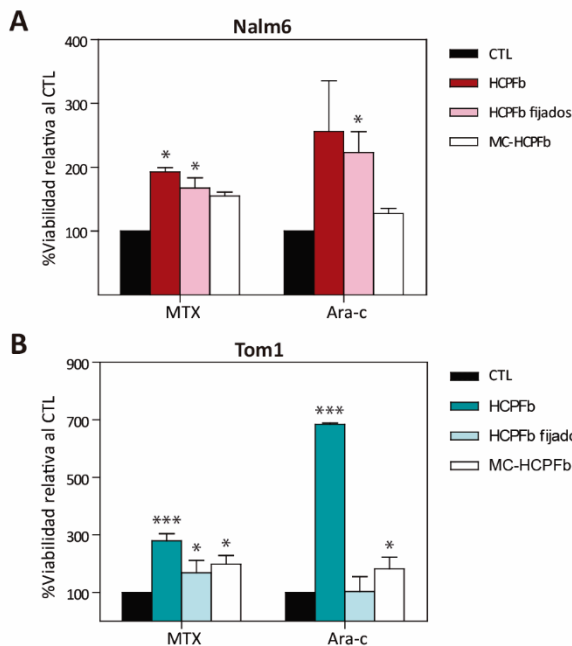
fibroblastos, las células epiteliales del plexo coroideo no fueron capaces de inducir protección para ninguno de los quimioterápicos utilizados (Figura 38B).

A continuación, analizamos si los efectos quimioprotectores del fibroblasto se extendían también a células primarias leucémicas. Para ello, utilizando un protocolo experimental similar al anterior, estudiamos la viabilidad de dos muestras primarias de LLA en presencia o ausencia de fibroblastos. Al igual que ocurría con las líneas leucémicas utilizadas, la supervivencia de las células leucémicas en presencia de los quimioterápicos aparecía significativamente incrementada cuando estaban presentes los fibroblastos del plexo coroideo en el cultivo (Figura 38E).



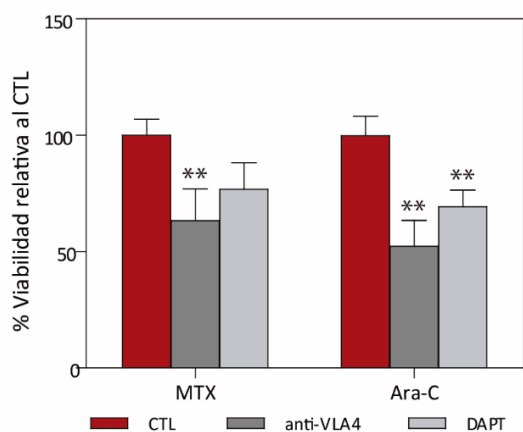
**Figura 38. El co-cultivo con fibroblastos del plexo coroideo reduce la sensibilidad de las células leucémicas frente a los agentes quimioterápicos.** Estudio de la viabilidad de las células tumorales expuestas a dosis crecientes (0.01, 0.1 y 1  $\mu$ M) de metotrexato (MTX) y citarabina (Ara-C), durante 72 horas en presencia o ausencia de fibroblastos del plexo coroideo (HCPFb). El porcentaje de células viables (Anexina<sup>-</sup> IP<sup>+</sup>) fue cuantificado mediante citometría de flujo. **A)** Análisis del efecto de los agentes quimioterápicos en la viabilidad de los fibroblastos del plexo coroideo. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de células viables de tres experimentos independientes. **B)** La gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar (4 experimentos independientes) del porcentaje de viabilidad de la línea leucémica Nalm6 sola o en co-cultivo con células epiteliales del plexo coroideo (HCPEpiC) en presencia de diferentes dosis de MTX o Ara-C. **C)** Se muestran dot-plots representativos del estudio de la viabilidad de las células leucémicas tratadas con MTX y Ara-C en co-cultivo con HCPFb o en ausencia de los mismos mediante la tinción con Anexina V, así como yoduro de propidio. En cada dot-plot se indica el porcentaje de células de cada subpoblación. Datos representativos de seis experimentos independientes. **D)** Porcentaje de células leucémicas Nalm6 y Tom1 viables tras 72h de tratamiento con dosis crecientes de MTX y Ara-C y cultivadas con o sin HCPFb. La gráfica indica la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes. **E)** Cuantificación por citometría de flujo del porcentaje de células Anexina V<sup>-</sup> IP<sup>+</sup> de dos muestras de pacientes con LLA tras el tratamiento con los agentes quimioterápicos (0.1 $\mu$ M) en presencia de fibroblastos del plexo coroideo. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de viabilidad respecto al porcentaje en los cultivos control, en ausencia de HCPFb, de tres experimentos independientes. (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

A tenor de estos resultados, analizamos si estos efectos eran consecuencia directa de la producción de factores solubles por los fibroblastos y/o por el establecimiento de contactos entre ambos tipos celulares. Como se observa en la Figura 39 tanto la interacción física entre los dos tipos celulares como los factores presentes en el medio de cultivo condicionado por los fibroblastos durante 48 horas participan en los efectos protectores observados. Sin embargo, los contactos célula-célula parecen ser los principales responsables de los mismos.



**Figura 39. Efecto del contacto célula-célula y los factores solubles en la protección de las células leucémicas otorgada por los fibroblastos frente al tratamiento con quimioterápicos.** La viabilidad de las células leucémicas Nalm6 (A) y Tom1 (B) tratadas con metotrexato (MTX) y citarabina (Ara-C) a una concentración de 0.1 $\mu$ M fue evaluada comparativamente en ausencia o presencia de los fibroblastos del plexo coroideo (HCPFb), así como en presencia de HCPFb previamente fijados con paraformaldehído 4% o del medio condicionado por éstos. Las gráficas representan el porcentaje de células viables en cada condición relativa al porcentaje de viabilidad en ausencia de fibroblastos (100%). Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar de los datos de tres experimentos independientes. (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Para ahondar en el mecanismo mediante el cual los fibroblastos ejercen estos efectos protectores, establecimos cultivos similares a los descritos en el apartado anterior añadiendo, en este caso, el anticuerpo bloqueante anti-VLA4, con el fin de impedir la interacción VCAM-1-VLA4 o el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa, DAPT para bloquear la señalización a través de Notch. La adición de éstos redujo significativamente la capacidad protectora de los fibroblastos, disminuyendo la viabilidad de las células leucémicas respecto a los valores observados en los co-cultivos control (Figura 40).



**Figura 40. Efecto de la inhibición de la interacción VCAM1-VLA-4 y de la señalización Notch en la supervivencia de las células leucémicas en co-cultivo con los fibroblastos del plexo.** Estudio de la viabilidad de las células Nalm6 co-cultivadas con los HCPFb en presencia del anticuerpo bloqueante contra VLA-4 ( $10\mu\text{g}/0,5 \times 10^6$  células), del inhibidor de la vía de señalización Notch, DAPT ( $50\mu\text{M}$ ) o en ausencia de estos (CTL: anti-IgG y DMSO, respectivamente) tras 72h. Los datos representan el porcentaje de células viables en cada condición relativa al porcentaje de viabilidad en ausencia de los inhibidores (100%). Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar de 3-4 experimentos independientes. (\*\*  $p \leq 0,01$ ).

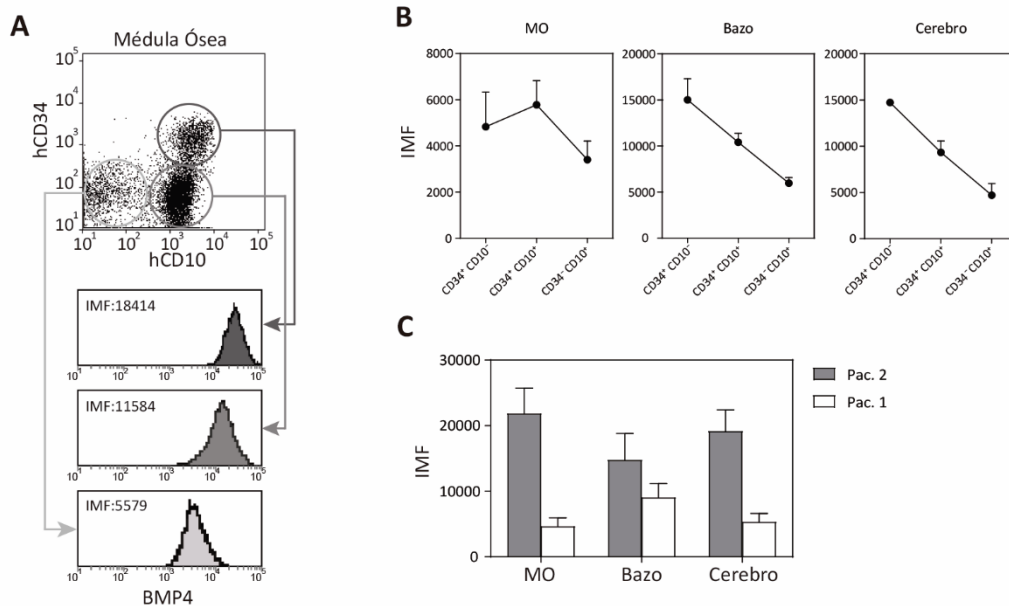
En conjunto, estos resultados indican que el estroma del plexo coroideo representa un santuario para las células leucémicas. Allí, estas células son capaces de escapar a los efectos de los quimioterápicos a través de la interacción con los componentes estromáticos.

### 13. Expresión de BMP4 en diferentes subpoblaciones de células leucémicas

Trabajos previos de nuestro grupo, así como de otros grupos de investigación, han puesto de manifiesto la relevancia de la vía de señalización BMP en el mantenimiento de las células *stem* hematopoyéticas y en su diferenciación hacia diferentes linajes, incluyendo los linfocitos B<sup>133,187</sup>. En este contexto y, a tenor de los resultados previos del grupo obtenidos tras el análisis de muestras primarias procedentes de una primera cohorte de pacientes que asociaban altos niveles de expresión de BMP4 por los blastos al diagnóstico con las recaídas en la LLA, nos planteamos primeramente el estudio de la expresión del morfógeno durante la diferenciación temprana de linfocitos B en la médula ósea sana humana. Así, como se observa en la Figura 41A, la mayor expresión de BMP4 estaba asociada a la población más inmadura CD34<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>, reduciéndose en estadios posteriores de diferenciación.

Evaluamos a continuación, los niveles de BMP4 en las células de LLA aisladas de diferentes localizaciones anatómicas de ratones que habían desarrollado la enfermedad tras ser trasplantados con muestras

primarias. En todos los casos, los niveles de expresión de BMP4 fueron dependientes de la muestra de LLA y similares entre las distintas localizaciones (Figura 41C). De nuevo, al igual que se observaba en la diferenciación B en la médula ósea sana, en las muestras en las que era posible identificar diferentes subpoblaciones, las células leucémicas con un fenotipo menos diferenciado eran las que expresaban mayores niveles de BMP4 (Figura 41B).

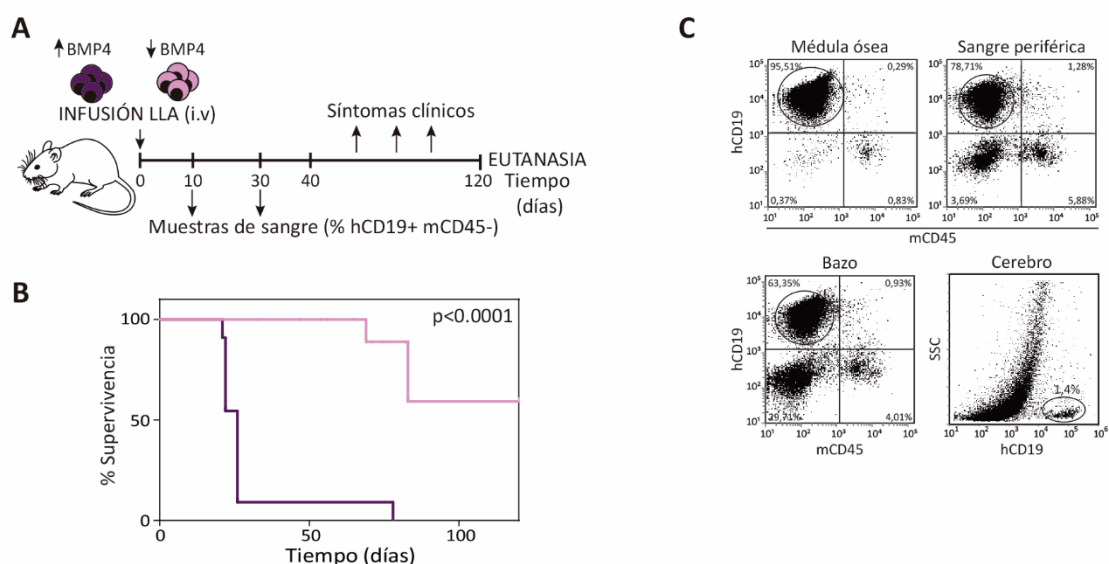


**Figura 41. Expresión de BMP4 en las diferentes subpoblaciones de células leucémicas en diferentes localizaciones.** **A)** Análisis de los niveles de expresión de BMP4 mediante citometría de flujo en las subpoblaciones de células obtenidas de médula ósea humana que se encuentran en diferentes estadios de diferenciación (CD34+CD10+; CD34-CD10+ y CD34-CD10-). Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes. La intensidad media de fluorescencia (IMF) se indica en cada histograma. **B)** Datos representativos de los niveles de expresión de BMP4 en cada una de las subpoblaciones de células leucémicas indicadas. Se muestran los diferentes órganos analizados. Las gráficas muestran la media  $\pm$  desviación estándar de la intensidad media de fluorescencia (IMF). **C)** Análisis de la expresión de BMP4 en las células leucémicas aisladas de diferentes órganos en ratones trasplantados con diferentes muestras primarias. Las barras representan la media  $\pm$  la desviación estándar de la IMF (n= 5 ratones/muestra). MO: Médula ósea.

## 14.La elevada expresión de BMP4 en muestras primarias de LLA-B correlaciona con mayores tasas de injerto en el modelo xenogénico de LLA

Para conocer la relevancia en el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad de los niveles de expresión de BMP4 en células leucémicas, ratones NSG fueron infundidos, según se indica en el esquema (Figura 42A), con muestras primarias de LLA-B que exhibían altos o bajos niveles de BMP4 determinados en función de la mediana de expresión de las muestras recopiladas y analizadas. El 90% de los ratones del primer grupo desarrollaron los síntomas clínicos, detectándose un elevado porcentaje de injerto en

sangre, médula ósea y bazo (Figura 42B, C). Además, en todos los animales fueron encontrados blastos leucémicos en SNC. Por el contrario, únicamente el 10% de los animales a los que se les habían infundido células leucémicas que expresaban bajos niveles de *BMP4* desarrollaron la enfermedad, detectándose injerto en todos los órganos diana analizados, incluido el SNC. En el resto de los animales de este grupo, no fueron detectadas células leucémicas en ningún órgano tras 16 semanas post-trasplante, momento en que se llevaba a cabo el sacrificio (Figura 42B).

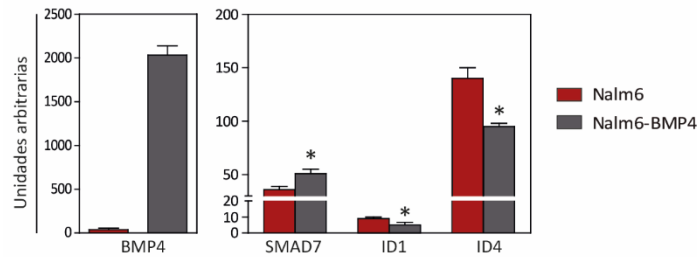


**Figura 42. BMP4 en el desarrollo de la LLA en el modelo xenogénico. A)** Esquema del diseño experimental. **B)** Curva de supervivencia de los animales trasplantados con muestras primarias que presentaban altos (4 muestras) y bajos (5 muestras) niveles de expresión de *BMP4* (3-5 animales/muestra). **C)** Datos representativos de los porcentajes de infiltración leucémica (hCD19<sup>+</sup>mCD45<sup>+</sup>) detectados en los diferentes órganos analizados por citometría de flujo en el momento del sacrificio.

## 15. Niveles elevados de BMP4 incrementan la agresividad de la línea leucémica Nalm6

Dado que los resultados del apartado anterior indicaban que la infusión de muestras primarias con altos niveles de expresión de *BMP4* se correlacionaba con una mayor probabilidad de injerto, nos planteamos, a continuación, analizar los mecanismos por los que *BMP4* podría favorecer el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad. Con este objetivo se modificó genéticamente la línea leucémica Nalm6 para que expresase elevados niveles de *BMP4* (Nalm6-BMP4). El análisis mediante PCRq de los posibles cambios en la expresión de los distintos componentes de la maquinaria de señalización BMP en estas células reveló que, si bien no se encontraron diferencias en la expresión de la mayor parte de los componentes de esta vía analizados, las células Nalm6-BMP4 presentaban un incremento significativo de la expresión de la Smad inhibidora, *SMAD7*, acompañado de una reducción en la expresión de los genes diana *ID1* e *ID4*

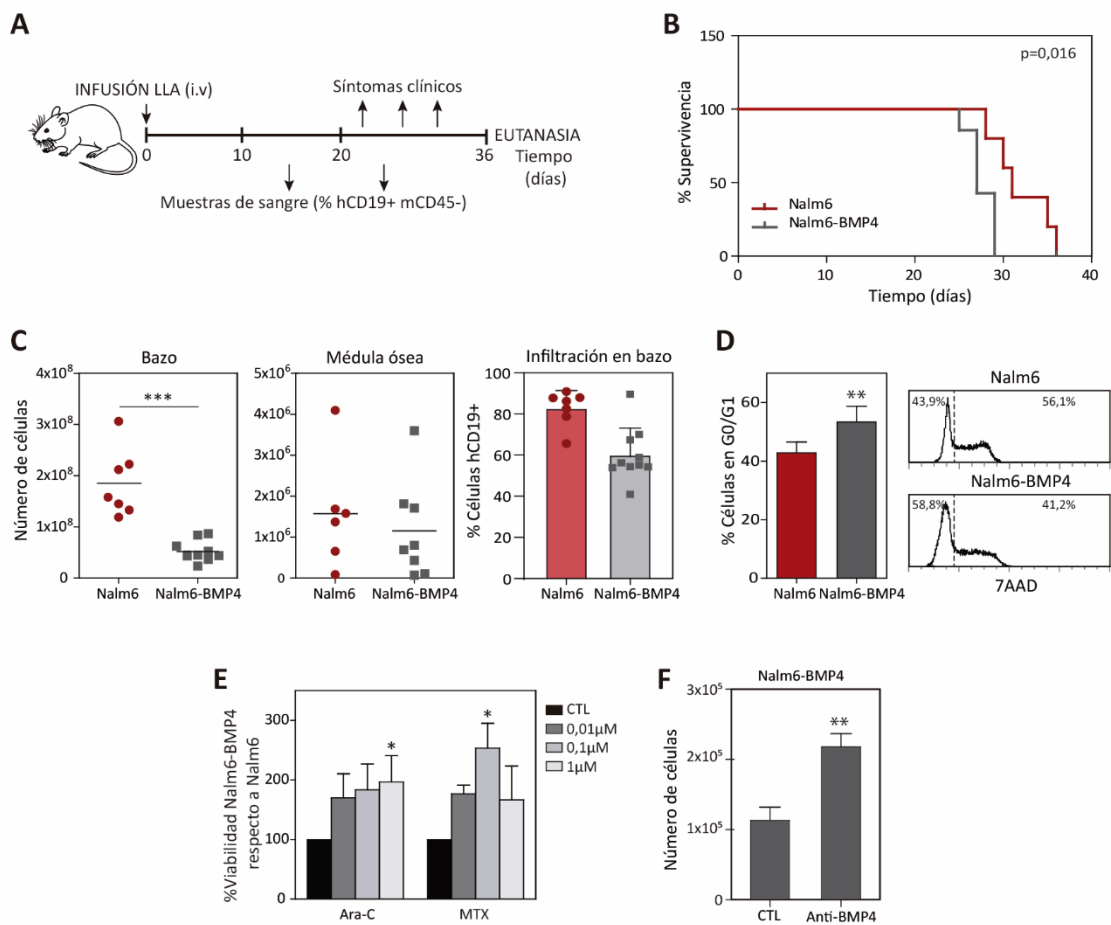
(Figura 43). Estos datos sugieren que una mayor producción de BMP4 por parte de las células leucémicas induce una regulación negativa de la vía de señalización canónica de BMP en la propia célula leucémica.



**Figura 43. Cambios en la expresión de los componentes de la vía de señalización BMP en las células Nalm6 que sobreexpresan BMP4.** Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de BMP4, SMAD7, ID1 e ID4. Dichos niveles se normalizaron frente a los niveles del gen endógeno GNB2L1. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes (\* $p \leq 0,05$ ).

Las células Nalm6 y Nalm6-BMP4 fueron trasplantadas en paralelo en ratones NSG, siguiendo un modelo similar al descrito anteriormente (Figura 44A). Los animales de todos los grupos experimentales desarrollaron la enfermedad, sin embargo, en el grupo trasplantado con las células que sobreexpresan BMP4 (Nalm6-BMP4), la aparición de los síntomas era significativamente más temprana manifestándose, además, de forma más severa que en el grupo control (Nalm6), pues todos los animales presentaron parálisis en las extremidades posteriores (Figura 44B).

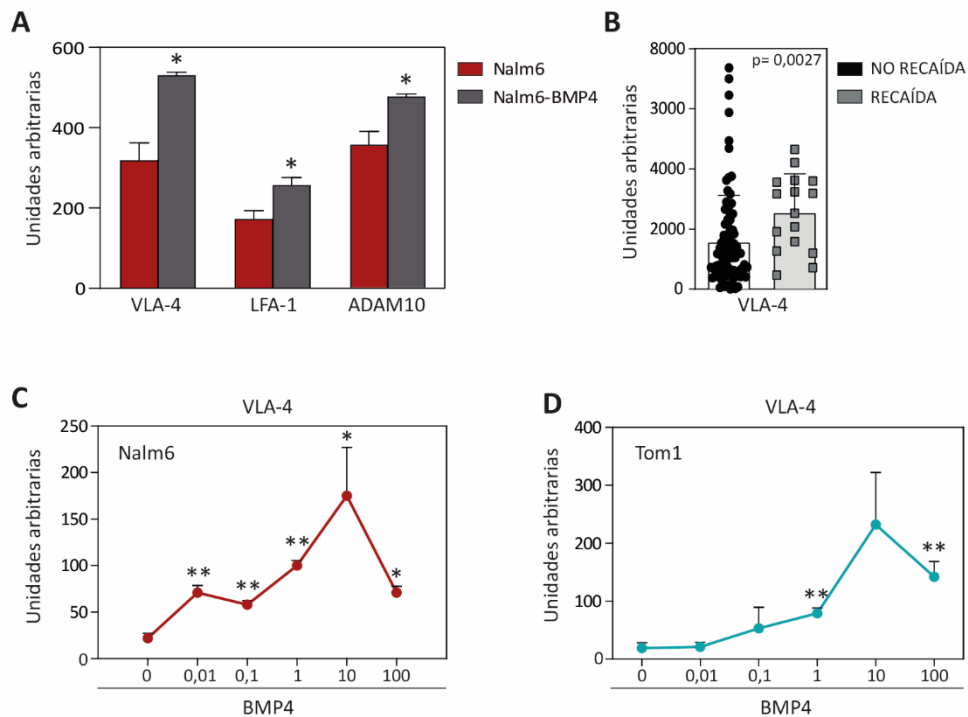
A pesar de los datos clínicos obtenidos, sorprendentemente, el estudio de los órganos donde habitualmente injertan las células leucémicas, médula ósea y bazo, reveló que los animales Nalm6-BMP4 exhibían números de células leucémicas injertadas en bazo significativamente menores que los animales Nalm6 (Figura 44C). El análisis del ciclo celular de las células leucémicas recuperadas de estos ratones evidenció que dicha reducción obedecía a una disminución en el porcentaje de células tumorales en división en los animales Nalm6-BMP4 (Figura 44D). En correlación con estos resultados que indicaban que la sobreexpresión de BMP4 reducía la tasa proliferativa de las células leucémicas, las células Nalm6-BMP4 aisladas de los animales exhibieron una menor sensibilidad a los quimioterápicos, metotrexato y citarabina, que las células Nalm6, en ensayos *in vitro* (Figura 44E). Para confirmar que estos efectos en ciclo celular eran debidos a la mayor producción de BMP4, analizamos la proliferación de estas células tras la adición de nanoanticuerpos bloqueantes, anti-BMP4. En línea con estos resultados, el número de células Nalm6-BMP4 recuperadas de los cultivos a los que se les adicionaban dichos anticuerpos fue significativamente superior que en los cultivos control (Figura 44F).



**Figura 44. Efecto de la sobreexpresión de BMP4 en las células leucémicas en el modelo xenogénico de LLA. A)** Esquema del diseño experimental. **B)** Curva de supervivencia de los ratones trasplantados con células Nalm6-BMP4, cuya mediana de supervivencia es de 27 días, y con Nalm6, cuya mediana es de 31 días (n=10 animales por grupo) **C)** Cuantificación del número de células leucémicas presentes en bazo y médula ósea, así como del porcentaje de infiltración en bazo de los animales de ambos grupos. (n=7-10 animales por grupo). Se muestra la media de cada grupo de animales, representando cada punto a cada uno de los ratones analizados. **D)** Análisis del ciclo celular de las células leucémicas aisladas del bazo. La gráfica representa la media  $\pm$  la desviación estándar del porcentaje de células en fase G0/G1 (n=6 animales por grupo). Histogramas representativos de las células Nalm6 y Nalm6-BMP4 (CD19<sup>+</sup>) teñidas con 7AAD. Se indica el porcentaje de células en G0/G1 (izquierda) y el porcentaje de células en fase S/G2/M (derecha). **E)** Estudio mediante citometría de flujo de la viabilidad (Anexina - IP -) de las células Nalm6-BMP4 recuperadas del bazo respecto a la de las células Nalm6, tras 72 horas de cultivo con dosis crecientes (0,01, 0,1, 1 μM) de los agentes quimioterápicos: citarabina y metotrexato. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de viabilidad relativizado al control de las células Nalm6-BMP4 respecto a las Nalm6 de tres experimentos independientes; **F)** Cuantificación del número de células Nalm6-BMP4 tras el tratamiento con el nanoanticuerpo bloqueante, C4C4. Los datos corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes (\*p $\leq$ 0,05; \*\*p $\leq$ 0,01).

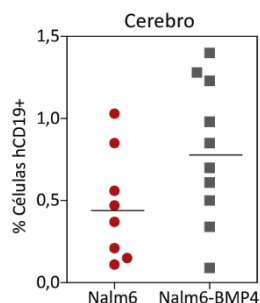
Por otra parte, el análisis por PCRq de la expresión génica en células leucémicas recuperadas del bazo de los animales Nalm6-BMP4 y Nalm6 reveló niveles significativamente incrementados de las moléculas de adhesión VLA-4 y LFA-1, así como de la metaloproteasa ADAM-10, en los primeros (Figura 45A). El

tratamiento *in vitro* de las líneas leucémicas Nalm6 y Tom1 con diferentes dosis de BMP4 exógeno también indujo una regulación positiva de la expresión de VLA-4 (Figura 45C, D). A tenor de estos resultados, de la importancia de las interacciones a través de VLA-4 en la supervivencia de las células descrita en apartados anteriores y, puesto que se ha descrito recientemente que elevados niveles de expresión de esta integrina se asocian con un mal pronóstico de los pacientes con LLA<sup>40</sup>, analizamos la expresión de VLA-4 en una cohorte de pacientes de LLA- B confirmando, como se observa en la Figura 45B, una mayor expresión de ésta integrina en los pacientes que recaen respecto al grupo de pacientes que no recaen.



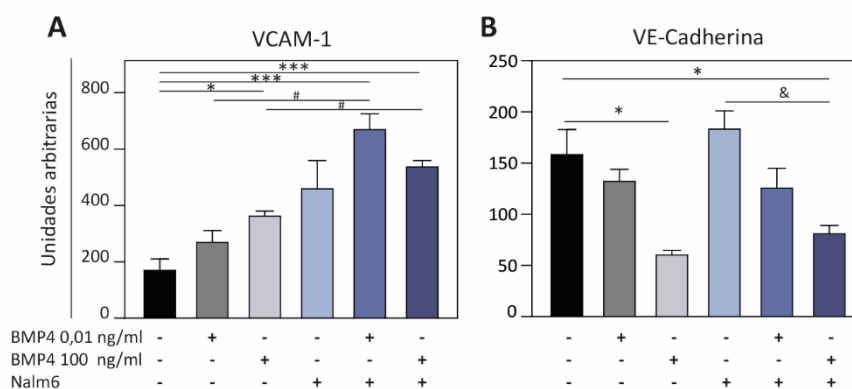
**Figura 45. Efecto de BMP4 en la expresión de moléculas de adhesión y metaloproteasas en las células leucémicas. VLA-4 se asocia con las recaídas en la LLA. A)** Expresión de ARNm de VLA-4, LFA-1 y ADAM10 en las células Nalm6 y Nalm6-BMP4 aisladas del bazo de los animales que habían desarrollado la enfermedad. Las gráficas representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$  animales/grupo). **B)** Niveles de expresión al diagnóstico de VLA-4 en muestras de pacientes de LLA en función de la posterior aparición de recaídas en la enfermedad. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar ( $n= 66$  pacientes de LLA-B). **C, D)** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de ARNm de VLA-4 en las líneas leucémicas Nalm6 (C) y Tom1 (D) tras el tratamiento durante 48 horas con distintas dosis de BMP4 (0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. En todos los casos los niveles de expresión fueron normalizados frente a la expresión de GNB2L1. (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ ).

A diferencia de lo observado en periferia, el número de células leucémicas infiltradas en el cerebro fue superior en aquellos animales infundidos con células Nalm6 que sobreexpresaban BMP4, si bien la diferencia no llegó a ser significativa (Figura 46).



**Figura 46. Infiltración en cerebro de células leucémicas que sobreexpresan BMP4.** La gráfica representa la media del porcentaje de células CD19<sup>+</sup> presentes en la suspensión de cerebro analizada por citometría de flujo, en los grupos de animales trasplantados con células Nalm6 y con Nalm6-BMP4. Cada punto representa el porcentaje obtenido en cada animal analizado. (n=10 animales por grupo)

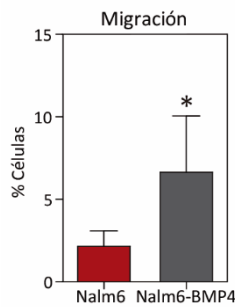
En línea con un mayor número de células Nalm6-BMP4 en el cerebro y dado que BMP4 ha sido descrito como uno de los factores implicado en la alteración de la función endotelial<sup>44, 188</sup>, se llevó a cabo un estudio *in vitro* de la capacidad de BMP4 y de las células leucémicas para modificar el fenotipo de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (hMECs). El establecimiento de co-cultivos entre éstas y las células Nalm6, la adición de diferentes dosis de BMP4 a los cultivos de hMECs y la combinación de ambos indicó que niveles elevados de BMP4, así como la presencia de las células leucémicas inducían una regulación positiva de la expresión de VCAM-1 al mismo tiempo que se reducía la expresión de VE-Cadherina en estas células por efecto de BMP4 y de manera dosis dependiente, lo que podría facilitar la adhesión y el paso de las células leucémicas Nalm6-BMP4 a su través (Figura 47A, B).



**Figura 47. Modificación de la expresión de VCAM-1 y VE-Cadherina en las células endoteliales por efecto de BMP4 y/o de las células leucémicas.** Las hMECs se cultivaron en presencia o ausencia de BMP4 (0.01ng/ml o 100ng/ml) y/o células Nalm6 durante 48 horas. A continuación, se llevó a cabo el análisis por RT-PCRq de los niveles de expresión de VCAM-1 (A) y VE-Cadherina (B). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes (\* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ; comparación frente a las hMECs control; # $p \leq 0,05$ , comparación frente al tratamiento con BMP4; &  $p \leq 0,05$ , frente al co-cultivo hMECs-Nalm6).

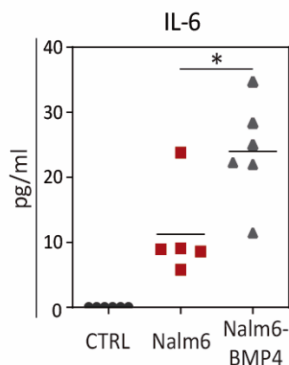
Analizamos a continuación, si BMP4 podía modificar también la capacidad migratoria de las células leucémicas tal y como ha sido descrito previamente para otras células tumorales<sup>189</sup>. Para abordar este estudio, se realizaron ensayos de migración con células Nalm6-BMP4 y Nalm6. Ambas líneas fueron

marcadas con CFSE y colocadas en la cara superior de insertos transwell durante 4 horas. Tras este periodo, se recogieron las células presentes tanto en el compartimento superior como en el compartimento inferior y que, por tanto, habían migrado, cuantificándose ambas fracciones por citometría de flujo. Los resultados obtenidos indicaban que la sobreexpresión de BMP4 en las células leucémicas dotaba a éstas de una mayor capacidad migratoria, pues el número de células Nalm6-BMP4 recogidas del compartimento inferior fue 3 veces superior al de células Nalm6 (Figura 48). Estos resultados sugieren que niveles incrementados de BMP4 podrían acentuar la capacidad invasiva de las células leucémicas.



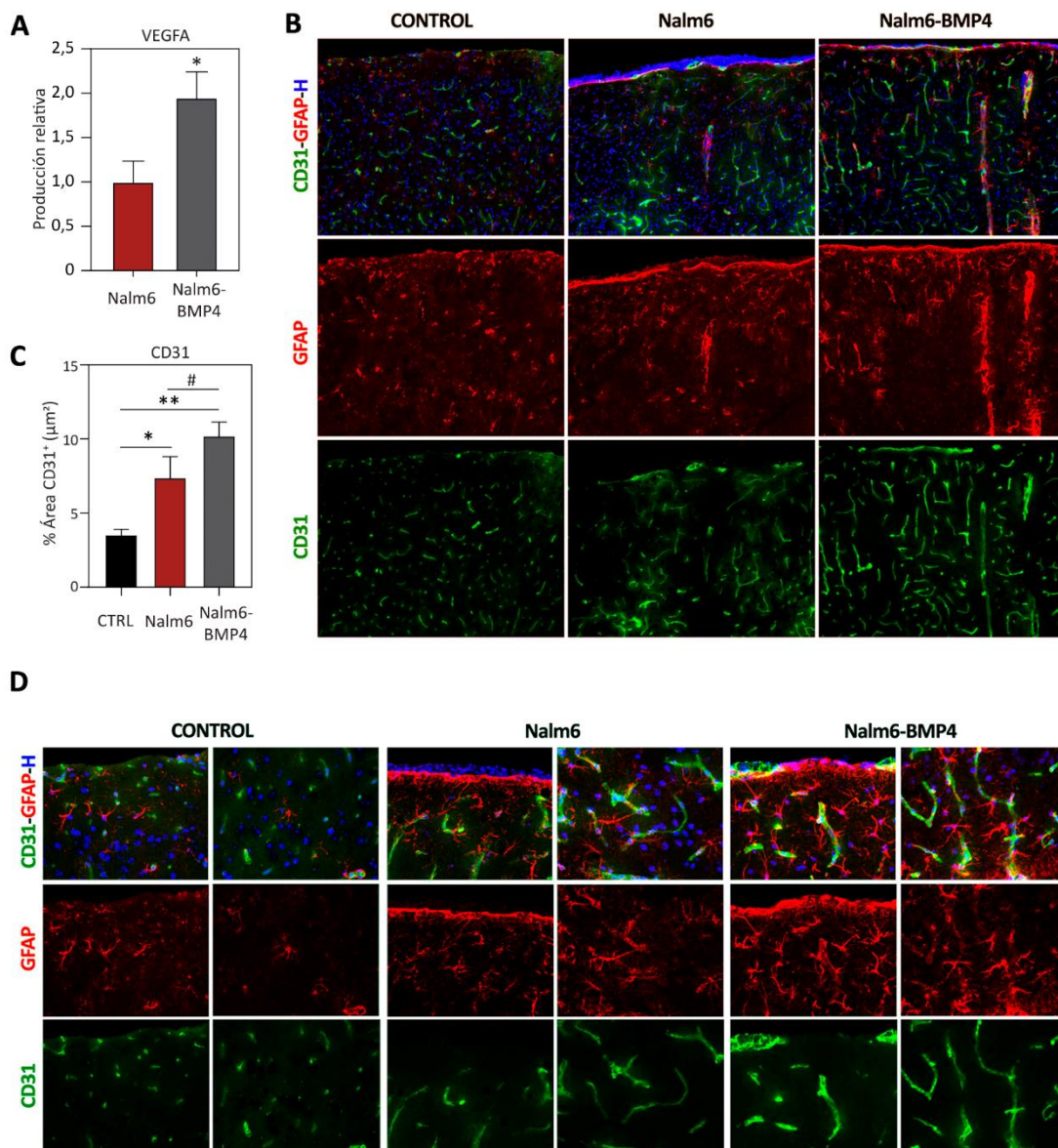
**Figura 48. La sobreexpresión de BMP4 incrementa la capacidad migratoria de las células Nalm6.** La gráfica representa el porcentaje de células Nalm6 y Nalm6-BMP4 CFSE<sup>+</sup> que migran a través de la membrana de un inserto transwell durante 4 horas. Los datos indican la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes (\* $p \leq 0,05$ ).

Por tanto, la sobreexpresión de BMP4 en las células leucémicas provocaba una drástica reducción en su tasa proliferativa justificando los bajos números de células recuperados de bazo y médula ósea en el modelo animal. Sin embargo, estos resultados no explican la sintomatología clínica más agravada que presentaban los animales pertenecientes al grupo Nalm6-BMP4. En este sentido, puesto que tanto resultados publicados por otros autores como los datos mostrados en este trabajo en el apartado 4 ponen de manifiesto la existencia de una respuesta inflamatoria a lo largo del desarrollo de la enfermedad y, dado que BMP4 ha sido descrito como un agente inflamatorio<sup>43</sup>, analizamos si los animales Nalm6-BMP4 presentaban un perfil inflamatorio diferente que pudiera, al menos en parte, ser responsable de la mayor sintomatología clínica. Como se observa en la Figura 49, los niveles de IL-6 de ratón en el momento en el que los ratones fueron sacrificados eran significativamente superiores en el suero de los animales Nalm6-BMP4 respecto a los ratones Nalm6.



**Figura 49. Niveles incrementados de IL-6 en el suero de los animales trasplantados con células Nalm6-BMP4.** La concentración de IL-6 fue cuantificada en el suero de los animales control y en los trasplantados con Nalm6 o Nalm6-BMP4 en el momento de la eutanasia. La gráfica representa la media de 5-6 animales/grupo. Cada punto corresponde a un individuo (\* $p \leq 0,05$ ).

Asimismo, en el SNC de animales Nalm6-BMP4 podía observarse una respuesta astrogial incrementada respecto a los animales Nalm6 sugiriendo que, como en periferia, la expresión incrementada de BMP4 provocaba también una mayor respuesta inflamatoria en el tejido nervioso (Figura 50B, D). Finalmente, cabe destacar que la vascularización en el tejido nervioso de estos animales también aparecía modificada incluso respecto a los animales trasplantados con Nalm6, presentando mayor densidad vascular con vasos sanguíneos de mayor calibre que sugerían la existencia de un proceso angiogénico (Figura 50B-D). Además, la cuantificación de los niveles de VEGFA producidos por Nalm6 y Nalm6-BMP4 evidenciaron una mayor producción del factor angiogénico por estas últimas (Figura 50A).

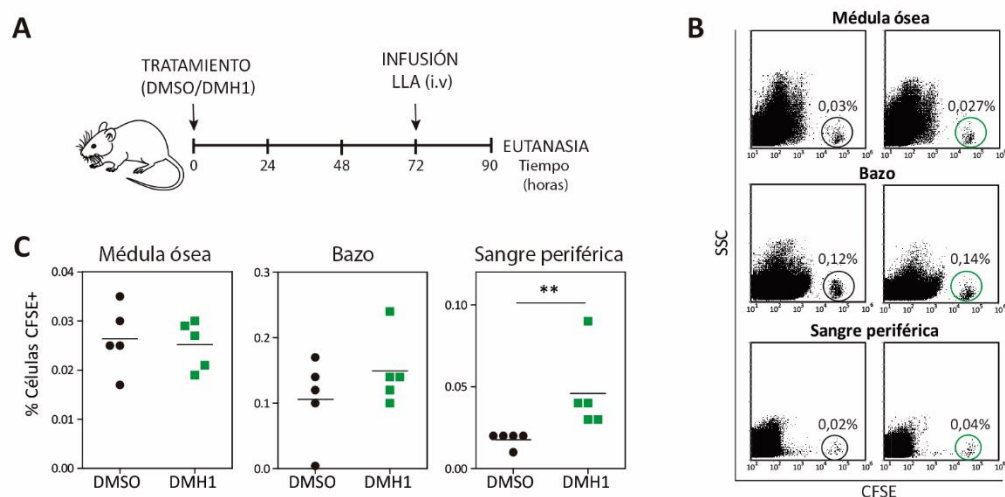


**Figura 50. Efecto de BMP4 en la respuesta astrogliar. Cambios en la vasculatura cerebral. A)** La producción de VEGFA por parte de las células Nalm6 y Nalm6-BMP4 fue analizada mediante CBA en los sobrenadantes recogidos tras 72h de cultivo. La gráfica muestra la producción de VEGFA de las células Nalm6-BMP4 relativa a las células Nalm6. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. \* $p \leq 0.05$ . **B, D)** Imágenes representativas de la corteza cerebral de animales control, Nalm6 y Nalm6-BMP4. Inmunofluorescencia frente a GFAP (rojo) y CD31 (verde). Todos los núcleos están marcados con Hoescht. B:10x; D:40x. **C)** Porcentaje del área de tejido marcada con anti-CD31 de los tres grupos de animales. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ ; comparación frente al grupo control; # $p \leq 0.05$ , comparación respecto al grupo Nalm6.

## 16.El tratamiento con el inhibidor de la señalización canónica de BMP, DMH1, reduce la infiltración leucémica en el SNC

La evaluación de la relevancia de la señalización BMP en el desarrollo y evolución de la LLA fue abordado utilizando diferentes aproximaciones experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*. En primer lugar, seleccionamos 3 muestras primarias de LLA-B que exhibían una elevada expresión de *BMP4* y que, en el grupo de experimentos anteriores habían injertado e infiltrado en SNC en el 100% de los animales. El bloqueo de la señalización se llevó a cabo mediante la implantación de una bomba subcutánea que liberaba diariamente el inhibidor de la vía canónica de señalización BMP, DMH1. En el grupo control, las bombas eran cargadas con el diluyente. Para discriminar entre los posibles efectos del bloqueo de la señalización *BMP4* en el establecimiento y/o el mantenimiento de la enfermedad, se llevaron a cabo distintos diseños experimentales (véanse esquemas adjuntos en cada uno de los apartados).

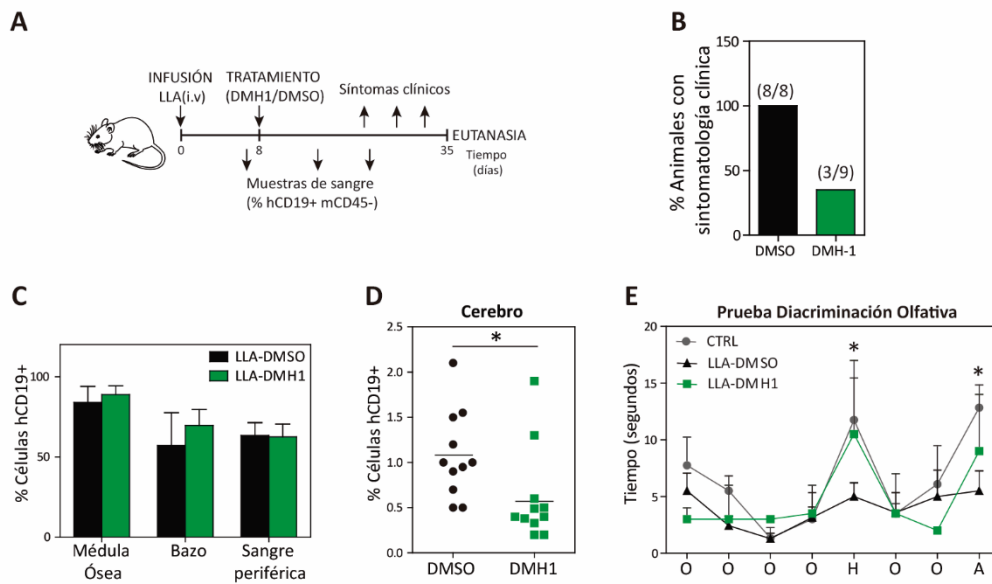
En el primer grupo de experimentos, evaluamos la posible implicación de la señalización *BMP2/4* en el asentamiento de las células leucémicas en los órganos diana. Para ello, fueron implantados dispositivos cutáneos cargados con el inhibidor DMH1 (DMH1-LLA, grupo tratado) o con DMSO (DMSO-LLA, grupo control) 3 días antes de la infusión de las células leucémicas, que previamente habían sido marcadas con CFSE. Los animales fueron sacrificados 16 horas después y las suspensiones de bazo y médula ósea, así como la sangre fueron analizadas por citometría de flujo (Figura 51A, B). Si bien el porcentaje de células leucémicas CFSE<sup>+</sup> detectadas en bazo y médula ósea fue similar en ambos grupos de animales, el estudio en sangre puso de manifiesto mayores números de células leucémicas en los animales DMH1-LLA, pudiendo sugerir esto una menor entrada de las células al conjunto de los órganos diana (Figura 51B, C).



**Figura 51. Efecto de la inhibición de la vía de señalización BMP en el asentamiento de las células leucémicas en los órganos diana. A)** Esquema del diseño experimental. Los dispositivos subcutáneos se implantaron 3 días antes del trasplante de las células leucémicas teñidas con CFSE, iniciándose así el inicio del tratamiento con el inhibidor de BMP, DMH1 (3mg/kg/día), o su diluyente (DMSO). Este se mantuvo hasta el momento en que los animales fueron sacrificados, 16 horas post- trasplante. **B)** Datos representativos del porcentaje de células CFSE<sup>+</sup> encontrados en cada uno de los órganos analizados: médula ósea, bazo y sangre. **C)** Las gráficas representan la media del porcentaje de células CFSE<sup>+</sup> de todos los animales de cada grupo en los diferentes órganos y los valores correspondientes a cada individuo (n=5 animales por grupo). \*\* p<0.01.

A continuación, analizamos el efecto de la inhibición de la vía de señalización canónica de BMP en la evolución de la enfermedad. En este caso, el dispositivo fue colocado 8 días después de la infusión de las células leucémicas, una vez el injerto era detectable. Este dispositivo liberaba, de nuevo, diariamente DMH1 (LLA-DMSO, grupo control; LLA-DMH1 grupo tratado; ver esquema Figura 52A). Todos los animales fueron sacrificados a la quinta semana post-trasplante, momento en el que el 100% de los animales sin tratar, LLA-DMSO, presentaban síntomas de la enfermedad que comprometían su supervivencia. Sólo el 33% de los animales en el grupo tratado presentaban en esos momentos una sintomatología similar (Figura 52B).

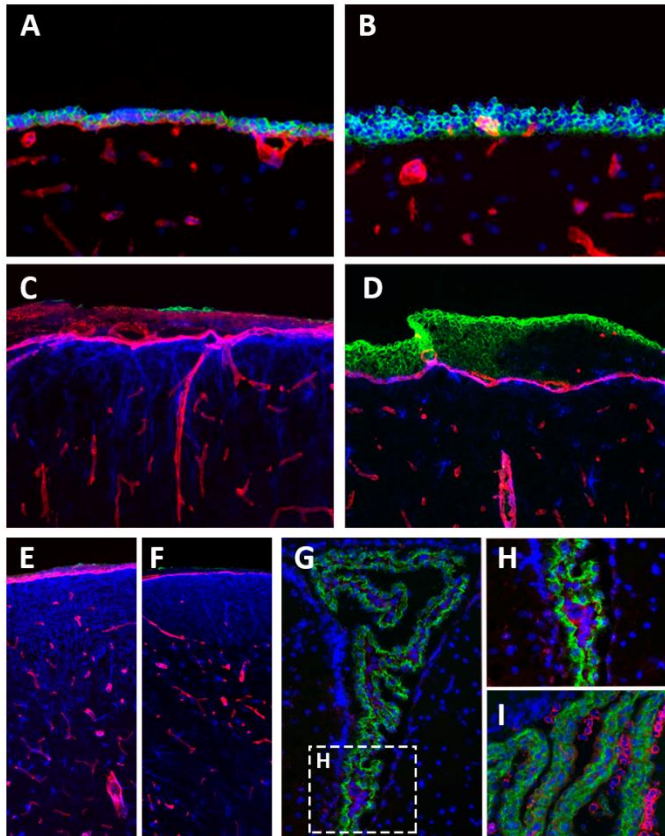
A pesar de las diferencias clínicas observadas entre los dos grupos de animales, los porcentajes de infiltración leucémica en bazo y médula ósea no fueron significativamente diferentes, alcanzando elevados números de células leucémicas en ambos casos y con una viabilidad celular similar. Por el contrario, el bloqueo de la vía canónica de señalización BMP resultó en números de células leucémicas significativamente inferiores en el SNC de los animales que tenían implantada la bomba con el inhibidor (Figura 52C, D). En concordancia, los animales pertenecientes a este grupo respondían de manera similar a los animales sanos cuando eran sometidos a test comportamentales a diferencia de los animales enfermos que presentaban el dispositivo con el diluyente (ALL-DMSO) (Figura 52E).



**Figura 52. Efecto del bloqueo de la señalización BMP durante el desarrollo de la LLA. A)** Esquema del diseño experimental. La implantación de los dispositivos subcutáneos para la administración diaria de DMH1 (3mg/kg/día) o DMSO tuvo lugar 8 días después del trasplante de las células leucémicas en ratones NSG, manteniéndose el tratamiento hasta la aparición de los síntomas clínicos. **B)** La gráfica representa el porcentaje de animales de cada grupo que presentaban una sintomatología característica de la enfermedad (parálisis, pelo erizado, letargo) en el momento del sacrificio (n=8-9 por grupo). **C)** Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de células CD19<sup>+</sup> cuantificado mediante citometría de flujo en la médula ósea, bazo y sangre periférica de los animales LLA-DMH y LLA-DMSO. **D)** Cuantificación de células leucémicas CD19<sup>+</sup> infiltradas en el cerebro de los animales analizados. Se muestra la media de cada uno de los grupos, siendo los puntos cada uno de los individuos analizados (n=11 ratones por grupo). **E)** Evaluación de la capacidad para discriminar olores de los animales LLA-DMH1 frente al grupo de ratones LLA- DMSO. Las gráficas representan el tiempo medio de exploración (segundos)  $\pm$  la desviación estándar empleado por los animales de cada grupo en cada una de las exposiciones a los tres odorantes: octanal (O), heptanal (H) y anisole (A) (n=4-5 individuos por grupo). \* p $\leq$ 0.05.

El estudio mediante inmunofluorescencia del cerebro de estos ratones puso de manifiesto el menor número de células leucémicas presentes en el mismo, en correlación con los datos obtenidos por citometría de flujo. En los animales LLA-DMH1, las escasas células leucémicas encontradas presentaban, en general, una distribución similar a la de los animales LLA-DMSO y a los animales LLA, descrita en el apartado 1 (véase también Figura 16). Sin embargo, a diferencia de estos grupos, las escasas células leucémicas presentes en la meninge de los animales LLA-DMH1 no formaban agregados, sino que se disponían en 1 o 2 hileras fuertemente empaquetadas entre ellas e inmersas en la piamadre (Figura 53A, B). Además, un 75% de los animales tratados presentaban células aisladas en el parénquima, en algunas de las localizaciones anteriormente descritas en los controles, si bien el número era sensiblemente inferior a estos. De nuevo, aunque en menor número, también fueron encontradas células leucémicas en el estroma del plexo coroideo (Figura 53G, H) mientras que estaban ausentes o en número muy reducido en la luz de los ventrículos. Por otra parte, cabe destacar que en los animales tratados LLA-DMH1 se podía observar un incremento en la expresión de laminina, así como un entramado glial GFAP positivo más denso inmediatamente por debajo de la meninge, respecto a lo observado en los controles LLA-DMSO

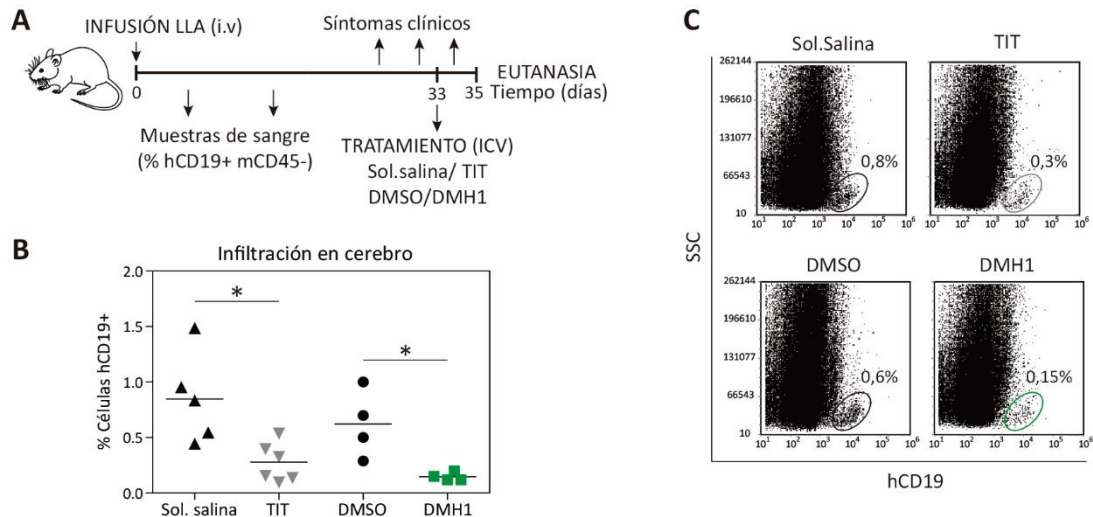
(Figura 53C-F). Estos resultados podrían sugerir que la inhibición de la vía de señalización canónica de BMP desencadena un reforzamiento de la limitante glial-pial situada por debajo de la meninge imponiendo una mayor restricción al paso de las células leucémicas al parénquima nervioso.



**Figura 53. Distribución de las células leucémicas y cambios histológicos en el cerebro de los animales tratados con DMH1.** Presencia de células tumorales dispuestas sobre la piamadre tanto en los animales LLA-DMH1 (A) como en los animales LLA-DMSO (B) x20. Nótese la diferente disposición de las células en los animales tratados con el inhibidor. C-F) Inmunofluorescencia frente a laminina (rojo), GFAP (azul) y CD19 (verde). Obsérvese la diferente expresión de laminina, así como de GFAP entre los animales LLA-DMH1 (C, E) y los LLA-DMSO (D, F), tanto en presencia (C-D) como en ausencia (E-F) de células leucémicas en contacto con la meninge; x20 G-I) Presencia de células tumorales en el estroma del plexo coroideo en los animales tratados con DMH1 (G, H). Nótese el mayor número de células leucémicas en la luz del ventrículo en el grupo no tratado (I); G: x20, H-I: x40.

Puesto que los resultados anteriores indicaban que el tratamiento sistémico con el inhibidor DMH1 era capaz de reducir el número de células presentes en el SNC, analizamos si la administración del inhibidor DMH1 directamente en el LCR tenía este mismo efecto o si, por el contrario, la reducción en el número de células observado era debido a un efecto en la entrada al SNC. Para ello, muestras primarias de células leucémicas que habían demostrado su capacidad para infiltrar el SNC en estudios anteriores, fueron infundidas a ratones NSG. A los 33 días post-inyección, y tras comprobar mediante estudio por citometría de flujo el injerto en sangre, los animales se dividieron en 4 grupos. Un grupo de animales fue inyectado intracerebroventricularmente con DMH1 y otro con el coctel quimioterápico (TIT) utilizado convencionalmente en la terapia intratecal para el tratamiento de la LLA infantil. En paralelo se establecieron grupos control con los diluyentes de ambos tratamientos. Todos los grupos experimentales fueron sacrificados 48 horas después y los cerebros procesados para citometría de flujo (Figura 54A). El análisis no mostró diferencias reseñables en cuanto al porcentaje de injerto en sangre. Como cabía

esperar, el porcentaje de las células leucémicas halladas en el cerebro de los ratones tratados con la quimioterapia convencional fue significativamente menor al grupo de ratones tratados con suero salino (Sol. salino: 0,84% vs TIT: 0,27%). El estudio de los animales tratados con DMH1 reveló también un porcentaje significativamente inferior de células leucémicas en el cerebro de estos animales (DMSO: 0,62% vs DMH1: 0,14%) (Figura 48B, C).



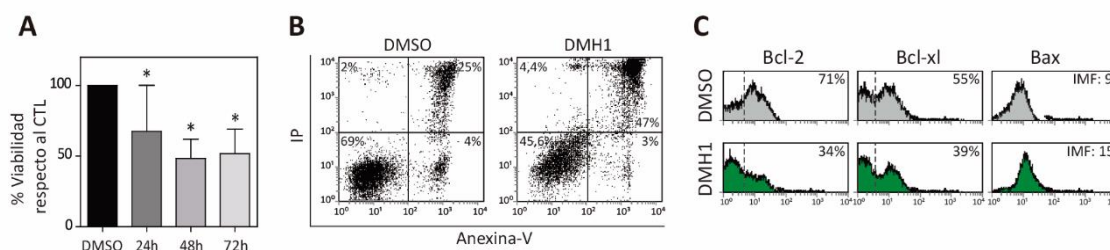
**Figura 54. Efecto de DMH-1 administrado por vía intracerebroventricular en la infiltración en cerebro de la leucemia linfoblástica aguda. A)** Esquema del diseño experimental utilizado. Los animales recibieron cuatro semanas después del trasplante de células leucémicas el inhibidor de la vía de señalización BMP (DMH1), los quimioterápicos (MTX, hidrocortisona y Ara-C) o los diluyentes de estos (DMSO o suero salino, respectivamente) mediante ICV. A las 48 horas de la inyección, los animales se sacrificaron para cuantificar la infiltración de las células leucémicas en el cerebro mediante citometría de flujo. **B)** Se presentan las medias y los datos individuales del porcentaje de células CD19<sup>+</sup> presentes en el cerebro de cada grupo de animales (n=4-6 animales por grupo). \* p≤0.05. **C)** Datos representativos del análisis de las células marcadas con anti-CD19 en la suspensión de cerebro obtenida de cada animal.

El conjunto de estos resultados indica que el bloqueo de la vía de señalización BMP controla, al menos en parte, la migración de las células leucémicas al SNC si bien no parece tener efecto, al menos a estas concentraciones, con este inhibidor y con esta vía de administración, en el número de células leucémicas presentes en el resto de los órganos diana.

## 17. La inhibición de la vía canónica de señalización BMP reduce la viabilidad de las células leucémicas

Células leucémicas de la línea Nalm6 en cultivo fueron tratadas con el inhibidor DMH1 analizándose tras diferentes periodos la recuperación celular, así como el porcentaje de células apoptóticas. Como se observa en la Figura 55A, el número de células leucémicas recuperadas fue sensiblemente inferior en los cultivos tratados con DMH1. En correlación, el porcentaje de células apoptóticas aparecía incrementado en dichos cultivos (Figura 55B). El estudio de marcadores pro- y anti-apoptóticos evidenció que el

tratamiento de células leucémicas con el inhibidor DMH1 provocaba la regulación negativa de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL junto con un incremento en la expresión en la proteína proapoptótica, Bax (Figura 55C).



**Figura 55. Efecto de la inhibición de la vía de señalización canónica de BMP en las células leucémicas.** Células de la línea leucémica Nalm6 fueron cultivadas durante 24, 48 y 72 horas en presencia de DMH1 (10 $\mu$ M) o DMSO. **A)** Cuantificación del porcentaje de células viables mediante tinción con azul tripán. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; comparación células tratadas con DMH1 frente a células cultivadas en presencia de DMSO. **B)** Análisis de la viabilidad de las células leucémicas por citometría de flujo tras 24 horas de tratamiento. En los dot plots se indican los porcentajes de células de cada subpoblación, considerándose viables las células Anexina V<sup>-</sup> IP<sup>-</sup>. Se muestra un experimento representativo de un total de 4 experimentos independientes. **C)** Estudio mediante citometría de flujo de los niveles de expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL y Bax, tras el tratamiento con el inhibidor durante 24 horas. Los datos corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

## 18. Estudio de la expresión de los componentes la vía de señalización BMP en muestras de pacientes de LLA

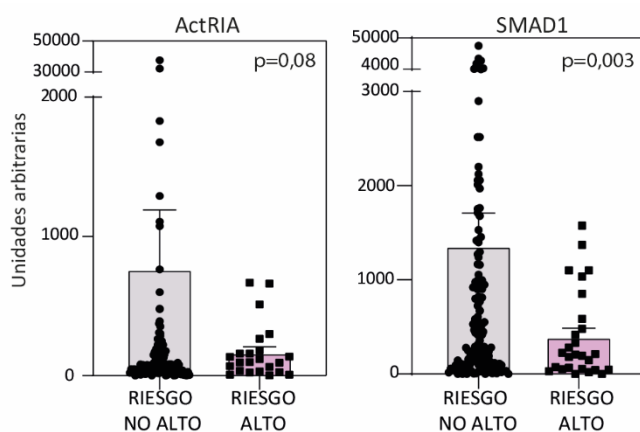
Estudios previos del grupo realizados en una pequeña cohorte de pacientes de LLA sugerían que niveles de expresión elevados del gen *BMP4* en los blastos de niños con LLA-B al diagnóstico se asociaban significativamente con la recaída, observándose una incidencia acumulada de recaídas casi significativa en el grupo con mayores niveles de expresión de *BMP4*. Además, el análisis de la cantidad de *BMP4* en muestras de LCR revelaba una mayor cantidad de esta proteína en los niños que presentaban afectación del SNC al diagnóstico, así como en aquellos que presentaban recaídas en el SNC. Por otra parte, los niños que posteriormente recayeron, expresaban una elevada ratio SMAD1:SMAD7 (Smad activadora: Smad inhibidora de la transducción de la señal BMP) al diagnóstico y, de nuevo, la incidencia acumulada de recaídas era mayor que en el grupo que mostraba una reducida expresión de la ratio. Estos datos indicaban, por tanto, que una mayor expresión de *BMP4* y/o el silenciamiento de la vía de señalización BMP se asocian a las recaídas en la LLA. A tenor de estos resultados, nos planteamos ampliar el estudio y recopilar nuevas muestras de pacientes pediátricos de LLA al diagnóstico para confirmar estos resultados.

Estas muestras se utilizaron por tanto para el análisis, mediante PCRq, de la expresión de los distintos componentes de la vía de señalización BMP incluyendo los ligandos, los receptores, las moléculas

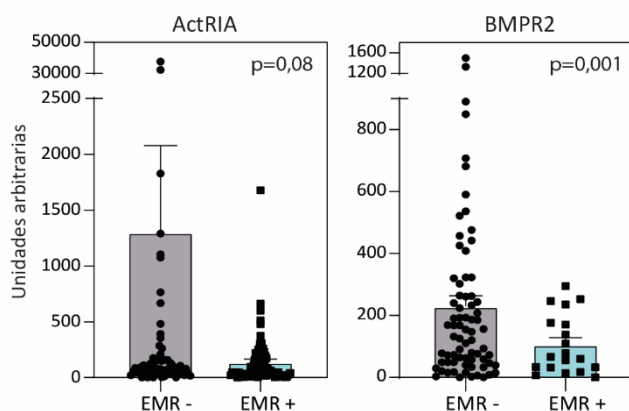
encargadas de la transducción de la señal (BR-Smads y Co-Smad), así como los inhibidores de la misma (I-Smads, Noggin).

El estudio de los diferentes componentes de la vía reveló diferencias entre los dos sexos, observándose una menor expresión del receptor *BMPR1b* y de la BR-Smad, *SMAD1*, en los pacientes varones (*BMPR1b*:  $72,1 \pm 39$  vs.  $361 \pm 117$ ,  $p=0,001$ ; *SMAD1*:  $699,7 \pm 164$  vs-  $1789 \pm 595$ ,  $p=0.004$ ). Los niveles de expresión de todos los componentes de la vía de señalización BMP eran significativamente superiores en las muestras de LLA tipo B respecto a las LLA tipo T analizadas, en concordancia con la relevancia descrita de la vía en la diferenciación del linaje B frente al T<sup>187</sup>. El análisis de los diferentes componentes de la vía de señalización fue llevado a cabo comparativamente entre los grupos de RA frente a no alto (RI y RE), entre EMR+ y EMR- al final de la terapia de inducción (día 33 desde el inicio del tratamiento), y entre el grupo no recaída frente a recaída, mostrándose a continuación sólo aquellos resultados en los que se observaba una tendencia o eran estadísticamente significativos.

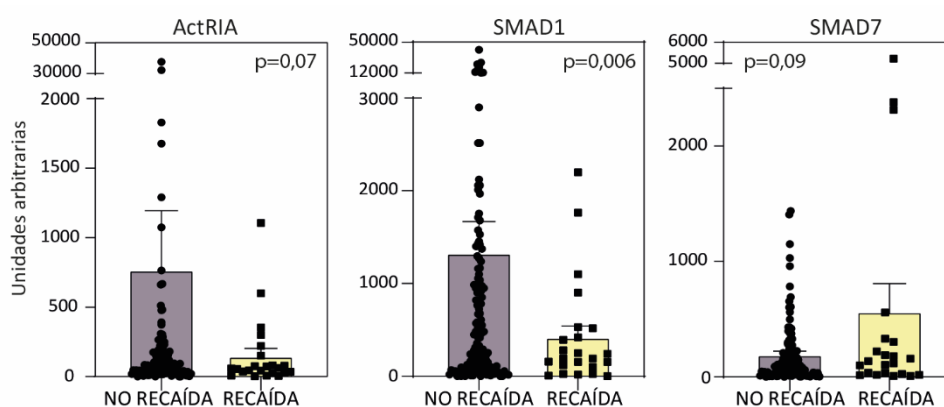
En todos los casos, una menor expresión de los componentes activadores de la vía de señalización canónica de BMP (Receptores y/o BR-smad) se relacionó con los grupos de peor pronóstico. Así, el grupo de RA presentaba niveles reducidos del *ActRIA* y de *SMAD1* (Figura 56). Los blastos de pacientes con EMR+ exhibían, asimismo, niveles de expresión inferiores de *BMPR2* y *ActRIA* respecto a aquellos pacientes con EMR- (Figura 57). Cuando analizamos el grupo de pacientes que recayeron frente a los que no lo hicieron, los primeros presentaban niveles inferiores de expresión, de nuevo, del receptor *ActRIA* y de *SMAD1* (Figura 58), observándose en este caso también un incremento de la Smad inhibidora, *SMAD7*, aunque éste no llegó a ser significativo. A tenor de estos resultados, el análisis por PCRq de los blastos de los pacientes en el momento del diagnóstico sugiere que una regulación negativa de la maquinaria de transducción de la vía de señalización canónica de BMP es indicador de mal pronóstico en la LLA.



**Figura 56. Las muestras de pacientes de LLA incluidos en el grupo de RA presentan menores niveles de expresión del receptor *ActRIA* y la molécula activadora *SMAD1* al diagnóstico. Análisis de los niveles de ARNm mediante PCRq. Estos fueron normalizados frente a la expresión del gen endógeno *GNB2L1*. Las gráficas muestran la media  $\pm$  error estándar. Cada punto corresponde a un paciente.**



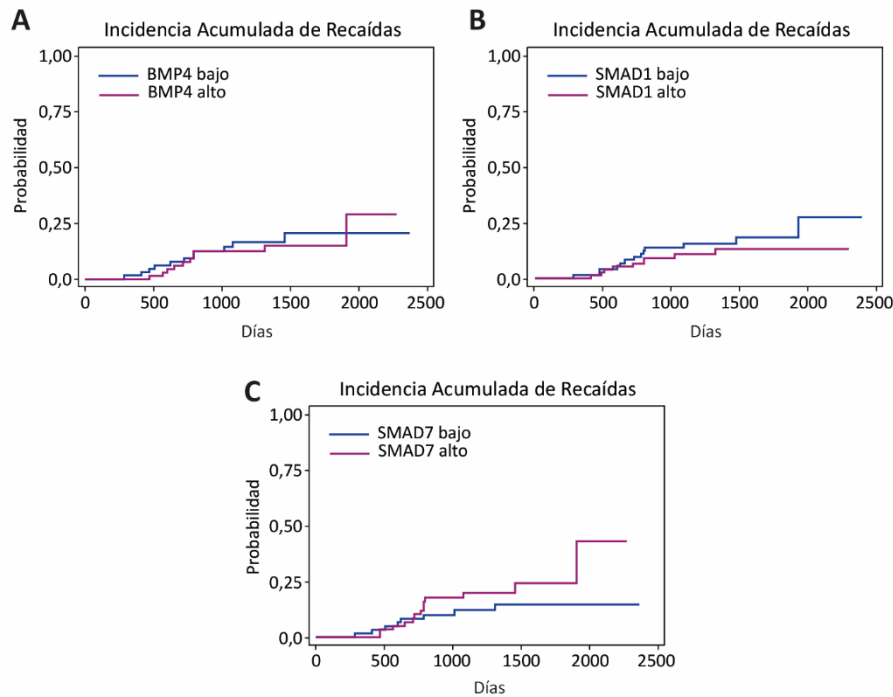
**Figura 57. Expresión de los receptores ActRIA y BMPR2 en función de la EMR.** Análisis de los niveles de expresión por PCRq normalizados frente al endógeno GNB2L1. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de los pacientes analizados que presentaron EMR- o EMR+ a los 33 días desde el inicio del tratamiento. Cada punto corresponde a un paciente de la cohorte analizada.



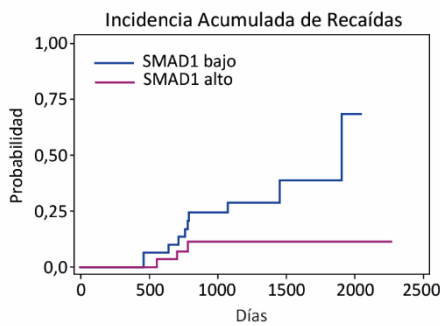
**Figura 58. Niveles de ActRIA y de SMAD1 reducidos se asocian con la recaída.** Análisis por PCRq de la expresión del receptor ActRIA, de la SMAD1 y SMAD7 en función de la recaída en muestras de pacientes obtenidas al diagnóstico. Los niveles de expresión se normalizaron frente a la expresión de GNB2L1. Las gráficas muestran la media  $\pm$  error estándar. Cada punto corresponde a un paciente.

Analizamos a continuación, la supervivencia libre de enfermedad (SLE), las recaídas, así como la incidencia acumulada de recaídas en función de la expresión del gen *BMP4*, *SMAD1* y *SMAD7*. Consideramos la mediana de expresión de cada uno de los genes para separar un grupo con expresión baja (menor que la mediana) y otro de expresión alta (mayor que la mediana). Como se puede observar en la Figura 59A, B, C no se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos. A pesar de esto, y puesto que todos los datos anteriores apuntaban a que una inhibición de la vía de señalización canónica de BMP era relevante en la evolución de la enfermedad, dividimos el grupo de pacientes con altos niveles de expresión de la Smad inhibidora, *SMAD7*, en dos grupos en función de los niveles de expresión de la Smad activadora, *SMAD1*. El análisis estadístico demostró una mayor incidencia de recaídas en los pacientes con una mayor inhibición de la vía de señalización (altos niveles de expresión de *SMAD7* y bajos niveles de expresión *SMAD1*) frente a los que presentaban una menor inhibición de la misma (elevados niveles de

expresión de *SMAD7* y *SMAD1*), (Figura 60) Resultados similares fueron encontrados cuando era considerado exclusivamente el grupo de LLA-B de riesgo no alto (Figura 61).

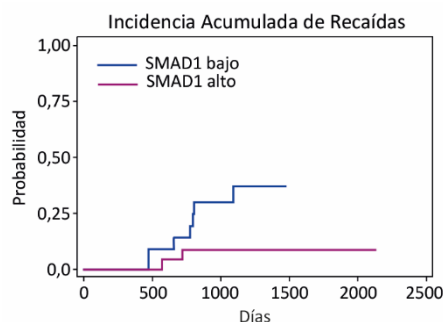


**Figura 59. Incidencia acumulada de recaídas en función de la expresión de *BMP4*, *SMAD1* y *SMAD7*.** A partir de la mediana de los datos de los niveles de expresión de estos genes obtenidos mediante PCRq, los pacientes se clasificaron en 2 grupos (niveles de expresión altos y bajos) y se calculó la proporción de recaídas observadas por unidad de tiempo.



	SMAD1 BAJO			SMAD1 ALTO			p
	Media	EEM	n	Media	EEM	n	
SLE (días)	912,3	143,95	10	691	65,96	3	ns
INCIDENCIA ACUMULADA	69,65	22,28	10	10,94	5,99	3	0,0372

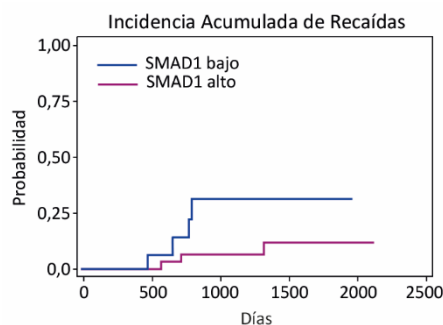
**Figura 60. Incidencia acumulada de recaídas en función de los niveles de expresión de *SMAD1* en pacientes que exhiben una elevada expresión de *SMAD7*.** Los pacientes con niveles de expresión de *SMAD7* superiores a la mediana fueron divididos en función de la expresión de *SMAD1*. A continuación, se llevó a cabo el cálculo de la probabilidad de recaída por unidad de tiempo en cada grupo de pacientes.



LLA-B RI/RE	SMAD1 BAJO			SMAD1 ALTO			p
	Media	EEM	n	Media	EEM	n	
SMAD7 ALTO							
SLE (días)	718,71	103,18	7	640,5	73,5	2	ns
INCIDENCIA ACUMULADA	36,06	11,15	7	7,69	5,23	2	0,033

**Figura 61. Incidencia acumulada de recaídas en función de los niveles de expresión de SMAD1 en pacientes con LLA-B de riesgo no alto que exhiben una elevada expresión de SMAD7.** Estudio de la probabilidad de recaída en el grupo de pacientes de LLA-B no incluidos en el grupo de riesgo alto que mostraban una elevada expresión de SMAD7 en el análisis mediante PCRq, en función de los niveles de ARNm de SMAD1.

Por último, puesto que los resultados, tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando células que expresan niveles incrementados de *BMP4*, comentadas en secciones anteriores, indicaban que altos niveles de *BMP4* correlacionan con un silenciamiento de la vía de señalización canónica, analizamos en el grupo de LLA de riesgo no alto con niveles elevados de *BMP4*, la incidencia de recaídas en función de la expresión de *SMAD1*. Como muestra la Figura 62, aquellos pacientes con niveles altos de *BMP4* y bajos de *SMAD1* presentaban una incidencia de recaídas superior, con tendencia a ser significativa ( $p=0.07$ ).



LLA-B RI/RE	SMAD1 BAJO			SMAD1 ALTO			p
	Media	EEM	n	Media	EEM	n	
BMP4 ALTO							
SLE (días)	670,75	73,06	4	864,67	228,15	3	ns
INCIDENCIA ACUMULADA	30,28	12,9	4	10,84	6,15	3	0,0731

**Figura 62. Incidencia acumulada de recaídas en función de los niveles de expresión de SMAD1 en pacientes con LLA-B de riesgo no alto con niveles elevados de BMP4.** Análisis de la probabilidad de recaída en función de los niveles de ARNm de SMAD1, en los pacientes pertenecientes al grupo de LLA-B de RI o RE que exhibían una elevada expresión de BMP4



# DISCUSIÓN



Teniendo en cuenta la afectación del SNC, la LLA se ha descrito principalmente como una enfermedad meníngea que afecta a la duramadre, las leptomeninges o ambas <sup>11</sup>. En base a estudios anatómicos realizados en la década de los 70, y a datos obtenidos a partir de los modelos animales de LLA, diferentes rutas no excluyentes han sido propuestas para explicar cómo las células leucémicas alcanzan el LCR y las meninges. Primeramente, las células leucémicas podrían ingresar al SNC a través de la circulación sistémica. Esta hipótesis surge a partir de estudios de autopsias que demuestran que la infiltración leucémica aparece inicialmente en las paredes de las venas aracnoideas superficiales, sugiriendo que las células podrían alcanzar el SNC por diseminación hematogena, migrando a través del endotelio venoso, presumiblemente a través del plexo venoso de Batson <sup>5, 190</sup>. Alternativamente, las células leucémicas podrían diseminarse directamente desde la médula ósea del cráneo hacia las meninges a través de los vasos emisarios <sup>76, 191</sup>. En este sentido, un estudio reciente de Yao *et al.* sugiere que las células leucémicas migran hacia el SNC aprovechando la matriz extracelular de la capa adventicia de las venas emisarias que cruzan hacia los senos venosos a través de los orificios óseos <sup>14</sup>. Además, las células también podrían llegar al LCR a través del plexo coroideo <sup>75</sup>. Otra posibilidad incluye la salida de células leucémicas desde la médula ósea hasta la duramadre a través de pequeñas lesiones producidas por los blastos leucémicos en el tejido óseo, tanto de los huesos del cráneo como en las vértebras. Recientemente se han descrito diferentes zonas del SNC en las que la barrera aracnoidea presenta discontinuidades importantes (donde las uniones estrechas presentan una mayor permisividad al paso) como es el caso de la región superpuesta a la placa cribosa (a nivel del bulbo olfatorio), la eminencia media (región peripituitaria) y la glándula pineal <sup>24</sup> permitiendo el paso de células. Esto sugiere que las células leucémicas presentes en la duramadre podrían alcanzar más fácilmente el espacio subaracnoideo a través de estas regiones.

Una vez las células leucémicas alcanzan el espacio subaracnoideo se diseminan por el mismo asentándose sobre las trabéculas aracnoideas y sobre la piamadre, bien como células aisladas, en pequeños grupos o en agregados de mayor tamaño, tal y como describieron Price *et al.* en su estudio histológico de cerebros procedentes de 126 autopsias de pacientes pediátricos de LLA (1972). El modelo animal utilizado en el presente trabajo recrea fielmente la distribución en el espacio subaracnoideo de los blastos leucémicos descrita por Price, especialmente cuando se utilizan células primarias. Un aspecto fundamental en nuestro estudio fue el análisis de los grandes agregados tumorales leptomeníngeos. Nuestros resultados indican que estas metástasis leptomeníngeas focales no se localizan al azar, sino que, como ha sido descrito en las metástasis de tumores sólidos <sup>24</sup>, aparecen preferentemente en zonas en las que la velocidad del LCR es reducida, como son la base del cerebro (cisterna magna) y las cisuras cerebrales. La cisterna lumbar, junto con la cisterna magna, representan las zonas de mayor acumulación de LCR, comportándose como lagunas en las que la velocidad del mismo está ralentizada. En este sentido, aunque no se presenta en este trabajo el estudio histológico de la metástasis de la LLA en la médula espinal, la parálisis observada de manera recurrente en los miembros inferiores de los ratones con LLA durante la progresión de la

enfermedad, sugiere la presencia de abundantes células leucémicas en esta región que comprimirían las raíces nerviosas que inervan estos músculos (resultados histológicos no mostrados).

Estas zonas con una menor velocidad del LCR, facilitarían presumiblemente el anclaje y mantenimiento de agrupaciones de blastos leucémicos asentándose sobre la piamadre y utilizando las trabéculas aracnoideas como pilares estructurales. Se forman así estructuras complejas, vascularizadas, donde las células leucémicas se encuentran en un entramado de matriz extracelular, células fibroblásticas y macrófagos aracnoideos. Estas estructuras recuerdan a las descritas recientemente en estudios post-mortem de pacientes con esclerosis múltiple progresiva. En este caso, se observan agregados leucocitarios en la superficie meníngea que como ha sido descrito, presentan características comunes a las de los agregados ectópicos organizados, conocidos como tejido linfoide terciario (TLTs). En ellos, las células fibroblásticas experimentan, como consecuencia de una infección, un daño tisular u otros estímulos inflamatorios, cambios fenotípicos y funcionales que facilitan el reclutamiento de células del sistema inmune<sup>192-194</sup>. Del mismo modo, en el caso de la LLA, una vez producida la infiltración en el SNC, las células leptomeníngeas podrían responder a los estímulos inflamatorios presentes tanto en el LCR como en las propias leptomeninges (citoquinas y componentes de matriz)<sup>195</sup>, modificando sus características y permitiendo así el establecimiento de agregados leucémicos como los descritos en el modelo xenogénico en este trabajo o los encontrados previamente en autopsias de pacientes de LLA. A diferencia de las células leucémicas aisladas o dispuestas en pequeños grupos localizadas en el espacio subaracnoideo, los blastos leucémicos presentes en estos agregados vascularizados pueden tener acceso a los nutrientes necesarios al tiempo que son protegidos de los efectos de los quimioterápicos. En este sentido, nuestros resultados muestran que las células presentes en estos agregados se encuentran mayoritariamente quiescentes, principalmente aquellas en contacto con la piamadre, lo que les proporcionaría un mecanismo de resistencia a los tratamientos convencionales. En correlación, estudios *in vitro* llevados a cabo por Aker *et al.*, describen que el co-cultivo de líneas leucémicas pre-B con células leptomeníngeas protege a las primeras de la muerte inducida por fármacos quimioterápicos<sup>25</sup>. Del mismo modo, resultados reportados recientemente por Kato *et al* indican que las células leucémicas que infiltran el SNC son más quiescentes que aquellas que se alojan en la médula ósea<sup>20</sup>. Presumiblemente, las señales inductoras que llevan a los blastos leucémicos en contacto con las leptomeninges a este estado quiescente, podrían ser las mismas que mantienen la población, recientemente descrita en ratón, de progenitores neurogénicos en estas localizaciones en estadios perinatales<sup>196</sup>.

El papel de la microglía en el contexto de la metástasis del cáncer en SNC ha cobrado un especial interés en los últimos años. Dejando atrás la idea simplista de que la microglía se mantiene en un balance entre los estados pro- (M1) o anti- (M2) inflamatorio, recientes análisis de transcriptómica revelan un comportamiento complejo de la microglía que parece adquirir características propias en cada patología, incluyendo tumores primarios y metástasis cerebrales (*Disease-Associated Microglia, DAM*)<sup>197, 198</sup>. En el caso de los tumores que producen metástasis, principalmente leptomeníngeas, los datos existentes en

relación con el comportamiento de la microglía son muy escasos. En el caso de la LLA, únicamente el reciente trabajo de Kinjyo *et al.* apunta la existencia de una respuesta microglial a la presencia de células leucémicas aunque la calidad del estudio histológico llevado a cabo en este trabajo hace difícil poder sacar alguna conclusión al respecto <sup>199</sup>. Nuestro estudio histológico indica que en la corteza cerebral de los animales enfermos puede observarse, a diferencia de los animales control, una microglía activada de morfología ameboides. Esta microglía de carácter pro-inflamatorio, que ha sido descrita por aparecer en respuesta a un daño agudo o crónico del SNC <sup>200</sup>, se observaba en zonas corticales, principalmente próximas a espacios perivasculares ocupados por células tumorales. La activación de estas células podría estar mediada, en el caso de la LLA, por las citoquinas inflamatorias (producidas por las células leucémicas, las células endoteliales, las células epiteliales del plexo...) y/o por productos resultantes del daño celular (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs). La relevancia en el contexto de la LLA será comentada posteriormente. Por otra parte, las imágenes histológicas también ponen de manifiesto que inmediatamente por debajo de la piamadre, de manera puntual y coincidiendo fundamentalmente con algunas zonas en las que se encuentran los acúmulos leucémicos, pueden observarse células microgliales de morfología bipolar perfectamente alineadas. Este tipo de microglía bipolar o en bastón fue inicialmente descrita en el córtex cerebral de pacientes con daño cerebral difuso asociado a diferentes patologías <sup>201</sup>. Estudios posteriores han demostrado que esta microglía tiene una elevada tasa proliferativa, capacidad fagocítica y produce niveles elevados de IL-10 y TGF- $\beta$  <sup>202</sup>. Además, para su alineamiento formando una estructura como la que se aprecia en nuestro estudio por debajo de la piamadre, se requiere de una superficie rica en laminina como la que se encuentra en esta localización <sup>203</sup>. Esta microglía bipolar aparece de forma transitoria en estadios iniciales tras un daño tisular donde parece ejercer un papel neuroprotector <sup>204, 205</sup>. Roth *et al.* analizando la respuesta inflamatoria tras un daño cerebral por compresión, indicaron que inicialmente tenía lugar la muerte de células meníngeas, e inmediatamente después las células de microglía próximas extendían 2-3 procesos sobre la limitante glial comprometida formando una red protectora entre la que se disponen los somas de los astrocitos <sup>206</sup>. En el contexto de la LLA, la acumulación de células leucémicas en determinadas localizaciones del espacio subaracnoideo podría provocar una situación de compresión similar y desencadenar del mismo modo, una respuesta protectora por parte de la microglia.

Como en el caso de la microglia, los astrocitos también responden a la presencia de acúmulos de blastos leucémicos en las leptomeninges aumentando su número y su expresión de GFAP en las capas corticales externas más cercanas a los mismos. El papel de los astrocitos en metástasis leptomeníngeas no ha sido abordado hasta la fecha. En el caso de tumores como mama o pulmón que invaden el parénquima nervioso, los astrocitos a través de su producción de plasmina parecen representar una primera línea de defensa reduciendo el número de células metastásicas a través de mecanismos que incluyen la liberación de FasL de su membrana convirtiéndola en una señal de muerte para las células tumorales (que expresan Fas) <sup>207</sup>. En la LLA, la menor expresión en los blastos leucémicos de la médula ósea del receptor de FasL,

CD95, se ha correlacionado con un peor pronóstico<sup>208</sup>. Si esto puede estar relacionado, además de con una menor respuesta inmune periférica frente al tumor, con la capacidad de los blastos de evadir la posible respuesta astrocitaria en el cerebro, no ha sido estudiado hasta el momento. En este sentido, si bien no conocemos la expresión de CD95 en los blastos leucémicos que alcanzan el parénquima nervioso, nuestros resultados muestran que las células leucémicas asentadas en el parénquima nervioso no presentan signos de muerte celular.

En conjunto, nuestros resultados apuntan que tanto astrocitos como microglía responden a la presencia de la metástasis leptomeningea de la LLA, contribuyendo presumiblemente a la respuesta inflamatoria que se detecta en el parénquima nervioso. Como se discutirá más adelante, esta respuesta inflamatoria puede ser responsable, al menos en parte, del daño tisular observado en el SNC de los animales enfermos y que, finalmente, provoca alteraciones funcionales. En cualquier caso, al igual que ha sido descrito para otros tumores, un estudio exhaustivo del papel de la microglía y astrocitos en el contexto de la LLA es necesario para conocer su repercusión en la progresión de la enfermedad en el SNC.

Uno de los efectos más llamativos de la presencia de las células leucémicas en el SNC y que ha sido descrito por primera vez en el presente trabajo, es el incremento del número y tamaño de los vasos sanguíneos en el parénquima nervioso. Procesos angiogénicos similares a los observados en este trabajo han sido descritos en el contexto de otros tumores que afectan al SNC. En estos estudios se describió la aparición de nuevos vasos que presentan una organización aberrante y una permeabilidad alterada provocando un incremento de la presión intersticial, hipoxia, necrosis y edema en el parénquima nervioso<sup>209</sup>.

Diferentes trabajos apuntan a la relevancia de los procesos angiogénicos en el contexto de los tumores hematológicos. En este sentido ha sido descrito en la médula ósea de pacientes con diferentes tumores hematológicos, incluida la LLA, un incremento en el contenido de vasos sanguíneos respecto a la médula ósea de donantes sanos<sup>26, 210</sup>. Este efecto ha sido asociado con un peor pronóstico y con recaídas tanto en nódulos linfomatosos como en el contexto leucémico<sup>210, 211</sup>. El factor VEGFA, producido por las células leucémicas, podría ser uno de los principales responsables de los efectos angiogénicos observados tanto en la médula ósea, como los aquí apuntados en el parénquima nervioso. En este sentido, nuestros resultados muestran una correlación entre los mayores niveles de VEGFA, encontrados en las células que sobreexpresan BMP4, y un mayor desarrollo de la microvasculatura cerebral en los animales a los que se les infunden estas células, comparadas con los trasplantados con células Nalm6 control (ver más adelante).

Junto al papel angiogénico descrito arriba, se han propuesto otros efectos de VEGFA producido por las células leucémicas que incluyen modulación de la integridad de las barreras vasculares, de la producción de citoquinas por éstas o efectos autocrinos en las células tumorales<sup>212</sup>. Así, desde hace más de una década, los estudios tanto en modelos preclínicos como los datos obtenidos de diferentes cohortes de pacientes, ponen de manifiesto la relevancia de los niveles de VEGFA en el desarrollo y progresión de la

LLA <sup>213, 214</sup>. En relación con la metástasis en cerebro, la expresión incrementada de VEGFA en las células leucémicas que infiltran el SNC ha sido relacionada con procesos adaptativos de las células leucémicas en respuesta a la hipoxia, en coherencia con el microambiente del SNC <sup>20</sup>. Además, esa expresión incrementada parece favorecer la migración transendotelial facilitando, específicamente, la invasión por parte de los blastos leucémicos del espacio subaracnoideo. En este sentido, los resultados obtenidos en un modelo animal de LLA similar al utilizado en este trabajo indican que el tratamiento con Bevacizumab (que inhibe específicamente el VEGFA humano, pero no de ratón), reduce significativamente la infiltración meníngea afectando en menor medida la carga leucémica en médula ósea <sup>20, 96</sup>. Junto con este papel en el desarrollo de la enfermedad, VEGFA ha sido recientemente implicado también en el desarrollo de quimiorresistencia a vincristina en LLA <sup>215</sup>.

En los últimos años las revisiones que abordan la infiltración leucémica en el SNC hacen hincapié no sólo en la necesidad de buscar terapias que limiten la entrada de los blastos leucémicos al cerebro (que parece una propiedad intrínseca a la leucemia), sino también en la importancia de conocer las localizaciones que actúan como santuarios dentro del mismo y que les permiten sobrevivir. Sin embargo, son muy escasos los trabajos que abordan este último aspecto. Los resultados mostrados en el presente trabajo inciden precisamente en esta cuestión. Si bien la mayor carga leucémica en el SNC se localiza en el espacio subaracnoideo en el modelo animal de LLA utilizado, las imágenes de inmunofluorescencia y el estudio por citometría de flujo permiten demostrar la existencia de cadenas de blastos leucémicos que avanzan a través de las capas del cortex cerebral, pequeños grupos de células leucémicas aislados en el parénquima nervioso alejados de la piamadre, blastos alojados en el nicho neurogénico así como blastos presentes en el estroma del plexo coroideo (este última localización será discutida en el apartado siguiente). La invasión del parénquima nervioso por blastos leucémicos fue descrita ya por Price *et al.* (1973) como un hecho que sucede en los estadios más avanzados de la enfermedad. Este hecho, en realidad, debe ser más frecuente de lo que aparece descrito en este trabajo ya que en el mismo se incluyen solo estudios histológicos con técnicas convencionales lo cual dificulta, y en muchos casos hace imposible, identificar pequeños grupos de células tumorales en el parénquima nervioso como los que se muestran en este trabajo (por ejemplo, entre las células de los granos en el cerebelo, Figura 13). Por otra parte, el hecho de que en los años 70, la esperanza de vida para estos pacientes fuera menor debido a la administración de tratamientos menos eficaces frente a la leucemia y, por tanto, al mantenimiento de una mayor carga tumoral, podría impedir que se alcanzasen estas fases más avanzadas de la enfermedad en las que tendría lugar la infiltración del parénquima por los blastos siendo, quizás en estos momentos, un evento más frecuente.

Las células leucémicas presentes en el parénquima nervioso podrían alcanzar éste por diferentes rutas no excluyentes. En correlación con lo descrito previamente por Price *et al.* en autopsias de pacientes de LLA<sup>5</sup>, nuestros datos ponen de manifiesto que la BHE se mantiene esencialmente íntegra y, que las células leucémicas presentes en los espacios perivasculares alcanzan éstos acompañando básicamente a los vasos sanguíneos que penetran por los espacios de Virchow-Robin, y no como consecuencia de procesos

de transmigración a través de los endotelios capilares presentes en el parénquima. Por el contrario, tanto las imágenes de microscopía de fluorescencia como las de IRM-Gd ponen de manifiesto, de manera inequívoca, la rotura de la barrera glial-pial en los animales enfermos de LLA, coincidiendo principalmente con aquellas zonas en las que es más frecuente encontrar los acúmulos leucémicos menígeos descritos anteriormente. Si bien no existen datos relacionados con los mecanismos responsables de la rotura de esta barrera en la LLA, se ha descrito que las metaloproteasas MMP2 y MMP9 tienen un papel esencial en la degradación de los componentes de la membrana glial-pial y su desorganización posterior, permitiendo la entrada de células metastásicas de tumores de mama y pulmón <sup>216</sup>. Niveles incrementados de MMP9 han sido descritos en el LCR de pacientes de LLA con infiltración leucémica en SNC <sup>195</sup> lo que podría sugerir que también en el caso de LLA esta proteasa podría estar implicada en la degradación de los componentes de la limitante glial-pial. Por otra parte, nuestros datos y los de otros <sup>217</sup> indican que las células leucémicas presentan una elevada expresión de ADAM10, una desintegrina-metaloproteína implicada en muchos procesos fisiológicos y patológicos, incluidos distintos tipos de cáncer. Precisamente, N-cadherina, una molécula que media en parte la adhesión entre las células leptomenígeas (resultados no mostrados), se ha descrito entre los numerosos sustratos de esta proteasa <sup>218, 219</sup>. Podría especularse que la acumulación de blastos leucémicos en los agregados leptomenígeos descritos, permitiría alcanzar niveles suficientes de ADAM10 para comprometer las uniones entre las células leptomenígeas permitiendo la apertura de espacios en la limitante glial-pial.

Otro factor que podría ser decisivo en la rotura de la barrera glial-pial es el ambiente pro-inflamatorio, presente tanto en el suero sanguíneo como en el SNC de los animales, donde correlaciona directamente con el porcentaje de infiltración leucémica. Además, estudios previos en pacientes de LLA han puesto de manifiesto niveles significativamente más altos de IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$  y IL-6 al inicio de la enfermedad, y antes de recibir las terapias anti-tumorales, y revelan una fuerte asociación positiva entre la expresión de citoquinas y quimioquinas en el LCR y el desarrollo y recaída de la leucemia en SNC. Además, estudios *in vitro* sugieren que los sueros de los pacientes de LLA afectan la permeabilidad de BHE sin que hasta el momento se haya analizado su impacto sobre otras barreras cerebrales <sup>28, 90, 91, 195</sup>. Como hemos señalado anteriormente, la contribución a la respuesta inflamatoria del compartimento menígeo ha sido descrita en patologías autoinmunes y en procesos infecciosos <sup>220</sup>, donde ha sido asociado con la rotura de la limitante glial-pial y con la invasión leucocitaria del parénquima subpial <sup>193, 194</sup>.

La introducción en los años 70 de la terapia dirigida al SNC junto a la quimioterapia sistémica, representó un punto de inflexión en el tratamiento de la LLA consiguiéndose reducir de manera muy notable la mortalidad en estos pacientes. Sin embargo, como ya hemos señalado en la introducción de este trabajo, aún hoy las recaídas en el SNC suponen entre 2-7% de los casos siendo ésta una de las principales causas de morbilidad y mortalidad por enfermedad en niños <sup>6, 70, 71</sup>. La búsqueda de los nichos donde la LLA puede asentarse y sobrevivir a la quimioterapia es una cuestión clave en este contexto. Como en el caso de los pacientes, nuestros resultados indican que la terapia intratecal es capaz de reducir de manera significativa

la carga leucémica en el SNC, sin embargo, un bajo porcentaje de blastos todavía persiste. Las imágenes de fluorescencia ponen de manifiesto que los acúmulos de células leucémicas alojados entre las neuronas corticales sobreviven a la quimioterapia a pesar de que grupos de somas neuronales cercanos sean positivos para marcadores de muerte celular. Por lo tanto, nuestros resultados muestran por primera vez que las células leucémicas que consiguen alcanzar el parénquima nervioso son resistentes a la quimioterapia convencional, sugiriendo que éstas pueden ser responsables de las recaídas posteriores en SNC.

Nuestro estudio pone de manifiesto también la presencia de células leucémicas en otras localizaciones estratégicas del parénquima nervioso como es la SVZ. Los blastos leucémicos podrían alcanzar esta zona atravesando el cortex cerebral desde la piamadre hasta el nicho neurogénico o utilizando rutas preexistentes utilizadas por progenitores neurales. En este sentido, recientemente Bifari *et al.*, utilizando diferentes estrategias experimentales, han demostrado que progenitores neurales presentes en las meninges migran a través de la tela coroidea hasta alojarse en la pared del ventrículo lateral para posteriormente generar neuronas que se integran en circuitos corticales <sup>196</sup>. Los blastos leucémicos podrían seguir esta misma ruta moviéndose a través de estas proyecciones meníngeas hasta alcanzar la SVZ. Como indican nuestros resultados, una vez aquí podrían utilizar la ruta migratoria rostral hasta alcanzar el bulbo olfatorio donde también detectamos pequeños grupos de blastos leucémicos. En este sentido, las células leucémicas secuestrarían mecanismos neurales para asentarse en diferentes localizaciones del parénquima nervioso al igual que ha sido propuesto recientemente para su entrada desde la duramadre hasta el espacio subaracnoideo <sup>14</sup>.

En 2015, Heidari *et al.* hipotetizaron que el microambiente presente en los nichos neurogénicos podría constituir un santuario para las células *stem* leucémicas ya que compartía algunas características comunes con los nichos de células *stem* hematopoyéticas <sup>29</sup>. Sin embargo, hasta nuestro conocimiento este es el primer trabajo que demuestra la presencia de blastos leucémicos en el nicho neurogénico de la SVZ. Recientemente, el grupo de la Dra Fariñas publicó la técnica que permitía aislar, disgregar y estudiar por citometría de flujo las poblaciones celulares de la SVZ <sup>182</sup>. En colaboración con su grupo, y utilizando esta misma estrategia experimental, hemos sido capaces de demostrar que la SVZ representa un lugar de asentamiento para blastos leucémicos. Futuros experimentos son necesarios para abordar si esta zona pudiera representar realmente un santuario para las células leucémicas donde, tanto los factores que controlan la diferenciación de las NSCs (entre ellos BMP4 como se discutirá más adelante) como otros factores producidos como consecuencia de la infiltración, podrían favorecer la supervivencia de las células leucémicas. Entre estos últimos, nuestros datos apuntan un incremento significativo de CXCL10, molécula que ha sido descrita por tener un papel quimiotáctico e inductor de quimiorresistencia en LLA <sup>81</sup>.

Si bien en los dos últimos años, los datos publicados en relación al impacto de la generación de nuevas neuronas en la SVZ y SGZ en los individuos adultos son controvertidos <sup>135,136</sup>, su relevancia en el desarrollo

del tejido nervioso en los primeros años de vida es incuestionable. Dado que los pacientes a los que afecta la LLA son de corta edad, la relevancia del impacto que la presencia de los blastos leucémicos tenga en los procesos de neurogénesis es innegable. En este sentido, la presencia de las células leucémicas provoca un bloqueo de la diferenciación de las NSCs que es, además, proporcional al porcentaje de infiltración en la zona. Los mecanismos responsables de esta inhibición podrían estar relacionados con la fuerte respuesta inflamatoria producida en el propio nicho como consecuencia de la infiltración. En este sentido, se ha atribuido la capacidad para afectar la neurogénesis adulta y embrionaria a altos niveles de TNF- $\alpha$ , asociándose sus efectos al bloqueo de la proliferación de las NSCs<sup>221-226</sup>.

La infiltración leucémica en el SNC provoca, junto con la anteriormente discutida alteración de la neurogénesis, importantes daños histológicos que tienen un correlato funcional como indican los test comportamentales realizados. Además, en ausencia de infiltrado leucémico directo, también se observan cambios histopatológicos que incluyen gliosis reactiva, degeneración del tejido neural y necrosis neural como habían descrito previamente otros autores tanto en modelos animales como en autopsias de pacientes de LLA<sup>5, 75, 76</sup>.

A tenor de todo lo anterior, la infiltración leucémica en el SNC tanto a través del proceso inflamatorio que desencadena como de la alteración de la neurogénesis, podría contribuir al desarrollo de los problemas neurocognitivos descritos en pacientes supervivientes de LLA y atribuidos hasta el momento exclusivamente a los efectos secundarios de la quimioterapia. Los déficits cognitivos descritos incluyen un detrimento significativo y persistente de la inteligencia, una reducida velocidad de procesamiento, de la memoria de trabajo, de la memoria verbal y visual, de la función ejecutiva y de la atención. Este deterioro neurocognitivo, observado en los supervivientes, está relacionado con una alteración de la integridad neuroanatómica, una reducción en el volumen cerebral e hiperactivación de la red de atención frontoparietal<sup>30, 31, 71, 73, 227</sup>.

El plexo coroideo, responsable de la formación del LCR, se encuentra localizado en los ventrículos cerebrales y representa una de las barreras celulares fundamentales entre la sangre y el LCR. Está constituido por una capa de células epiteliales que abrazan un estroma conjuntivo con abundantes capilares fenestrados. En contraste con los capilares presentes en el parénquima cerebral, el endotelio de los capilares del plexo coroideo carece de uniones estrechas y glia astrocítica limitante siendo por tanto más permisivo al paso de moléculas o células a través tanto de sus fenestraciones, como a través de la vía paracelular. Son entonces, las uniones estrechas situadas entre las células epiteliales del plexo coroideo, las que constituyen la verdadera barrera sangre-LCR a este nivel.

Diferentes trabajos apuntan a la vasculatura del plexo coroideo como el punto de entrada de células del sistema inmune, tanto en condiciones normales como patológicas, así como de metástasis hematógenas de tumores sólidos que alcanzan la meninge <sup>228, 229</sup>. Las características histológicas y la relevancia demostrada de esta vía de entrada para los leucocitos, ha llevado a algunos autores a sugerir la BSLCR como un punto de entrada clave para la diseminación leptomeníngea en la LLA pediátrica <sup>17</sup>. Hasta el momento, los trabajos dirigidos a demostrar la implicación de esta ruta de entrada en la LLA incluyen, fundamentalmente, aproximaciones *in vitro* que demuestran la migración transcelular y paracelular de células de líneas leucémicas T y B a través de una monocapa de células epiteliales del plexo coroideo <sup>230, 231</sup>. En el caso de los modelos xenogénicos de LLA, sin embargo, el reciente trabajo de Yao *et al.* <sup>14</sup> sugiere que esta vía de entrada sería minoritaria ya que en sus estudios histológicos sólo encuentran de manera ocasional células de la línea Nalm6 en los vasos del plexo coroideo.

Los resultados derivados de nuestro estudio en el modelo xenogénico de LLA utilizando, a diferencia del trabajo publicado por Yao *et al.*, muestras primarias de pacientes, indican la presencia de células leucémicas tanto en la luz del ventrículo, donde en muchos casos aparecen fuertemente asociadas a la cara apical del epitelio del plexo coroideo, como en el estroma del mismo, donde las imágenes de inmunofluorescencia ponen de manifiesto, por primera vez, la presencia de acúmulos de células leucémicas CD19<sup>+</sup> dispuestas en el eje conjuntivo. El estudio por microscopía electrónica no sólo corrobora la presencia de blastos en el estroma conjuntivo, también demuestra, en un modelo *in vivo*, el paso de células leucémicas desde el torrente sanguíneo al estroma conjuntivo en el contexto de la LLA. La migración desde el torrente sanguíneo estaría facilitada no sólo por las características intrínsecas que tienen estos endotelios frente a los de los capilares continuos, sino también por las modificaciones que inducen en ellos la presencia de las células leucémicas. En este sentido, nuestros resultados indican que la leucemia, de forma similar a lo que ocurre en las primeras etapas de la migración de los leucocitos a través de lechos vasculares, induce un incremento en la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en las células endoteliales del plexo coroideo, lo que facilitaría así su adhesión a las mismas. Este efecto podría estar mediado por el incremento de citoquinas inflamatorias observado también en los co-cultivos. Además, la reducción de la expresión de los componentes de las uniones adherens (VE-Cadherina) en las células endoteliales junto con la mayor expresión de las metaloproteasas apoya también

dicha migración. Resultados similares se han descrito en el endotelio del plexo coroideo de pacientes con esclerosis múltiple en donde se observa un incremento de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en correlación con números incrementados de células T y células plasmáticas en el estroma del mismo <sup>9, 32</sup>. Alternativamente, las células leucémicas podrían alcanzar el estroma conjuntivo del plexo migrando desde la aracnoides por la tela coroidea directamente <sup>75</sup>.

Una vez alcanzado el estroma del plexo coroideo, las células leucémicas podrían tener dos destinos no excluyentes: permanecer en dicho estroma o migrar a través del epitelio del plexo coroideo hacia el LCR, lo que convierte entonces a la BSLCR en un punto de entrada para la diseminación leptomeníngea de la leucemia. Como ha sido descrito previamente por otros autores <sup>230</sup>, resultados no mostrados de nuestro laboratorio ponen de manifiesto la capacidad de las células leucémicas para migrar *in vitro* a través de una monocapa de células epiteliales de plexo coroideo humano, principalmente en respuesta a estímulos inflamatorios (resultados no mostrados). Sin embargo, en las imágenes tanto de inmunofluorescencia como de microscopía electrónica del plexo coroideo de los animales con infiltración, sólo excepcionalmente encontramos células leucémicas en tránsito desde la cara basal a la cara apical del epitelio del plexo, sugiriendo entonces que esta ruta de diseminación leptomeníngea sería minoritaria en la LLA como han apuntado recientemente Yao *et al.* <sup>14</sup>. En esta misma línea, nuestros resultados no mostrados también indican que las células leucémicas no producen niveles detectables de C3. En el caso de las metástasis leptomeníngeas de mama o pulmón, la unión de C3 a su receptor en la cara basal y apical de las células epiteliales del plexo ha sido considerada relevante por alterar su función barrera permitiendo el paso de células y moléculas a su través <sup>229</sup>.

Teniendo entonces en cuenta estas consideraciones, la mayor parte de las células leucémicas que consiguen alcanzar el estroma del plexo coroideo permanecerían en el mismo. Como hemos señalado anteriormente, diferentes modelos experimentales, incluido el de animales quiméricos en los que el sistema inmune del receptor es reconstituido tras irradiación con células de la médula ósea del donante, han permitido identificar el estroma del plexo coroideo, principalmente la zona de anclaje del mismo, como un compartimento que recibe y mantiene células del sistema inmune y, lo que es más relevante en el contexto de este trabajo, células estromales CXCL12<sup>+</sup> procedentes de la médula ósea <sup>33, 232</sup>. Por lo tanto, todos estos datos apuntan la capacidad de este compartimento para servir como nicho de progenitores hematopoyéticos, lo que además estaría apoyado por su capacidad para albergar progenitores mieloides en diferentes especies animales <sup>34, 233</sup>. En el caso del hombre, los estudios histológicos, incluidos los presentados en este trabajo, apuntan la presencia transitoria de islotes celulares que recuerdan a los islotes de hemangioblastos, presentes en el esbozo mesenquimal del plexo coroideo de embriones de 5-8 semanas de desarrollo embrionario <sup>185</sup>.

A pesar de todos los datos anteriores, hasta nuestro conocimiento, no existe en la literatura ningún trabajo que aborde el estudio del estroma del plexo coroideo y sus componentes como un asentamiento

para las células leucémicas en el SNC y su posible relevancia en el desarrollo de la resistencia de estas células a los tratamientos quimioterápicos y en las recaídas en la enfermedad.

Los fibroblastos se han descrito como componentes celulares clave en el microambiente asociado a tumores sólidos donde se conocen con el nombre de *cancer-associated fibroblasts* (CAFs) y, su presencia se ha correlacionado con un alto grado de malignidad de los mismos <sup>234</sup>. En el caso de los tumores hematológicos, el equivalente de los CAFs serían las células estromales mesenquimáticas y fibroblásticas presentes en la médula ósea que, como en el caso de los fibroblastos, facilitarían la supervivencia de las células leucémicas, en este caso, en el compartimento hematopoyético. Las escasas comparaciones que se han hecho entre las MSCs asociadas a leucemia y los clásicos CAFs asociados a tumores sólidos, han demostrado que ambos tipos celulares comparten muchas características fenotípicas y funcionales (revisado en <sup>235</sup>). A tenor de lo anterior, se podría postular que una vez que las células leucémicas alcanzan el estroma fibroblástico del plexo coroideo podrían ser capaces de modificar el microambiente de forma similar a como lo hacen en la médula ósea, induciendo en los fibroblastos cambios dirigidos a favorecer su supervivencia.

Ha sido descrito que cuando las células tumorales metastatizan en otro órgano, reclutan fibroblastos normales a la masa tumoral induciendo su transformación a través de la secreción de diferentes factores solubles como TGF- $\beta$ , EGF, PDGF, FGF y CXCL12, a través de exosomas y/o a través de contactos celulares mediados por moléculas de adhesión <sup>236, 237</sup>. En este sentido, nuestros resultados indican que las células leucémicas incrementan los niveles de expresión de TGF- $\beta$  en presencia de los fibroblastos del plexo coroideo y ponen de manifiesto el estrecho contacto que se establece entre ambos tipos celulares. Dicho contacto provoca un drástico incremento en la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en las células estromáticas en correlación con el aumento de sus receptores tipo integrina (VLA-4 y LFA-1) en las células tumorales. Además, la disposición que presentan *in vitro* las células leucémicas por debajo del lecho fibroblástico recuerda a los cultivos de médula ósea de *Whitlock/Witte* que soportan la diferenciación B <sup>186</sup> y, lo que es más interesante, la supervivencia de las células leucémicas. Sin embargo, a diferencia de lo publicado en tumores sólidos, donde los cambios en la producción de componentes de matriz extracelular se han descrito claves para el papel de los CAFs en la diseminación de las células tumorales, la asociación de las células leucémicas a los fibroblastos del plexo coroideo no produjo cambios en la expresión génica de ninguna de las proteínas analizadas.

La activación de los fibroblastos en el contexto tumoral está acompañada de la adquisición de marcadores específicos, así como de la producción incrementada de una batería de factores encaminados a inducir la supervivencia de las células tumorales. Si bien el conjunto de cambios que experimenta el “fibroblasto instruido” es dependiente del tipo de tumor, existen algunas características más comunes entre ellos <sup>238</sup>. Como en el caso de los tumores sólidos, el perfil fenotípico y secretor de los fibroblastos del plexo coroideo se modifica drásticamente en presencia de las células leucémicas, adquiriendo características

comunes a las descritas para los CAFs <sup>35</sup>. En este sentido, marcadores tales como los componentes citoesqueléticos,  $\alpha$ -SMA o vimentina, o el receptor PDGFR $\beta$ , son regulados positivamente en los fibroblastos del plexo coroideo tras el contacto con las células leucémicas. Del mismo modo, la secreción de factores tales como VEGFA, implicado en la remodelación de la vasculatura en tumores sólidos, también se ve incrementada tras el co-cultivo. Por otra parte, la generación de un microambiente pro-fibrótico y pro-inflamatorio se ha descrito clave en las funciones pro-tumorogénicas de los CAFs. En este sentido, el aumento de la secreción de quimioquinas y citoquinas tales como IL-8, IL-6 y CCL2 experimentado por los fibroblastos del plexo coroideo, apoyan también su transformación hacia un fenotipo pro-inflamatorio como consecuencia de la presencia de las células leucémicas. Un perfil inflamatorio similar ha sido descrito en las MSC derivadas de la médula ósea de pacientes de LLA <sup>36, 239, 240</sup>.

Uno de los resultados más importantes alcanzados en el presente trabajo es la demostración de la capacidad de los fibroblastos del plexo coroideo para inducir, tanto en líneas celulares leucémicas como en muestras primarias de pacientes, quimiorresistencia a fármacos utilizados convencionalmente en la terapia intratecal, como son metotrexato y citarabina. Varios son los mecanismos, no excluyentes, que podrían mediar esta protección haciendo del estroma del plexo coroideo un santuario para promover la supervivencia de las células leucémicas y favorecer las recaídas. Por una parte, factores solubles como IL-6 e IL-8, incrementados significativamente en nuestros cultivos, han sido recientemente descritos como responsables de la quimiorresistencia inducida por CAFs en células tumorales de mama <sup>241</sup>. Sin embargo, estudios realizados en el contexto de la LLA sugieren, al igual que indican los datos aquí presentados, que estas citoquinas no tendrían un papel directo sobre las células leucémicas ya que no modifican la proliferación, supervivencia o migración de las mismas sino que modifican el microambiente de la médula ósea desplazando la hematopoyesis normal (alterando el eje CXCR4/CXCL12) y presumiblemente, favoreciendo la progresión de la leucemia <sup>242</sup>, entre otros, a través de la inducción de moléculas de adhesión, incluida VCAM-1, en las células del microambiente hematopoyético <sup>37</sup>. En este sentido, los contactos célula-célula parecen determinantes en la protección de las células leucémicas por el componente estromal de la médula ósea en el contexto de los tumores hematológicos. La interacción entre VLA-4 expresado por la leucemia y VCAM-1 expresado en las MSCs de la médula ósea, ha sido implicada en el mantenimiento de la enfermedad mínima residual en LMA y en la quimiorresistencia inducida en estas células de LMA adherentes al estroma <sup>243</sup>. Además, trabajos publicados en el contexto de la LLA por dos grupos diferentes apuntan la relevancia de los contactos entre células estromales de la médula ósea y células leucémicas a través de la interacción VLA-4-VCAM-1 en la inducción de quimiorresistencia <sup>37, 244</sup>. Como en el caso de la médula ósea, los contactos celulares que se establecen entre los fibroblastos del plexo coroideo y las células leucémicas parecen ser determinantes en el establecimiento de un nicho protector para estas últimas. Dicho contacto provoca una drástica reducción en la tasa proliferativa de las células leucémicas, específicamente de aquellas que se encuentran fuertemente adheridas a los fibroblastos. Cabe destacar que son estas mismas células leucémicas las que

presentan características morfológicas más invasivas, siendo frecuentes en ellas las proyecciones tipo invadopodio. Al igual que en la médula ósea, el bloqueo de la vía de señalización VLA-4 en células leucémicas también revierte parcialmente la quimiorresistencia inducida por los fibroblastos del plexo coroideo. Por otra parte, otra de las vías de señalización implicadas en la resistencia exhibida por las células leucémicas a los quimioterápicos es la vía de Notch y, aunque se ha descrito su relevancia clínica principalmente en el caso de las leucemias T, recientemente Kamga *et al.*<sup>38</sup> ha demostrado un papel similar para esta vía en el contexto de las leucemias tipo B. Según estos autores, la inhibición de la vía de señalización Notch en un modelo xenogénico no bloquea la expansión de las células leucémicas. Sin embargo, cuando los animales eran tratados conjuntamente con Ara-C e inhibidores de la vía Notch, la drástica reducción en el número de células leucémicas iba acompañada de un significativo incremento en la supervivencia de los animales, indicando que la señalización Notch era responsable de la inducción de quimiorresistencia. Resultados previos de nuestro grupo indican que las MSCs de médula ósea de pacientes de LLA expresan niveles elevados de *JAGGED-1* en comparación con las MSCs de donantes control<sup>36</sup>. De forma similar, en el caso del plexo coroideo, la expresión de *JAGGED-1* aparece fuertemente incrementada en los fibroblastos tras el contacto con las células leucémicas, observándose en paralelo en estas últimas un aumento de la expresión de ADAM10, proteasa fundamental en la activación de la vía Notch. Nuestros datos indican, por tanto, que la activación de la vía Notch tras el contacto fibroblasto-célula leucémica es responsable, en parte, de la resistencia exhibida por estas últimas a las drogas quimioterápicos, pues el bloqueo de la misma mediante la adición del inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa revierte, aunque no por completo, el efecto protector observado.

Es también reseñable otra de las características que adquieren las células leucémicas que se adhieren fuertemente a los fibroblastos del plexo, como es la reducción de los niveles de expresión en membrana de la molécula CD19, observándose tanto en las imágenes de microscopía de fluorescencia como en los estudios de citometría de flujo. Esta reducción sugiere que el porcentaje de animales con infiltración leucémica del estroma del plexo coroideo podría ser superior al estimado en nuestro estudio. Por otra parte, CD19 es la molécula diana de los nuevos tratamientos inmunoterapéuticos para pacientes de LLA basados en células T con receptor de antígeno quimérico (CAR-T), una reducción en la expresión de la misma dificultaría el reconocimiento de la célula leucémica y, por lo tanto, favorecería la evasión de los efectos de la inmunoterapia<sup>245</sup>.

Todos estos resultados apoyan que el estroma del plexo coroideo representaría un santuario para las células leucémicas que, si bien parecen alcanzar el mismo por la mayor permisividad vascular más que por señales específicas que las atraigan a la zona, una vez localizadas en este microambiente serían capaces de modificarlo. Estos cambios inducirían una reducción en la tasa proliferativa de las células leucémicas, lo que favorecería su quimiorresistencia a los fármacos convencionales utilizados en el tratamiento intratecal, y una disminución de los niveles de expresión de la molécula CD19, lo que presumiblemente podría dificultar además la acción de los nuevos tratamientos dirigidos contra la

## *Discusión*

---

leucemia, como son las células CAR-T. El estroma del plexo coroideo estaría entonces implicado en la protección de las células leucémicas dentro del SNC donde se harían refractarias a los tratamientos, pudiendo ser responsables de las recaídas posteriores. Esto implicaría que, como en el caso de los tumores sólidos, el estroma fibroblástico también podría ser una diana terapéutica importante en la LLA.

Como se ha señalado en apartados anteriores de este trabajo, en los últimos años, se ha puesto de manifiesto la relevancia que la vía de señalización BMP tiene en una amplia variedad de procesos tumorales. Así, se han descrito efectos tanto pro-tumorales como anti-tumorales asociados con alteraciones en la expresión de los distintos componentes de la vía de señalización BMP <sup>246</sup>. La mayor parte de los trabajos en esta línea proceden del estudio de tumores sólidos y, aunque están emergiendo estudios en distintas neoplasias hematológicas <sup>156</sup>, todavía el estado de los componentes de la vía de señalización BMP en la LLA ha sido escasamente estudiado <sup>36,170</sup>. En este contexto, datos preliminares de nuestro grupo a partir del análisis de una cohorte relativamente pequeña de pacientes sugerían que una elevada producción del ligando BMP4 y/o la inhibición de la vía de señalización canónica de BMP4 en blastos leucémicos podrían ser un factor de mal pronóstico en los niños con esta enfermedad <sup>247</sup>.

La vía de señalización BMP ha sido descrita como una de las vías clave en la expansión de los progenitores hematopoyéticos en la médula ósea siendo una de las responsables del mantenimiento del tamaño del nicho <sup>142</sup>. En este contexto, Goldman *et al.* demostraron en un modelo de ratón deficiente en BMP4 que niveles reducidos de expresión del ligando asociados a los componentes del nicho hematopoyético causaba una hematopoyesis deficiente, concluyendo que BMP4 es factor clave en el microambiente hematopoyético regulando número y función de las células *stem* hematopoyéticas <sup>133</sup>. Dada la importancia de la estricta regulación de la vía de señalización BMP en el microambiente medular, no es sorprendente que alteraciones en la misma sean relevantes en el desarrollo y/o progresión de tumores hematológicos como la LLA. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que la producción de BMP4 por parte de las MSCs de médula ósea está alterada en los pacientes de LLA <sup>170</sup>.

Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto el papel de BMP4 en el establecimiento y mantenimiento de la LLA en un modelo xenogénico basado en el trasplante de muestras primarias en ratones NSG. Éstos indican que las muestras leucémicas que exhiben una elevada expresión de BMP4 presentan claramente una mayor capacidad de injerto que aquellas con niveles bajos, apuntando al morfógeno como responsable de dicho efecto. En este sentido, Khurana *et al.* han descrito previamente la capacidad de BMP4 para inducir y mantener la expresión de la integrina VLA-4 en los progenitores hematopoyéticos, siendo éste el mecanismo responsable del *homing* y movilización de estos <sup>141</sup>. Además, el análisis de expresión de los blastos leucémicos en distintos órganos diana (médula ósea, bazo y cerebro) indican que los mayores niveles de expresión de BMP4, al igual que ocurre en las poblaciones hematopoyéticas de médula ósea sana <sup>248</sup>, son exhibidos por las células leucémicas con un fenotipo más inmaduro y por ello, presumiblemente más agresivo.

Por otra parte, los experimentos de trasplante con células leucémicas que sobreexpresan BMP4 ponen de manifiesto que, incluso a pesar de los números reducidos de células leucémicas recuperados en estos animales, presentan una aparición de la sintomatología exacerbada y prematura. Una de las funciones atribuidas a las proteínas BMP es la regulación de la proliferación y diferenciación de las poblaciones

medulares. De hecho, concentraciones elevadas del morfógeno inhiben la proliferación y la diferenciación de los progenitores de linfocitos B <sup>249, 250</sup>.

Existen numerosos trabajos en la literatura que han puesto de manifiesto la asociación de niveles elevados de BMP4 con diferentes tipos de tumores <sup>22, 150, 251</sup>. Sin embargo, mientras que en algunos casos estos niveles se han asociado con un mal pronóstico, como ocurre en algunos tipos de cáncer de pulmón en los que las células tumorales expresan niveles incrementados de BMP4 <sup>252</sup>, en el cáncer de vejiga, en los que se asocian con la progresión del tumor <sup>253</sup> o en carcinomas hepatocelulares en los que se relaciona con procesos metastásicos <sup>254</sup>, en otros casos, como en el del glioma, los niveles incrementados del ligando son indicadores de buen pronóstico <sup>255</sup>. Estos resultados, aparentemente contradictorios, pueden ser debidos a que BMP4 podría tener un efecto diferente en función del tipo de tumor, del momento de la enfermedad, de las células diana, o incluso de la forma de presentación del morfógeno, unido o no a determinados componentes de matriz extracelular <sup>150, 256</sup>. Así, por ejemplo, en el caso del tumor de vejiga ha sido descrito que BMP4 tendría un efecto sobre el sistema inmune del paciente induciendo la inmunosupresión del mismo y haciendo refractarias a las células tumorales frente a los estímulos de diferenciación <sup>253</sup>. En contraposición, en el caso del glioblastoma, las células tumorales capaces de responder a BMP4 se diferencian haciéndose más sensibles a los tratamientos quimioterápicos <sup>257</sup>.

Teniendo en cuenta estos datos, los efectos observados en este trabajo que demuestran que la elevada expresión de BMP4 por las células leucémicas conducen a una aparición precoz de la sintomatología clínica en animales que, sin embargo, presentan una menor carga tumoral en los órganos diana (médula ósea y bazo) pueden deberse, de manera no excluyente, al efecto de esta molécula sobre las propias células tumorales y/o sobre otros tipos celulares del organismo.

En cuanto a los efectos de BMP4 en las propias células leucémicas tipo B, en correlación con lo observado previamente por otros autores en algunas líneas leucémicas (LLA-T, LMC y LMA) así como en células tumorales de mama <sup>258, 259</sup>, nuestros datos indican que altos niveles de BMP4 inducen una reducción de su tasa proliferativa que, en consecuencia, se incrementa cuando estas células se cultivan en presencia de un anticuerpo bloqueante para BMP4. Estos cambios en la proliferación celular inducen, por tanto, un estado de latencia en el que los blastos leucémicos son menos sensibles a los efectos quimioterápicos. Resultados similares se han descrito en leucemias mieloides (LMA y LMC), en las que se ha demostrado la implicación del morfógeno en la quimiorresistencia de estas células mediante la activación de procesos autofágicos y la inhibición de la apoptosis <sup>39</sup>. Además, nuestros resultados muestran otras propiedades modificadas como consecuencia de los altos niveles de BMP4 que favorecerían el desarrollo de la enfermedad. En este sentido, células Nalm6-BMP4 muestran una mayor capacidad de migración en los ensayos *in vitro*, en línea con los mayores niveles de expresión de las moléculas de adhesión *VLA-4* y *LFA-1*, así como de la metaloproteasa *ADAM10*, exhibidos por las células Nalm6-BMP4 recuperadas del modelo *in vivo*. La integrina *VLA-4* tiene un papel importante en la migración de las células tumorales, y

la interacción con sus ligandos es fundamental en la supervivencia de estas células y en el desarrollo de quimiorresistencia en tumores hematológicos<sup>37</sup>, como han descrito otros autores y se ha demostrado en este trabajo. Además, la mayor expresión de VLA-4 se ha asociado previamente con un peor pronóstico en los pacientes pediátricos con LLA<sup>40</sup> y de hecho, en las muestras de pacientes analizadas en este trabajo, la expresión de la integrina al diagnóstico es significativamente superior en los pacientes que posteriormente recaen. Acompañando a la regulación positiva de VLA-4 se observa un incremento en la expresión de LFA-1 en las células Nalm6-BMP4, otra integrina que podría mediar la supervivencia de las células tumorales como ya se ha descrito en la LLC<sup>260</sup> y la invasión al SNC<sup>13</sup>. Por otra parte, mayores niveles de expresión la metaloproteasa ADAM10 se han asociado con procesos de migración e invasión tumoral y, por tanto, con un mal pronóstico en otros tumores<sup>41, 261, 262</sup>. Además, en el análisis proteómico comparativo de líneas de LLA-B con diferentes capacidades invasivas llevado a cabo por Holland *et al.*, ADAM10 es una de las proteínas que exhiben mayores niveles en las líneas más invasivas y con capacidad para infiltrar el SNC<sup>13</sup>. A tenor de estos resultados, se podría concluir que los efectos autocrinos de BMP4 inducen un fenotipo más agresivo en las células leucémicas.

Como ya se ha comentado en el apartado primero de la discusión, la respuesta inflamatoria juega un papel importante en el desarrollo y la progresión de muchos tumores, incluidos distintos tipos de cáncer infantil<sup>88</sup>. En el caso de los pacientes con LLA, éstos exhiben niveles séricos elevados de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias como IL-8, CCL2, TNF- $\alpha$  e IL-6 en el momento del diagnóstico, confirmando su estado inflamatorio antes del inicio del tratamiento. BMP4 ha sido descrito como un inductor de procesos inflamatorios en distintos sistemas, habiéndose encontrado su participación en diferentes patologías como la artritis reumatoide, la osteoartritis, la esclerosis múltiple, neuropatías y enfermedades asociadas con el sistema vascular<sup>42, 43, 263</sup>. Así, esta proteína, al igual que otros ligandos BMP, induce una respuesta inflamatoria que provoca alteraciones en los epitelios, entre ellos el endotelio vascular, alterando la función barrera, promoviendo la extravasación de leucocitos y contribuyendo a la patogenia de enfermedades inflamatorias<sup>43, 264</sup>. Por otra parte, la administración exógena de BMP como factor osteoinductor en pacientes con fracturas óseas ha permitido describir los efectos inflamatorios derivados del aumento de los ligandos BMP, entre los que se encuentran inflamación a nivel de la columna vertebral, formación de seromas con elevadas cantidades de citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ ) o la aparición de radiculitis con inflamación y compresión de las raíces de los nervios espinales<sup>265</sup>. Además, se ha descrito una activación de osteoclastos y osteolisis en estos pacientes como consecuencia de los niveles incrementados de citoquinas inflamatorias<sup>266</sup>.

En este sentido, como se ha comentado anteriormente, los animales que desarrollan la enfermedad recrean la respuesta inflamatoria descrita en los pacientes, detectándose un incremento de IL-6, TNF $\alpha$  y CCL2 en el suero sanguíneo. Los mayores niveles de IL-6 encontrados en los animales infundidos con las células Nalm6-BMP4, pueden ser el reflejo de la mayor respuesta inflamatoria inducida por los altos niveles de BMP4. La IL-6 es un factor fuertemente asociado a la progresión de tumores, tanto sólidos

como hematológicos, correlacionándose en estos últimos con un mal pronóstico de la enfermedad <sup>267-269</sup>. Por tanto, la inflamación inducida por BMP4 a nivel sistémico mediada por IL-6 podría contribuir al agravamiento de los síntomas clínicos observados. La compresión de la médula espinal como consecuencia de la infiltración leucémica, de forma similar a lo descrito en algunos pacientes pediátricos de LLA <sup>270</sup>, estaría acentuada por la respuesta inflamatoria exacerbada mediada por elevados niveles de BMP4 conduciendo a la afectación de las raíces nerviosas y favoreciendo la aparición de la sintomatología neurológica, principalmente paraplejia, mostradas por estos animales, comprometiendo su supervivencia.

Como se ha indicado previamente, BMP4 está directamente relacionado con la inducción de un fenotipo endotelial inflamatorio. En este sentido, diferentes trabajos apuntan a que los endotelios que producen altos niveles de BMP4 presentan un incremento en la expresión de las moléculas de adhesión así como una reducción en las uniones adherentes intercelulares mediadas por la producción de citoquinas inflamatorias, fundamentalmente TNF $\alpha$ , IL-6 o IL-8 <sup>44, 188, 271</sup>. En el contexto de la LLA, el análisis del plasma sanguíneo de los pacientes al diagnóstico ha puesto de manifiesto no sólo un incremento de la presencia de factores pro-inflamatorios, sino también de marcadores de activación endotelial (P-selectina, VCAM1, ICAM1) que reflejan las alteraciones que experimenta el endotelio vascular en estos pacientes <sup>91</sup>. Nuestros estudios *in vitro* con células endoteliales de la vasculatura cerebral evidencian que tanto la presencia de las células leucémicas como el aumento de los niveles de BMP4 conducen a modificaciones fenotípicas en estas células. Las células tumorales inducen una mayor expresión de VCAM1 en las células endoteliales, que se incrementa en presencia de BMP4. Este factor, en paralelo, reduce los niveles de VE-cadherina implicada en el mantenimiento de las uniones célula-célula de los endotelios. Además, datos no publicados del grupo indican que las células Nalm6-BMP4, en contacto con el endotelio, inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias. En conjunto, estos datos sugieren que la mayor producción de BMP4 por las células leucémica es, al menos en parte, responsable del incremento de la inflamación observada en estos animales e induce cambios en el sistema vascular que podrían dar lugar a la pérdida de la función barrera del endotelio favoreciendo la extravasación y metástasis de las células tumorales.

A pesar de lo descrito anteriormente, el bloqueo de la señalización canónica de BMP4 en el modelo xenogénico de LLA mediante la administración del inhibidor DMH1 no impidió el injerto de las células leucémicas en la médula ósea o en el bazo, sin embargo, se observaban números incrementados de células tumorales en circulación, lo que podría sugerir cierta dificultad en la entrada de las células a los órganos diana en correlación con lo comentado anteriormente y, por lo tanto, la participación, aunque menor, de la señalización canónica de BMP en la misma. Del mismo modo que otros autores han observado previamente diferencias en la carga leucémica sólo en el SNC resultado de la inhibición o el bloqueo de factores asociados con una mayor invasividad tumoral, sin detectar cambios en los órganos periféricos <sup>14, 83, 96</sup>, los efectos del bloqueo de la vía canónica de señalización de BMP4 en nuestro modelo se observan fundamentalmente en el SNC. Tras la administración sistémica de DMH1, se observan

números significativamente reducidos y una sintomatología clínica menor que en los animales tratados con el diluyente. Por lo tanto, los efectos de BMP4 en la regulación positiva de diferentes moléculas implicadas en el *homing* en las células leucémicas, así como sus efectos pro-inflamatorios sistémicos, podrían estar mediados, al menos en parte, a través de la vía canónica.

Recientemente, Newman *et al.* han descrito un nuevo fármaco inhibidor de la vía de señalización BMP, el inhibidor JL5 con propiedades farmacocinéticas mejoradas respecto a sus análogos DMH1. Los autores comparan los efectos anti-tumorales de ambos fármacos en un modelo de cáncer de pulmón, donde la producción de BMP también está incrementada. Mientras los efectos de ambos fármacos *in vitro* fueron similares, los efectos observados *in vivo* indican que JL5 presenta una eficacia anti-tumoral significativamente superior a DMH1 y DMH2 <sup>46</sup>. A tenor de lo anterior, no podemos descartar que la ausencia de efectos en periferia que nosotros observamos en los animales tras la implantación de la bomba que libera sistémicamente DMH1, pueda estar reflejando el bajo potencial de distribución tisular del fármaco y/o su inactivación tras su unión a proteínas plasmáticas, como sugiere dicho trabajo. En este sentido, la administración del inhibidor DMH1 directamente en el LCR, donde la concentración de proteínas es sensiblemente inferior que en el plasma, consigue una reducción en el porcentaje de células leucémicas en el SNC similar a la obtenida con los fármacos de la TIT, apuntando a un efecto de la vía de señalización canónica de BMP4, no sólo sobre las barreras cerebrales, sino también en la supervivencia de las células leucémicas en el SNC como indica la inducción de las proteínas pro-apoptóticas tras el tratamiento con el inhibidor.

Además de su participación en el desarrollo del SNC, la señalización BMP es esencial en el mantenimiento de la homeostasis de este sistema, participando en la regulación de procesos tales como la neurogénesis y la oligodendrogénesis. De hecho, la expresión de BMP2, BMP4, noggin, BMPRIA, BMPRIB y BMPRII ha sido descrita en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células endoteliales <sup>272</sup> por lo que parece evidente que la invasión del tejido nervioso por células leucémicas que producen elevadas cantidades de BMP4 tendría un impacto directo en el normal funcionamiento de SNC.

Los astrocitos constituyen la población celular residente en el SNC más prevalente. Esta población posee la maquinaria necesaria para responder ante la presencia de BMP4 en el ambiente y regular la vía de señalización activada por este ligando. Algunos autores han demostrado que la vía de señalización BMP es esencial en la diferenciación y funcionalidad de esta población, siendo indispensable en el mantenimiento de la función barrera y en el proceso de angiogénesis <sup>273</sup>. Además, se ha descrito la capacidad que estas células tienen para llevar a cabo una respuesta frente a cualquier alteración producida en el SNC implicándose tanto en procesos inflamatorios como de regeneración tisular <sup>274</sup>.

Los datos del estudio histológico del modelo xenogénico con células que sobreexpresan BMP4 indican una mayor expresión de GFAP en astrocitos localizados tanto en zonas superficiales de la corteza como en zonas más profundas de la misma, sugiriendo una mayor respuesta astrogliar en consonancia con el

contexto inflamatorio descrito en este modelo y con la presencia de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias demostrada por otros autores en pacientes con afectación en SNC <sup>28, 195</sup>. Resultados similares se han descrito en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica en rata en el que un incremento de los niveles de BMP4 se asociaron con procesos de astrocitosis y microgliosis y su inhibición atenuaba la neuroinflamación poniendo así de manifiesto la relevancia de la señalización BMP en la misma <sup>45</sup>. En el modelo de LLA, la inhibición de la señalización canónica de BMP4 conduce, por su parte, a un engrosamiento de la matriz extracelular de la limitante glial-pial (laminina) que podría deberse a un incremento de la secreción de los componentes de matriz por los astrocitos y fibroblastos de la meninge, lo que permitiría reestablecer la limitante glial y restringir el paso de células hacia el parénquima de forma similar a lo que ocurre en la formación de cicatrices gliales tras un daño <sup>275</sup>.

En respuesta al incremento de citoquinas inflamatorias también se modifica la limitante glial astrocitaria presente en la BHE produciendo moléculas que modifican el endotelio de esta barrera y facilitando el paso de células hacia el parénquima nervioso <sup>276</sup>. En este sentido, como se ha indicado con anterioridad, BMP4 induce modificaciones en el endotelio de la microvasculatura cerebral que sugieren una mayor permeabilidad. Además, nuestros datos revelan que las células que sobre-expresan BMP4 producen mayores cantidades de VEGFA, un factor pro-angiogénico incrementado en muchos tumores y regulado por diferentes vías de señalización, entre ellas la señalización BMP <sup>277</sup>. Los animales trasplantados con estas células presentan una mayor densidad vascular, con capilares de mayor calibre, que podrían estar inducidos por VEGFA y BMP4. Estos cambios en la vasculatura no solo afectan al SNC, sino también a otros órganos diana de la LLA, como es el caso del hígado (resultados no mostrados). Estos resultados están en concordancia con lo descrito por Araya *et al.* en animales deficientes para el receptor de BMP2/4, BMPRIA, cuyos capilares cerebrales presentan un tamaño reducido respecto a los animales control <sup>273</sup> y, poniendo de manifiesto el papel pro-angiogénico de BMP4 a través de su señalización canónica.

En conjunto, los resultados obtenidos a partir del modelo xenogénico de LLA y de los ensayos *in vitro* revelan que la producción de elevados niveles de BMP4 por las células leucémicas confieren características más agresivas a las propias células tumorales ya que incrementan su invasividad, reducen su proliferación, favorecen su supervivencia y, además, inducen un ambiente inflamatorio que favorece el aumento de la permeabilidad de las barreras cerebrales. Estos datos sugieren que, en un contexto clínico, BMP4 favorecería por un lado la infiltración en el SNC de las células leucémicas y, por otro, la resistencia a la quimioterapia de las células leucémicas y, por tanto, promovería el mantenimiento de la EMR positiva y/o las recaídas.

Por otra parte, como se demuestra en este trabajo, las células leucémicas infiltran el nicho neurogénico de la zona subventricular. En este sentido, dada la importancia que BMP4 tiene en el control de la activación/quiescencia de las células madre neurales, el mantenimiento de su potencialidad y su diferenciación para asegurar la producción continua de neuroblastos y oligodendrocitos <sup>134</sup>, la expresión

de niveles incrementados de BMP4 por las células leucémicas podría tener, además, un impacto mayor en la homeostasis del nicho del comentado en la primera parte de la discusión. Así, la llegada de estas células con mayor capacidad invasiva podría implicar la alteración de los procesos neurogénicos como consecuencia tanto de los niveles incrementados de BMP4 en el microambiente de la zona, como de la inflamación inducida por éstos, dando lugar a cambios en la capacidad neurogénica de las células madres neurales, en su diferenciación, en la migración de los neuroblastos y en la posterior renovación neuronal, procesos críticos en la edad pediátrica en la que se encuentran los pacientes de LLA.

En paralelo a los estudios dirigidos a conocer el papel de BMP4 en el desarrollo de la LLA y en la infiltración en el SNC, analizamos al diagnóstico el estado de la vía de señalización BMP en blastos leucémicos de pacientes pediátricos de LLA procedentes de tres hospitales españoles diferentes, ampliando así los datos preliminares del grupo a una cohorte de 174 pacientes. Los resultados indican que la distinta relevancia de la vía canónica de señalización de BMP en las células del linaje B frente al T<sup>187</sup> se refleja también en las muestras de LLA, ya que los blastos de pacientes de LLA-B expresan mayores niveles de expresión de los componentes de la ruta de señalización BMP que las muestras de pacientes de LLA-T.

Por otra parte, el análisis de los componentes de la vía en las muestras LLA indica que los blastos de los pacientes incluidos en el grupo de RA, los de los pacientes que exhiben EMR positiva al final de la fase de inducción y los de los pacientes que posteriormente recayeron, presentan niveles reducidos de los receptores de BMP al diagnóstico. En todos los grupos, los niveles de *ActRIA* están reducidos, y en las muestras pacientes con EMR+ la menor expresión del receptor *ActRIA* se acompaña de menores niveles de *BMPRII*. Además, en el caso de los pacientes de RA y de los que presentaron recaídas también exhiben una menor expresión de la BR-Smad, *SMAD1*. Estos datos apuntan en el mismo sentido que lo descrito por Dziętczenia *et al.* Estos autores demostraron que elevados niveles de los receptores de la ruta de señalización BMP en las células de pacientes con LLA y con LMA, se correlacionan con tasas más altas de supervivencia, así como con un menor riesgo de recaída<sup>163</sup>. Datos similares han sido descritos también en otros tumores, por ejemplo, se ha puesto de manifiesto la asociación de una regulación negativa del receptor *ActRIA* con una menor supervivencia de los pacientes con glioblastoma<sup>278</sup> y del receptor *BMPRII* con una mayor progresión en los tumores de vejiga<sup>253</sup>. En conjunto, estos datos indican que la inhibición de la señalización de BMP se asocia con la progresión de la enfermedad.

En el contexto de las recaídas, los resultados iniciales asociaban altos niveles de expresión de BMP4 y la inhibición de la señalización canónica de BMP con las recaídas en la enfermedad. En este sentido, el análisis llevado a cabo con todas las muestras de pacientes recopilados hasta el momento confirma que los pacientes que recaen presentan una regulación negativa de la vía de señalización BMP a distintos niveles de la misma, pues no sólo encontramos menores niveles de expresión del receptor *ActRIA*, y de una de las proteínas implicadas en la transducción de la señal, *SMAD1*, como se ha indicado anteriormente, sino que además, los niveles de expresión de la Smad inhibidora, *SMAD7*, tienden a estar

incrementados en estos pacientes. Ninguno de estos tres componentes analizados de manera individual se asocia de manera directa con la incidencia acumulada de recaídas. Sin embargo, esta es significativamente superior en los pacientes con elevados niveles de expresión de *SMAD7* que además exhiben bajos niveles de *SMAD1* respecto a los que mantienen niveles altos de *SMAD1* y, por tanto, una menor inhibición de la vía de señalización BMP. Estos mismos resultados se observan también si se consideran sólo los pacientes con LLA-B incluidos en los grupos de riesgo no alto y sugieren que, puesto que en ambos casos las recaídas se produjeron una vez finalizado el tratamiento, las células leucémicas con una menor activación de la vía de señalización dependiente de Smad se mantienen en un estado de mayor quiescencia, dando lugar a recaídas más tardías.

Por otra parte, el análisis de las muestras obtenidas de pacientes clasificados como de riesgo no alto, revela que, en los pacientes con mayores niveles de expresión de *BMP4*, la incidencia acumulada de recaídas tiende a ser superior cuando los niveles de *SMAD1* son bajos. En este mismo sentido, las células que sobreexpresan *BMP4* utilizadas en este trabajo también exhiben un incremento en la expresión de la Smad inhibidora, *SMAD7* y una reducción de los genes diana *ID1* e *ID4*. Además, datos previos del grupo indicaban que los pacientes que recayeron en el SNC tenían una elevada concentración de *BMP4* en el LCR en el momento del diagnóstico. Todos estos datos, junto con los obtenidos en el estudio del papel de *BMP4* en la infiltración leucémica en el SNC, sugieren que los blastos leucémicos que inhiben la vía de señalización BMP y mantienen una elevada producción de *BMP4* podrían ser los responsables de las recaídas en SNC, en consonancia con los niveles de expresión incrementados de esta proteína en los blastos aislados del cerebro respecto a los de médula ósea descritos por Gaynes *et al.*, que sugieren una mejor adaptación de éstas células al microambiente del SNC.<sup>19</sup>

En conjunto, los resultados obtenidos a partir del análisis de la vía de señalización de BMP de las muestras primarias de pacientes en el momento del diagnóstico, ponen de manifiesto que la inhibición de la vía de señalización canónica de BMP se correlaciona con un mal pronóstico en la LLA-B, asociándose con recaídas posteriores. Sin embargo, la complejidad en la regulación de esta vía de señalización, y probablemente la heterogeneidad existente entre pacientes en cuanto a los mecanismos de inhibición de la misma, dificultan la identificación de un solo parámetro que pueda ser utilizado como un nuevo marcador biológico a incorporar para mejorar la estratificación de los pacientes. A pesar de ello, los resultados son de relevancia clínica si consideramos sólo el grupo de pacientes de riesgo no alto en el que suceden la mayor parte de las recaídas. En estos casos, la evaluación del estado de la vía de señalización BMP junto con la determinación de los niveles de expresión de *BMP4* podría suponer una información valiosa para la estratificación de los pacientes tanto al diagnóstico como tras la identificación de EMR+, en un subgrupo en el que no se han identificado otros posibles factores pronósticos

# CONCLUSIONES



A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir:

1. Coincidiendo con las principales cisuras y cisternas cerebrales, un importante porcentaje de las células leucémicas presentes en el espacio subaracnoideo forman agregados complejos con las células leptomeníngeas
2. La infiltración leucémica en el SNC provoca la rotura de la barrera glial pial con la consiguiente invasión del parénquima nervioso.
3. Las células leucémicas que penetran el parénquima nervioso son resistentes a la quimioterapia, provocan una respuesta inflamatoria, daño tisular y alteraciones comportamentales.
4. Las células leucémicas alcanzan el nicho neurogénico de la SVZ induciendo una respuesta inflamatoria y la inhibición de la neurogénesis.
5. Las células leucémicas invaden el estroma del plexo coroideo, induciendo un fenotipo pro-tumorogénico en los fibroblastos residentes.
6. La interacción célula leucémica -fibroblasto provoca en las primeras la pérdida de expresión de CD19, la reducción de la tasa proliferativa y, en consecuencia, la resistencia a los agentes quimioterápicos. La señalización a través de VLA-4 y Notch median estos efectos.
7. Elevados niveles de expresión de BMP4 favorecen el desarrollo de la LLA en el modelo xenogénico, induciéndose un fenotipo más agresivo. Por otra parte, la señalización canónica de BMP está implicada en la infiltración en el SNC.
8. La expresión reducida de las BR-smads y/o el incremento de las smad inhibidoras en blastos de pacientes analizados en el momento del diagnóstico se asocian con un peor pronóstico. Además, la incidencia acumulada de recaídas tiende a ser superior en los pacientes que, al diagnóstico, presentan blastos con elevados niveles de expresión de BMP4 y bajos de SMAD1.



# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
2. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50(4):314-24.
3. Tratamiento de la Leucemia Aguda Linfoblástica de Nuevo Diagnóstico. Recomendaciones terapéuticas LAL/SEHOP-PETHEMA 2013.
4. Pui CH, Thiel E. Central nervous system disease in hematologic malignancies: historical perspective and practical applications. *Semin Oncol*. 2009;36(4 ):S2-S16.
5. Price RA, Johnson WW. The central nervous system in childhood leukemia. I. The arachnoid. *Cancer*. 1973;31(3):520-33.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30.
7. Bhojwani D, Pui CH. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):e205-17.
8. Saunders NR, Habgood MD, Mollgard K, Dziegielewska KM. The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? *F1000Res*. 2016;5.
9. Gherzi-Egea JF, Strazielle N, Catala M, Silva-Vargas V, Doetsch F, Engelhardt B. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathol*. 2018;135(3):337-61.
10. Engelhardt B, Coisne C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids and barriers of the CNS*. 2011;8(1):4.
11. Ginsberg LE, Leeds NE. Neuroradiology of leukemia. *AJR Am J Roentgenol*. 1995;165(3):525-34.
12. Williams MT, Yousafzai YM, Elder A, Rehe K, Bomken S, Frishman-Levy L, et al. The ability to cross the blood-cerebrospinal fluid barrier is a generic property of acute lymphoblastic leukemia blasts. *Blood*. 2016;127(16):1998-2006.
13. Holland M, Castro FV, Alexander S, Smith D, Liu J, Walker M, et al. RAC2, AEP, and ICAM1 expression are associated with CNS disease in a mouse model of pre-B childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2011;118(3):638-49.
14. Yao H, Price TT, Cantelli G, Ngo B, Warner MJ, Olivere L, et al. Leukaemia hijacks a neural mechanism to invade the central nervous system. *Nature*. 2018;560(7716):55-60.
15. Akers SM, O'Leary HA, Minnear FL, Craig MD, Vos JA, Coad JE, et al. VE-cadherin and PECAM-1 enhance ALL migration across brain microvascular endothelial cell monolayers. *Exp Hematol*. 2010;38(9):733-43.
16. Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. *PLoS One*. 2011;6(8):e20599.
17. Gossai NP, Gordon PM. The Role of the Central Nervous System Microenvironment in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Pediatr*. 2017;5:90.
18. Frishman-Levy L, Izraeli S. Advances in understanding the pathogenesis of CNS acute lymphoblastic leukaemia and potential for therapy. *Br J Haematol*. 2017;176(2):157-67.
19. Gaynes JS, Jonart LM, Zamora EA, Naumann JA, Gossai NP, Gordon PM. The central nervous system microenvironment influences the leukemia transcriptome and enhances leukemia chemoresistance. *Haematologica*. 2017;102(4):e136-e9.
20. Kato I, Nishinaka Y, Nakamura M, Akarca AU, Niwa A, Ozawa H, et al. Hypoxic adaptation of leukemic cells infiltrating the CNS affords a therapeutic strategy targeting VEGFA. *Blood*. 2017;129(23):3126-9.
21. Yadin D, Knaus P, Mueller TD. Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;27:13-34.
22. Ning J, Zhao Y, Ye Y, Yu J. Opposing roles and potential antagonistic mechanism between TGF-beta and BMP pathways: Implications for cancer progression. *EBioMedicine*. 2019;41:702-10.
23. Zhang L, Ye Y, Long X, Xiao P, Ren X, Yu J. BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination. *Oncotarget*. 2016;7(47):78206-18.
24. Weller RO, Sharp MM, Christodoulides M, Carare RO, Mollgard K. The meninges as barriers and facilitators for the movement of fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS. *Acta Neuropathol*. 2018;135(3):363-85.

25. Akers SM, Rellick SL, Fortney JE, Gibson LF. Cellular elements of the subarachnoid space promote ALL survival during chemotherapy. *Leuk Res.* 2011;35(6):705-11.
26. Trujillo A, McGee C, Cogle CR. Angiogenesis in acute myeloid leukemia and opportunities for novel therapies. *J Oncol.* 2012;2012:128608.
27. Eisenkraft A, Keidan I, Bielora B, Keller N, Toren A, Paret G. MCP-1 in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2006;30(10):1259-61.
28. Jaime-Perez JC, Gamboa-Alonso CM, Jimenez-Castillo RA, Lopez-Silva LJ, Pinzon-Uresti MA, Gomez-De Leon A, et al. TNF-alpha increases in the CSF of children with acute lymphoblastic leukemia before CNS relapse. *Blood Cells Mol Dis.* 2017;63:27-31.
29. Heidari N, Saki N, De Filippis L, Shahjahani M, Teimouri A, Ahmadzadeh A. Central nervous system niche involvement in the leukemia. *Clin Transl Oncol.* 2016;18(3):240-50.
30. Krull KR, Brinkman TM, Li C, Armstrong GT, Ness KK, Srivastava DK, et al. Neurocognitive outcomes decades after treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the St Jude lifetime cohort study. *J Clin Oncol.* 2013;31(35):4407-15.
31. Hearps S, Seal M, Anderson V, McCarthy M, Connellan M, Downie P, et al. The relationship between cognitive and neuroimaging outcomes in children treated for acute lymphoblastic leukemia with chemotherapy only: A systematic review. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(2):225-33.
32. Vercellino M, Votta B, Condello C, Piacentino C, Romagnolo A, Merola A, et al. Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study. *J Neuroimmunol.* 2008;199(1-2):133-41.
33. Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Inaba M, Li M, Shi M, Kawamura N, et al. Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus. *Brain Behav Immun.* 2013;29:82-97.
34. Nataf S, Strazielle N, Hatterer E, Mouchiroud G, Belin MF, Ghersi-Egea JF. Rat choroid plexuses contain myeloid progenitors capable of differentiation toward macrophage or dendritic cell phenotypes. *Glia.* 2006;54(3):160-71.
35. LeBleu VS, Kalluri R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis Model Mech.* 2018;11(4).
36. Entrena A, Varas A, Vazquez M, Melen GJ, Fernandez-Sevilla LM, Garcia-Castro J, et al. Mesenchymal stem cells derived from low risk acute lymphoblastic leukemia patients promote NK cell antitumor activity. *Cancer Lett.* 2015;363(2):156-65.
37. Jacamo R, Chen Y, Wang Z, Ma W, Zhang M, Spaeth EL, et al. Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF-kappaB mediates chemoresistance. *Blood.* 2014;123(17):2691-702.
38. Takam Kamga P, Dal Collo G, Midolo M, Adamo A, Delfino P, Mercuri A, et al. Inhibition of Notch Signaling Enhances Chemosensitivity in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.* 2019;79(3):639-49.
39. Zhao X, Liu J, Peng M, Liu J, Chen F. BMP4 is involved in the chemoresistance of myeloid leukemia cells through regulating autophagy-apoptosis balance. *Cancer Invest.* 2013;31(8):555-62.
40. Shalapour S, Hof J, Kirschner-Schwabe R, Bastian L, Eckert C, Prada J, et al. High VLA-4 expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse. *Haematologica.* 2011;96(11):1627-35.
41. Caltabiano R, Puzzo L, Barresi V, Ieni A, Loreto C, Musumeci G, et al. ADAM 10 expression in primary uveal melanoma as prognostic factor for risk of metastasis. *Pathol Res Pract.* 2016;212(11):980-7.
42. Eixarch H, Calvo-Barreiro L, Montalban X, Espejo C. Bone morphogenetic proteins in multiple sclerosis: Role in neuroinflammation. *Brain Behav Immun.* 2018;68:1-10.
43. Wu DH, Hatzopoulos AK. Bone morphogenetic protein signaling in inflammation. *Exp Biol Med (Maywood).* 2019;244(2):147-56.
44. Helbing T, Arnold L, Wiltgen G, Hirschbühl E, Gabelmann V, Hornstein A, et al. Endothelial BMP4 Regulates Leukocyte Diapedesis and Promotes Inflammation. *Inflammation.* 2017;40(6):1862-74.
45. Shijo T, Warita H, Suzuki N, Ikeda K, Mitsuzawa S, Akiyama T, et al. Antagonizing bone morphogenetic protein 4 attenuates disease progression in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 2018;307:164-79.

46. Newman JH, Augeri DJ, NeMoyer R, Malhotra J, Langenfeld E, Chesson CB, et al. Novel bone morphogenetic protein receptor inhibitor JL5 suppresses tumor cell survival signaling and induces regression of human lung cancer. *Oncogene*. 2018;37(27):3672-85.
47. Tasian SK, Hunger SP. Genomic characterization of paediatric acute lymphoblastic leukaemia: an opportunity for precision medicine therapeutics. *Br J Haematol*. 2017;176(6):867-82.
48. Pui CH, Nichols KE, Yang JJ. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(4):227-40.
49. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):975-83.
50. Nordlund J, Syvanen AC. Epigenetics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Semin Cancer Biol*. 2018;51:129-38.
51. Oskarsson T, Soderhall S, Arvidson J, Forestier E, Montgomery S, Bottai M, et al. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia in the Nordic countries: prognostic factors, treatment and outcome. *Haematologica*. 2016;101(1):68-76.
52. Pui CH. Genomic and pharmacogenetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Med*. 2015;9(1):1-9.
53. Ebinger S, Ozdemir EZ, Ziegenhain C, Tiedt S, Castro Alves C, Grunert M, et al. Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2016;30(6):849-62.
54. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015;373(16):1541-52.
55. Irving J, Matheson E, Minto L, Blair H, Case M, Halsey C, et al. Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. *Blood*. 2014;124(23):3420-30.
56. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2011;471(7337):235-9.
57. Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schonegger A, Eckert C, Cazzaniga G, Stanulla M, et al. KRAS and CREBBP mutations: a relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(8):1656-67.
58. Meyer JA, Wang J, Hogan LE, Yang JJ, Dandekar S, Patel JP, et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(3):290-4.
59. Li B, Li H, Bai Y, Kirschner-Schwabe R, Yang JJ, Chen Y, et al. Negative feedback-defective PRPS1 mutants drive thiopurine resistance in relapsed childhood ALL. *Nat Med*. 2015;21(6):563-71.
60. Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, Grauman PV, Harris MH, Stevenson K, et al. Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 2014;5:3469.
61. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, Cai X, Stocco G, Crews K, et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2008;112(10):4178-83.
62. Ford AM, Mansur MB, Furness CL, van Delft FW, Okamura J, Suzuki T, et al. Protracted dormancy of pre-leukemic stem cells. *Leukemia*. 2015;29(11):2202-7.
63. Spinella JF, Richer C, Cassart P, Ouimet M, Healy J, Sinnett D. Mutational dynamics of early and late relapsed childhood ALL: rapid clonal expansion and long-term dormancy. *Blood Adv*. 2018;2(3):177-88.
64. Dave DS, Leppert JT, Rajfer J. Is the testis a chemo-privileged site? Is there a blood-testis barrier? *Rev Urol*. 2007;9(1):28-32.
65. Pardridge WM. CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(7):963-75.
66. Ruggiero A, Conter V, Milani M, Biagi E, Lazzareschi I, Sparano P, et al. Intrathecal chemotherapy with antineoplastic agents in children. *Paediatr Drugs*. 2001;3(4):237-46.
67. Ulu EM, Tore HG, Bayrak A, Gungor D, Coskun M. MRI of central nervous system abnormalities in childhood leukemia. *Diagn Interv Radiol*. 2009;15(2):86-92.
68. Aur RJ, Simone J, Hustu HO, Walters T, Borella L, Pratt C, et al. Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia. *Blood*. 1971;37(3):272-81.

69. Rivera GK, Pinkel D, Simone JV, Hancock ML, Crist WM. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. 30 years' experience at St. Jude Children's Research Hospital. *N Engl J Med.* 1993;329(18):1289-95.
70. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy. *Cancer.* 2015;121(20):3577-90.
71. Krishnan S, Wade R, Moorman AV, Mitchell C, Kinsey SE, Eden TO, et al. Temporal changes in the incidence and pattern of central nervous system relapses in children with acute lymphoblastic leukaemia treated on four consecutive Medical Research Council trials, 1985-2001. *Leukemia.* 2010;24(2):450-9.
72. Bhojwani D, Sabin ND, Pei D, Yang JJ, Khan RB, Panetta JC, et al. Methotrexate-induced neurotoxicity and leukoencephalopathy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2014;32(9):949-59.
73. Iyer NS, Balsamo LM, Bracken MB, Kadan-Lottick NS. Chemotherapy-only treatment effects on long-term neurocognitive functioning in childhood ALL survivors: a review and meta-analysis. *Blood.* 2015;126(3):346-53.
74. Genshaft M, Huebner T, Plessow F, Ikonomidou VN, Abolmaali N, Krone F, et al. Impact of chemotherapy for childhood leukemia on brain morphology and function. *PLoS One.* 2013;8(11):e78599.
75. Thomas LB. Pathology of leukemia in the brain and meninges: postmortem studies of patients with acute leukemia and of mice given inoculations of L1210 leukemia. *Cancer Res.* 1965;25(9):1555-71.
76. Azzarelli V, Roessmann U. Pathogenesis of central nervous system infiltration in acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med.* 1977;101(4):203-5.
77. Buonamici S, Trimarchi T, Ruocco MG, Reavie L, Cathelin S, Mar BG, et al. CCR7 signalling as an essential regulator of CNS infiltration in T-cell leukaemia. *Nature.* 2009;459(7249):1000-4.
78. Williams MT, Yousafzai Y, Cox C, Blair A, Carmody R, Sai S, et al. Interleukin-15 enhances cellular proliferation and upregulates CNS homing molecules in pre-B acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2014;123(20):3116-27.
79. van der Velden VH, de Launaij D, de Vries JF, de Haas V, Sonneveld E, Voerman JS, et al. New cellular markers at diagnosis are associated with isolated central nervous system relapse in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2016;172(5):769-81.
80. Wigton EJ, Thompson SB, Long RA, Jacobelli J. Myosin-IIA regulates leukemia engraftment and brain infiltration in a mouse model of acute lymphoblastic leukemia. *J Leukoc Biol.* 2016;100(1):143-53.
81. Gomez AM, Martinez C, Gonzalez M, Luque A, Melen GJ, Martinez J, et al. Chemokines and relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: A role in migration and in resistance to antileukemic drugs. *Blood Cells Mol Dis.* 2015;55(3):220-7.
82. Cario G, Izraeli S, Teichert A, Rhein P, Skokowa J, Moricke A, et al. High interleukin-15 expression characterizes childhood acute lymphoblastic leukemia with involvement of the CNS. *J Clin Oncol.* 2007;25(30):4813-20.
83. Alsadeq A, Fedders H, Vokuhl C, Belau NM, Zimmermann M, Wirbelauer T, et al. The role of ZAP70 kinase in acute lymphoblastic leukemia infiltration into the central nervous system. *Haematologica.* 2017;102(2):346-55.
84. Alsadeq A, Lenk L, Vadakumchery A, Cousins A, Vokuhl C, Khadour A, et al. IL7R is associated with CNS infiltration and relapse in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2018;132(15):1614-7.
85. Krause S, Pfeiffer C, Strube S, Alsadeq A, Fedders H, Vokuhl C, et al. Mer tyrosine kinase promotes the survival of t(1;19)-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL) in the central nervous system (CNS). *Blood.* 2015;125(5):820-30.
86. Prieto C, Lopez-Millan B, Roca-Ho H, Stam RW, Romero-Moya D, Rodriguez-Baena FJ, et al. NG2 antigen is involved in leukemia invasiveness and central nervous system infiltration in MLL-rearranged infant B-ALL. *Leukemia.* 2018;32(3):633-44.
87. Tang YT, Jiang F, Guo L, Si MY, Jiao XY. Expression and significance of vascular endothelial growth factor A and C in leukemia central nervous system metastasis. *Leuk Res.* 2013;37(4):359-66.
88. Morgenstern DA, Anderson J. Inflammation: what role in pediatric cancer? *Pediatr Blood Cancer.* 2012;58(5):659-64.
89. Kalmanti M, Karamolengou K, Dimitriou H, Tosca A, Vlachonikolis I, Peraki M, et al. Serum levels of tumor necrosis factor and soluble interleukin 2 receptor as markers of disease activity and prognosis in childhood leukemia and lymphoma. *Int J Hematol.* 1993;57(2):147-52.

90. Horacek JM, Kupsa T, Vasatova M, Jebavy L, Zak P. Evaluation of serum levels of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia using biochip array technology. *Exp Oncol*. 2013;35(3):229-30.
91. Giordano P, Molinari AC, Del Vecchio GC, Saracco P, Russo G, Altomare M, et al. Prospective study of hemostatic alterations in children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol*. 2010;85(5):325-30.
92. Ranta S, Nilsson F, Harila-Saari A, Saft L, Tani E, Soderhall S, et al. Detection of central nervous system involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia by cytomorphology and flow cytometry of the cerebrospinal fluid. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(6):951-6.
93. Pine SR, Yin C, Matloub YH, Sabaawy HE, Sandoval C, Levendoglu-Tugal O, et al. Detection of central nervous system leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia by real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn*. 2005;7(1):127-32.
94. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(3):449-63.
95. Sanchez-Aguilera A, Mendez-Ferrer S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(4):579-90.
96. Munch V, Trentin L, Herzig J, Demir S, Seyfried F, Kraus JM, et al. Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia is mediated by vascular endothelial growth factor. *Blood*. 2017;130(5):643-54.
97. Bartram J, Goulden N, Wright G, Adams S, Brooks T, Edwards D, et al. High throughput sequencing in acute lymphoblastic leukemia reveals clonal architecture of central nervous system and bone marrow compartments. *Haematologica*. 2018;103(3):e110-e4.
98. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*. 2010;147(1):35-51.
99. Reddi AH. BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(3):249-50.
100. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res*. 2014;93(4):335-45.
101. Zhao GQ. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis*. 2003;35(1):43-56.
102. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*. 2011;23(4):609-20.
103. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, et al. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors*. 1996;13(3-4):291-300.
104. Valera E, Isaacs MJ, Kawakami Y, Izpisua Belmonte JC, Choe S. BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2010;5(6):e11167.
105. Neugebauer JM, Kwon S, Kim HS, Donley N, Tilak A, Sopory S, et al. The prodomain of BMP4 is necessary and sufficient to generate stable BMP4/7 heterodimers with enhanced bioactivity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(18):E2307-16.
106. Morimoto T, Kaito T, Matsuo Y, Sugiura T, Kashii M, Makino T, et al. The bone morphogenetic protein-2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration than the individual homodimers in a rat spinal fusion model. *Spine J*. 2015;15(6):1379-90.
107. ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, et al. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem*. 1994;269(25):16985-8.
108. Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 1999;274(28):19838-45.
109. Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13(1):43-7.
110. Hata A, Kang H. Functions of the bone morphogenetic protein signaling pathway through microRNAs (review). *Int J Mol Med*. 2015;35(3):563-8.
111. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal*. 2004;16(3):291-9.

112. Gomez-Puerto MC, Iyengar PV, Garcia de Vinuesa A, Ten Dijke P, Sanchez-Duffhues G. Bone morphogenetic protein receptor signal transduction in human disease. *J Pathol.* 2019;247(1):9-20.
113. Gazzo E, Canalis E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006;7(1-2):51-65.
114. Yanagita M. BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(3):309-17.
115. Brazil DP, Church RH, Surrae S, Godson C, Martin F. BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends Cell Biol.* 2015;25(5):249-64.
116. Sedlmeier G, Sleeman JP. Extracellular regulation of BMP signaling: welcome to the matrix. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(1):173-81.
117. Wu Q, Sun CC, Lin HY, Babitt JL. Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs). *PLoS One.* 2012;7(9):e46307.
118. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem.* 1999;274(2):584-94.
119. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, et al. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature.* 1999;401(6752):480-5.
120. Sammar M, Stricker S, Schwabe GC, Sieber C, Hartung A, Hanke M, et al. Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2. *Genes Cells.* 2004;9(12):1227-38.
121. Jin W, Yun C, Kim HS, Kim SJ. TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res.* 2007;67(20):9869-77.
122. Mochizuki T, Miyazaki H, Hara T, Furuya T, Imamura T, Watabe T, et al. Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(30):31568-74.
123. Goto K, Kamiya Y, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K. Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20603-11.
124. Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell.* 2003;14(7):2809-17.
125. Zhang S, Fei T, Zhang L, Zhang R, Chen F, Ning Y, et al. Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Mol Cell Biol.* 2007;27(12):4488-99.
126. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(3):974-9.
127. Noël D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Poncelet P, et al. Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2016;22(1).
128. Murphy MK, Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. TGF-beta1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. *Stem Cells.* 2015;33(3):762-73.
129. Wu M, Chen G, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* 2016;4:16009.
130. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev.* 1996;6(4):432-8.
131. Mishina Y, Suzuki A, Ueno N, Behringer RR. *Bmpr* encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 1995;9(24):3027-37.
132. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 1995;9(17):2105-16.
133. Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, Al Masri A, Christian JL, Fleming WH. BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood.* 2009;114(20):4393-401.
134. Bond AM, Bhalala OG, Kessler JA. The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation. *Dev Neurobiol.* 2012;72(7):1068-84.
135. Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature.* 2018;555(7696):377-81.

136. Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, Rábano J, Cafini F, Pallas-Bazarra N, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. 2019;25:554-60.
137. Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 2000;28(3):713-26.
138. Peretto P, Dati C, De Marchis S, Kim HH, Ukhanova M, Fasolo A, et al. Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. *Neuroscience*. 2004;128(4):685-96.
139. Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, et al. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. 2010;7(1):78-89.
140. Bonaguidi MA, Peng CY, McGuire T, Falciglia G, Gobeske KT, Czeisler C, et al. Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 2008;28(37):9194-204.
141. Khurana S, Buckley S, Schouteden S, Ekker S, Petryk A, Delforge M, et al. A novel role of BMP4 in adult hematopoietic stem and progenitor cell homing via Smad independent regulation of integrin-alpha4 expression. *Blood*. 2013;121(5):781-90.
142. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-41.
143. Su YH, Cai HB, Ye ZY, Tan WS. BMP-7 improved proliferation and hematopoietic reconstitution potential of ex vivo expanded cord blood-derived CD34(+) cells. *Hum Cell*. 2015;28(1):14-21.
144. Soderberg SS, Karlsson G, Karlsson S. Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1176:55-69.
145. Singh A, Morris RJ. The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(4):299-313.
146. Choi YJ, Kim ST, Park KH, Oh SC, Seo JH, Shin SW, et al. The serum bone morphogenetic protein-2 level in non-small-cell lung cancer patients. *Med Oncol*. 2012;29(2):582-8.
147. Chapellier M, Bachelard-Cascales E, Schmidt X, Clement F, Treilleux I, Delay E, et al. Disequilibrium of BMP2 levels in the breast stem cell niche launches epithelial transformation by overamplifying BMPR1B cell response. *Stem Cell Reports*. 2015;4(2):239-54.
148. Bobinac D, Maric I, Zoricic S, Spanjol J, Dordevic G, Mustac E, et al. Expression of bone morphogenetic proteins in human metastatic prostate and breast cancer. *Croat Med J*. 2005;46(3):389-96.
149. Lee YC, Cheng CJ, Bilén MA, Lu JF, Satcher RL, Yu-Lee LY, et al. BMP4 promotes prostate tumor growth in bone through osteogenesis. *Cancer Res*. 2011;71(15):5194-203.
150. Kallioniemi A. Bone morphogenetic protein 4-a fascinating regulator of cancer cell behaviour. *Cancer Genetics*. 2012;205:267-77.
151. Alarmo EL, Kallioniemi A. Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumorigenesis? *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(2):R123-39.
152. Deng H, Ravikumar TS, Yang WL. Overexpression of bone morphogenetic protein 4 enhances the invasiveness of Smad4-deficient human colorectal cancer cells. *Cancer Lett*. 2009;281(2):220-31.
153. Pardini B, De Maria D, Francavilla A, Di Gaetano C, Ronco G, Naccarati A. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review. *BMC Cancer*. 2018;18(1):696.
154. Mitsui Y, Hirata H, Arichi N, Hiraki M, Yasumoto H, Chang I, et al. Inactivation of bone morphogenetic protein 2 may predict clinical outcome and poor overall survival for renal cell carcinoma through epigenetic pathways. *Oncotarget*. 2015;6(11):9577-91.
155. Cheng KH, Ponte JF, Thiagalingam S. Elucidation of epigenetic inactivation of SMAD8 in cancer using targeted expressed gene display. *Cancer Res*. 2004;64(5):1639-46.
156. Zylbersztejn F, Flores-Violante M, Voeltzel T, Nicolini FE, Lefort S, Maguer-Satta V. The BMP pathway: A unique tool to decode the origin and progression of leukemia. *Exp Hematol*. 2018;61:36-44.
157. Toofan P, Wheadon H. Role of the bone morphogenetic protein pathway in developmental haemopoiesis and leukaemogenesis. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(5):1455-63.
158. Grockowiak E, Laperrousaz B, Jeanpierre S, Voeltzel T, Guyot B, Gobert S, et al. Immature CML cells implement a BMP autocrine loop to escape TKI treatment. *Blood*. 2017;130(26):2860-71.

159. Tesfai Y, Ford J, Carter KW, Firth MJ, O'Leary RA, Gottardo NG, et al. Interactions between acute lymphoblastic leukemia and bone marrow stromal cells influence response to therapy. *Leuk Res.* 2012;36(3):299-306.
160. Laperrousaz B, Jeanpierre S, Sagorny K, Voeltzel T, Ramas S, Kaniewski B, et al. Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression. *Blood.* 2013;122(23):3767-77.
161. Raymond A, Liu B, Liang H, Wei C, Guindani M, Lu Y, et al. A role for BMP-induced homeobox gene MIXL1 in acute myelogenous leukemia and identification of type I BMP receptor as a potential target for therapy. *Oncotarget.* 2014;5(24):12675-93.
162. Dzierżeniecki J, Wrobel T, Jazwiec B, Mazur G, Butrym A, Poreba R, et al. Expression of bone morphogenetic proteins (BMPs) receptors in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Int J Lab Hematol.* 2010;32(6 Pt 1):e217-21.
163. Dzierżeniecki J, Wrobel T, Jazwiec B, Mazur G, Butrym A, Kuliczowski K. Expression of cyclin A and bone morphogenetic protein receptors and response to induction therapy in patients with acute leukemias. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(12):2336-41.
164. Witkowska M, Majchrzak A, Cebula-Obrzut B, Wawrzyniak E, Robak T, Smolewski P. The distribution and potential prognostic value of SMAD protein expression in chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biol.* 2017;39(3):1010428317694551.
165. Huse K, Bakkebo M, Oksvold MP, Forfang L, Hilden VI, Stokke T, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit CD40L/IL-21-induced Ig production in human B cells: differential effects of BMP-6 and BMP-7. *Eur J Immunol.* 2011;41(11):3135-45.
166. Huse K, Bakkebo M, Walchli S, Oksvold MP, Hilden VI, Forfang L, et al. Role of Smad proteins in resistance to BMP-induced growth inhibition in B-cell lymphoma. *PLoS One.* 2012;7(10):e46117.
167. Nakahata S, Yamazaki S, Nakauchi H, Morishita K. Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to resistance to TGF-beta1-mediated growth suppression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene.* 2010;29(29):4157-69.
168. Battula VL, Le PM, Sun JC, Nguyen K, Yuan B, Zhou X, et al. AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth. *JCI Insight.* 2017;2(13).
169. Voeltzel T, Flores-Violante M, Zylbersztejn F, Lefort S, Billandon M, Jeanpierre S, et al. A new signaling cascade linking BMP4, BMPRI1A, DeltaNp73 and NANOG impacts on stem-like human cell properties and patient outcome. *Cell Death Dis.* 2018;9(10):1011.
170. Vicente Lopez A, Vazquez Garcia MN, Melen GJ, Entrena Martinez A, Cubillo Moreno I, Garcia-Castro J, et al. Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: correlations with the course of disease. *PLoS One.* 2014;9(1):e84496.
171. Dosen-Dahl G, Munthe E, Nygren MK, Stubberud H, Hystad ME, Rian E. Bone marrow stroma cells regulate TIEG1 expression in acute lymphoblastic leukemia cells: role of TGFbeta/BMP-6 and TIEG1 in chemotherapy escape. *Int J Cancer.* 2008;123(12):2759-66.
172. Cosset E, Hamdan G, Jeanpierre S, Voeltzel T, Sagorny K, Hayette S, et al. Deregulation of TWIST-1 in the CD34+ compartment represents a novel prognostic factor in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2011;117(5):1673-6.
173. Kumar A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG. Adhesion to stromal cells mediates imatinib resistance in chronic myeloid leukemia through ERK and BMP signaling pathways. *Sci Rep.* 2017;7(1):9535.
174. Topic I, Ikic M, Ivcevic S, Kovacic N, Marusic A, Kusec R, et al. Bone morphogenetic proteins regulate differentiation of human promyelocytic leukemia cells. *Leuk Res.* 2013;37(6):705-12.
175. Evans AE, Gilbert ES, Zandstra R. The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. (Children's Cancer Study Group A). *Cancer.* 1970;26(2):404-9.
176. Simone J. History of the treatment of childhood ALL: a paradigm for cancer cure. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006;19(2):353-9.
177. Moricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dordelmann M, et al. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood.* 2008;111(9):4477-89.

178. Vora A, Andreano A, Pui CH, Hunger SP, Schrappe M, Moericke A, et al. Influence of Cranial Radiotherapy on Outcome in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Contemporary Therapy. *J Clin Oncol*. 2016;34(9):919-26.
179. Doepfner TR, Bretschneider E, Doehring M, Segura I, Senturk A, Acker-Palmer A, et al. Enhancement of endogenous neurogenesis in ephrin-B3 deficient mice after transient focal cerebral ischemia. *Acta Neuropathol*. 2011;122(4):429-42.
180. Yang M, Crawley JN. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci*. 2009;Chapter 8:Unit 8 24.
181. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996;272(5259):263-7.
182. Belenguer G, Domingo-Muelas A, Ferron SR, Morante-Redolat JM, Farinas I. Isolation, culture and analysis of adult subependymal neural stem cells. *Differentiation*. 2016;91(4-5):28-41.
183. Borgmann A, Baldy C, von Stackelberg A, Beyersmann B, Fichtner I, Nurnberg P, et al. Childhood all blasts retain phenotypic and genotypic characteristics upon long-term serial passage in NOD/SCID mice. *Pediatr Hematol Oncol*. 2000;17(8):635-50.
184. Lock RB, Liem N, Farnsworth ML, Milross CG, Xue C, Tajbakhsh M, et al. The nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mouse model of childhood acute lymphoblastic leukemia reveals intrinsic differences in biologic characteristics at diagnosis and relapse. *Blood*. 2002;99(11):4100-8.
185. JA K. Structural and functional changes in the telencephalic choroid plexus during human ontogenesis. in Wolstenholme GEW, O'Connor CM, editors *The Cerebrospinal Fluid: Production, Circulation and Absorption* in Wolstenholme GEW, O'Connor CM, editors (eds): Ciba Foundation Symposium—The Cerebrospinal Fluid: Production, Circulation and Absorption Chichester, John Wiley & Sons Ltd. 1958:3-31.
186. Novotny JR, Duehrsen U, Welch K, Layton JE, Cebon JS, Boyd AW. Cloned stromal cell lines derived from human Whitlock/Witte-type long-term bone marrow cultures. *Exp Hematol*. 1990;18(7):775-84.
187. Hidalgo L, Martinez VG, Valencia J, Hernandez-Lopez C, Vazquez MN, Nunez JR, et al. Expression of BMPRIA on human thymic NK cell precursors: role of BMP signaling in intrathymic NK cell development. *Blood*. 2012;119(8):1861-71.
188. Chen K, Xie W, Luo B, Xiao W, Teitelbaum DH, Yang H, et al. Intestinal mucosal barrier is injured by BMP2/4 via activation of NF-kappaB signals after ischemic reperfusion. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:901530.
189. Zhou K, Shi X, Huo J, Liu W, Yang D, Yang T, et al. Bone morphogenetic protein 4 is overexpressed in and promotes migration and invasion of drug-resistant cancer cells. *Int J Biol Macromol*. 2017;101:427-37.
190. Batson OV. The Function of the Vertebral Veins and Their Role in the Spread of Metastases. *Ann Surg*. 1940;112(1):138-49.
191. Bleyer WA. Biology and pathogenesis of CNS leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1989;11(1):57-63.
192. Buckley CD, Barone F, Nayar S, Benezech C, Caamano J. Stromal cells in chronic inflammation and tertiary lymphoid organ formation. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:715-45.
193. Pikor NB, Astarita JL, Summers-Deluca L, Galicia G, Qu J, Ward LA, et al. Integration of Th17- and Lymphotoxin-Derived Signals Initiates Meningeal-Resident Stromal Cell Remodeling to Propagate Neuroinflammation. *Immunity*. 2015;43(6):1160-73.
194. Pikor NB, Cupovic J, Onder L, Gommerman JL, Ludewig B. Stromal Cell Niches in the Inflamed Central Nervous System. *J Immunol*. 2017;198(5):1775-81.
195. Si MY, Fan ZC, Li YZ, Chang XL, Xie QD, Jiao XY. The prognostic significance of serum and cerebrospinal fluid MMP-9, CCL2 and sVCAM-1 in leukemia CNS metastasis. *J Neurooncol*. 2015;122(2):229-44.
196. Bifari F, Decimo I, Pino A, Llorens-Bobadilla E, Zhao S, Lange C, et al. Neurogenic Radial Glia-like Cells in Meninges Migrate and Differentiate into Functionally Integrated Neurons in the Neonatal Cortex. *Cell Stem Cell*. 2017;20(3):360-73 e7.
197. Sevenich L. Brain-Resident Microglia and Blood-Borne Macrophages Orchestrate Central Nervous System Inflammation in Neurodegenerative Disorders and Brain Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:697.

198. Soto MS, Sibson NR. The Multifarious Role of Microglia in Brain Metastasis. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:414.
199. Kinjyo I, Bragin D, Grattan R, Winter SS, Wilson BS. Leukemia-derived exosomes and cytokines pave the way for entry into the brain. *J Leukoc Biol.* 2019;105(4):741-53.
200. Lynch MA. The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol.* 2009;40(2):139-56.
201. Nissl F. Über einige Beziehungen zwischen Nervenzellerkrankungen und gliösen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch Psychiatr.* 1899;32:656-76.
202. Tam WY, Ma CH. Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Sci Rep.* 2014;4:7279.
203. Tam WY, Au NP, Ma CH. The association between laminin and microglial morphology in vitro. *Sci Rep.* 2016;6:28580.
204. Au NPB, Ma CHE. Recent Advances in the Study of Bipolar/Rod-Shaped Microglia and their Roles in Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:128.
205. Holloway OG, Canty AJ, King AE, Ziebell JM. Rod microglia and their role in neurological diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2019.
206. Roth TL, Nayak D, Atanasijevic T, Koretsky AP, Latour LL, McGavern DB. Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature.* 2014;505(7482):223-8.
207. Valiente M, Obenauf AC, Jin X, Chen Q, Zhang XH, Lee DJ, et al. Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell.* 2014;156(5):1002-16.
208. Montiel-Cervantes LA, Reyes-Maldonado E, Garcia-Chavez J, Hernandez-Caballero A, Molina-Aguilar R, Garcia-Ruiz Esparza MA, et al. Prognostic Value of CD95, Active Caspase-3, and Bcl-2 Expression in Adult Patients with De Novo Acute Lymphoblastic Leukemia. *Arch Med Res.* 2018;49(1):44-50.
209. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(8):610-22.
210. Todorovic M, Radisavljevic Z, Balint B, Andjelic B, Todorovic V, Jovanovic MP, et al. Increased angiogenesis-associated poor outcome in acute lymphoblastic leukemia: a single center study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012;20(5):488-93.
211. AbdElAal Asmaa A, Afify RA, Zaher AE, ElGammal MM, Atef AM. Study of prognostic significance of marrow angiogenesis assessment in patients with de novo acute leukemia. *Hematology.* 2015;20(9):504-10.
212. Basu SK, Remick SC, Monga M, Gibson LF. Breaking and entering into the CNS: clues from solid tumor and nonmalignant models with relevance to hematopoietic malignancies. *Clin Exp Metastasis.* 2014;31(2):257-67.
213. Avramis IA, Panosyan EH, Dorey F, Holcenberg JS, Avramis VI, Children's Oncology G. Correlation between high vascular endothelial growth factor-A serum levels and treatment outcome in patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from Children's Oncology Group Study CCG-1962. *Clin Cancer Res.* 2006;12(23):6978-84.
214. Deng M, Zha J, Jiang Z, Jia X, Shi Y, Li P, et al. Apatinib exhibits anti-leukemia activity in preclinical models of acute lymphoblastic leukemia. *J Transl Med.* 2018;16(1):47.
215. Yu K, Wang J, Lu T, Ma D, Wei D, Guo Y, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 in microenvironment mediates vincristine resistance of B-cell acute lymphoblastic leukemia by promoting vascular endothelial growth factor secretion. *J Cell Biochem.* 2019.
216. Saito N, Hatori T, Murata N, Zhang ZA, Ishikawa F, Nonaka H, et al. A double three-step theory of brain metastasis in mice: the role of the pia mater and matrix metalloproteinases. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007;33(3):288-98.
217. Wu E, Croucher P, McKie N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;235(2):437-42.
218. Pruessmeyer J, Ludwig A. The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(2):164-74.
219. Wetzels S, Seipold L, Saftig P. The metalloproteinase ADAM10: A useful therapeutic target? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(11 Pt B):2071-81.
220. Rua R, McGavern DB. Advances in Meningeal Immunity. *Trends Mol Med.* 2018;24(6):542-59.

221. Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H, Pronk CJ, Bonde S, Kokaia Z, et al. Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 2006;26(38):9703-12.
222. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008;9(1):46-56.
223. Fuster-Matanzo A, Llorens-Martin M, Hernandez F, Avila J. Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:260925.
224. Wang Z, He X, Fan X. Postnatal administration of memantine rescues TNF-alpha-induced decreased hippocampal precursor proliferation. *Neurosci Lett*. 2018;662:173-80.
225. Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13632-7.
226. Melo-Salas MS, Perez-Dominguez M, Zepeda A. Systemic Inflammation Impairs Proliferation of Hippocampal Type 2 Intermediate Precursor Cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2018;38(8):1517-28.
227. Pui CH, Cheng C, Leung W, Rai SN, Rivera GK, Sandlund JT, et al. Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;349(7):640-9.
228. Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1368-79.
229. Boire A, Zou Y, Shieh J, Macalinao DG, Pentsova E, Massague J. Complement Component 3 Adapts the Cerebrospinal Fluid for Leptomeningeal Metastasis. *Cell*. 2017;168(6):1101-13 e13.
230. Naumann JA, Gordon PM. In vitro model of leukemia cell migration across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Leuk Lymphoma*. 2017;58(7):1747-9.
231. Marz M, Meyer S, Erb U, Georgikou C, Horstmann MA, Hetjens S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia-Conquering the CNS across the choroid plexus. *Leuk Res*. 2018;71:47-54.
232. Shimada A, Hasegawa-Ishii S. Histological Architecture Underlying Brain-Immune Cell-Cell Interactions and the Cerebral Response to Systemic Inflammation. *Front Immunol*. 2017;8:17.
233. Bienzle D, Kwicien JM, Parent JM. Extramedullary hematopoiesis in the choroid plexus of five dogs. *Vet Pathol*. 1995;32(4):437-40.
234. Paulsson J, Micke P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Semin Cancer Biol*. 2014;25:61-8.
235. Raffaghello L, Vacca A, Pistoia V, Ribatti D. Cancer associated fibroblasts in hematological malignancies. *Oncotarget*. 2015;6(5):2589-603.
236. DiPersio CM, Van De Water L. Integrin Regulation of CAF Differentiation and Function. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5).
237. Yang X, Li Y, Zou L, Zhu Z. Role of Exosomes in Crosstalk Between Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells. *Front Oncol*. 2019;9:356.
238. Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F, Haan S, Letellier E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *International Journal of Cancer*. 2019.
239. Vilchis-Ordóñez A, Contreras-Quiroz A, Vadillo E, Dorantes-Acosta E, Reyes-Lopez A, Quintela-Núñez del Prado HM, et al. Bone Marrow Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia Create a Proinflammatory Microenvironment Influencing Normal Hematopoietic Differentiation Fates. *Biomed Res Int*. 2015;2015:386165.
240. Balandran JC, Purizaca J, Enciso J, Dozal D, Sandoval A, Jimenez-Hernandez E, et al. Pro-inflammatory-Related Loss of CXCL12 Niche Promotes Acute Lymphoblastic Leukemic Progression at the Expense of Normal Lymphopoiesis. *Front Immunol*. 2016;7:666.
241. Su S, Chen J, Yao H, Liu J, Yu S, Lao L, et al. CD10(+)GPR77(+) Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell*. 2018;172(4):841-56 e16.
242. de Vasconcellos JF, Laranjeira AB, Zanchin NI, Otubo R, Vaz TH, Cardoso AA, et al. Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56(4):568-77.
243. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2003;9(9):1158-65.
244. Mudry RE, Fortney JE, York T, Hall BM, Gibson LF. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood*. 2000;96(5):1926-32.

245. Majzner RG, Mackall CL. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discov.* 2018;8(10):1219-26.
246. Bach DH, Park HJ, Lee SK. The Dual Role of Bone Morphogenetic Proteins in Cancer. *Mol Ther Oncolytics.* 2018;8:1-13.
247. Martínez Laperche C. Estudio de la infiltración del sistema nervioso central en niños con leucemia linfoblástica aguda y papel de BMP4. Madrid: UAM; 2011.
248. Zetterblad J, Qian H, Zandi S, Mansson R, Lagergren A, Hansson F, et al. Genomics based analysis of interactions between developing B-lymphocytes and stromal cells reveal complex interactions and two-way communication. *BMC Genomics.* 2010;11:108.
249. Detmer K, Walker AN. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Cytokine.* 2002;17(1):36-42.
250. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, et al. Bone Morphogenetic Proteins Regulate the Developmental Program of Human Hematopoietic Stem Cells. *J Exp Med.* 1999(7):1139-48.
251. Alarmo EL, Huhtala H, Korhonen T, Pylkkanen L, Holli K, Kuukasjarvi T, et al. Bone morphogenetic protein 4 expression in multiple normal and tumor tissues reveals its importance beyond development. *Mod Pathol.* 2013;26(1):10-21.
252. Bach D H, Luu T T, D. K, An Y J, S. P, Park H J, et al. BMP4 Upregulation Is Associated with Acquired Drug Resistance and Fatty Acid Metabolism in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;12:817-28.
253. Martinez VG, Rubio C, Martinez-Fernandez M, Segovia C, Lopez-Calderon F, Garin MI, et al. BMP4 Induces M2 Macrophage Polarization and Favors Tumor Progression in Bladder Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(23):7388-99.
254. Zeng S, Zhang Y, Ma J, Deng G, Qu Y, Guo C, et al. BMP4 promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by an induction of epithelial-mesenchymal transition via upregulating ID2. *Cancer Lett.* 2017;390:67-76.
255. Xi G, Best B, Mania-Farnell B, James CD, Tomita T. Therapeutic Potential for Bone Morphogenetic Protein 4 in Human Malignant Glioma. *Neoplasia.* 2017;19(4):261-70.
256. Mercier F, Douet V. Bone morphogenetic protein-4 inhibits adult neurogenesis and is regulated by fractone-associated heparan sulfates in the subventricular zone. *J Chem Neuroanat.* 2014;57-58:54-61.
257. Bao Z, Zhang C, Yan W, Liu Y, Li M, Zhang W, et al. BMP4, a strong better prognosis predictor, has a subtype preference and cell development association in gliomas. *J Transl Med.* 2013;11:100.
258. Ampuja M, Jokimaki R, Juuti-Uusitalo K, Rodriguez-Martinez A, Alarmo EL, Kallioniemi A. BMP4 inhibits the proliferation of breast cancer cells and induces an MMP-dependent migratory phenotype in MDA-MB-231 cells in 3D environment. *BMC Cancer.* 2013;13:429.
259. Takahashi Y, Ishigaki T, Okuhashi Y, Ono A, Itoh M, Nara N, et al. Effect of BMP4 on the growth and clonogenicity of human leukemia and lymphoma cells. *Anticancer Res.* 2012;32(7):2813-7.
260. Flores MA, Fortea P, Trinidad EM, Garcia D, Soler G, Ortuno FJ, et al. EphrinA4 plays a critical role in alpha4 and alphaL mediated survival of human CLL cells during extravasation. *Oncotarget.* 2016;7(30):48481-500.
261. Wang YY, Ye ZY, Li L, Zhao ZS, Shao QS, Tao HQ. ADAM 10 is associated with gastric cancer progression and prognosis of patients. *J Surg Oncol.* 2011;103(2):116-23.
262. Zhang W, Liu S, Liu K, Wang Y, Ji B, Zhang X, et al. A disintegrin and metalloprotease (ADAM)10 is highly expressed in hepatocellular carcinoma and is associated with tumour progression. *J Int Med Res.* 2014;42(3):611-8.
263. Fuller ML, DeChant AK, Rothstein B, Caprariello A, Wang R, Hall AK, et al. Bone morphogenetic proteins promote gliosis in demyelinating spinal cord lesions. *Ann Neurol.* 2007;62(3):288-300.
264. Varas A, Valencia J, Lavocat F, Martinez VG, Thiam NN, Hidalgo L, et al. Blockade of bone morphogenetic protein signaling potentiates the pro-inflammatory phenotype induced by interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha combination in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:192.
265. James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, et al. A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016;22(4):284-97.
266. Tasca A, Stemig M, Broege A, Huang B, Davydova J, Zwijsen A, et al. Smad1/5 and Smad4 expression are important for osteoclast differentiation. *J Cell Biochem.* 2015;116(7):1350-60.

267. Wang HQ, Jia L, Li YT, Farren T, Agrawal SG, Liu FT. Increased autocrine interleukin-6 production is significantly associated with worse clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Physiol.* 2019;234(8):13994-4006.
268. Elmoamly S, Afif A. Can biomarkers of coagulation, platelet activation, and inflammation predict mortality in patients with hematological malignancies? *Hematology.* 2018;23(2):89-95.
269. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(12):773-89.
270. Isome K-i, Matsubara K, Taki T, Nigami H, Yura K, Iwata A, et al. Spinal Cord Compression by Epidural Involvement Over 21 Vertebral Levels in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology.* 2011;33(2):153-7.
271. Sorescu GP, Sykes M, Weiss D, Platt MO, Saha A, Hwang J, et al. Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31128-35.
272. Miyagi M, Mikawa S, Sato T, Hasegawa T, Kobayashi S, Matsuyama Y, et al. BMP2, BMP4, noggin, BMPRIA, BMPRIIB, and BMPRII are differentially expressed in the adult rat spinal cord. *Neuroscience.* 2012;203:12-26.
273. Araya R, Kudo M, Kawano M, Ishii K, Hashikawa T, Iwasato T, et al. BMP signaling through BMPRIA in astrocytes is essential for proper cerebral angiogenesis and formation of the blood-brain-barrier. *Mol Cell Neurosci.* 2008;38(3):417-30.
274. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* 2017;46(6):957-67.
275. Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, et al. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 2012;349(1):169-80.
276. Jiang S, Xia R, Jiang Y, Wang L, Gao F. Vascular endothelial growth factors enhance the permeability of the mouse blood-brain barrier. *PLoS One.* 2014;9(2):e86407.
277. Suzuki Y, Montagne K, Nishihara A, Watabe T, Miyazono K. BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and angiopoietin-1/Tie2 signalling. *J Biochem.* 2008;143(2):199-206.
278. Hover LD, Abel TW, Owens P. Genomic Analysis of the BMP Family in Glioblastomas. *Transl Oncogenomics.* 2015;7:1-9.




**ANEXO**



Article

# Acute Lymphoblastic Leukaemia Cells Impair Dendritic Cell and Macrophage Differentiation: Role of BMP4

Jaris Valencia <sup>†</sup>, Lidia M. Fernández-Sevilla <sup>†</sup>, Alberto Fraile-Ramos , Rosa Sacedón, Eva Jiménez, Angeles Vicente <sup>\*,†</sup> and Alberto Varas <sup>\*,†</sup>

Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

\* Correspondence: avicente@ucm.es (A.Vi.); avaras@ucm.es (A.Va.); Tel.: +34-91-3947166 (A.Vi.); +34-91-3941407 (A.Va.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 24 May 2019; Accepted: 13 July 2019; Published: 14 July 2019



**Abstract:** Dendritic cells and macrophages are common components of the tumour immune microenvironment and can contribute to immune suppression in both solid and haematological cancers. The Bone Morphogenetic Protein (BMP) pathway has been reported to be involved in cancer, and more recently in leukaemia development and progression. In the present study, we analyse whether acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells can affect the differentiation of dendritic cells and macrophages and the involvement of BMP pathway in the process. We show that ALL cells produce BMP4 and that conditioned media from ALL cells promote the generation of dendritic cells with immunosuppressive features and skew M1-like macrophage polarization towards a less pro-inflammatory phenotype. Likewise, BMP4 overexpression in ALL cells potentiates their ability to induce immunosuppressive dendritic cells and favours the generation of M2-like macrophages with pro-tumoral features. These results suggest that BMP4 is in part responsible for the alterations in dendritic cell and macrophage differentiation produced by ALL cells.

**Keywords:** acute lymphoblastic leukaemia; BMP4; dendritic cells; macrophages; tumour immune microenvironment

## 1. Introduction

It is currently known that tumour microenvironment influences tumorigenesis, cancer progression and metastasis [1,2]. The tumour microenvironment consists of non-cellular and cellular components including the extracellular matrix, stromal cells such as fibroblastic and endothelial cells, and immune cells such as lymphocytes and myeloid cells [3–5]. Dendritic cells (DCs) and macrophages (MØs) are commonly found infiltrating solid and haematological tumours and carrying out their anti-tumoural activities at the initial stages of tumour development. However, as the tumour progresses, signals derived from tumour cells and their microenvironment impair the differentiation, maturation and function of DCs and MØs transforming them into immunosuppressive cell types with pro-tumoural functions [6–9]. Manipulation of tumour-derived factors affecting tumour-associated DCs and MØs therefore constitute a new strategy for treating human solid and haematological malignancies [10–13].

Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is a malignant haematological disorder of the early lymphoid progenitors, occurring in all age groups. In children, ALL is the most common type of haematological malignancy, mainly affecting early B cell precursors [14,15]. Alterations in the numbers of different immune cells have been reported in childhood ALL [16–19], but to our knowledge, there is no data available about the involvement of DCs and MØs in paediatric ALL progression.

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are multifunctional growth factors which constitute a subgroup of the TGF- $\beta$  superfamily. BMPs participate in the regulation of cell proliferation, differentiation and death in embryonic and adult tissues [20], and are also involved in cancer, where they can function as both tumour suppressors and tumour-promoting factors [21,22]. The role of the BMP signalling pathway in leukaemia progression is beginning to be revealed [23,24], and particularly for ALL, the increased production of BMP4 by bone marrow mesenchymal stem cells at diagnosis and the up-regulated expression of some BMP ligands by ALL blasts support a role for BMP signalling in this haematological disorder [25–27].

In this study, we provide evidence that ALL cells are able to impair the differentiation of DCs and M $\phi$ s from monocytes, and BMP4 seem to mediate part of the effects induced by ALL cells.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. ALL Cell Lines

The B cell precursor leukaemia cell line Nalm-6 (ACC128) was obtained from DSMZ (German Collections of Microorganisms and Cell Culture) and maintained at a density of  $1 \times 10^6$  cells/mL in RPMI-1640 with 10% FBS and antibiotics (all from Lonza).

To generate a stable cell line overexpressing BMP4, Nalm-6 cells were transduced with lentiviruses expressing an empty construct (control Nalm-6) or a construct encoding BMP4 (BMP-4-transduced Nalm-6). BMP4 mRNAs and protein expression levels were quantified by quantitative real-time PCR and ELISA, respectively. Cells with high levels of transduction and gene expression were used for further experiments. Lentivirus vectors for BMP4 overexpression were prepared with pMDG, p8.91 and an empty lentiviral expression plasmid or a lentiviral expression plasmid encoding BMP4 as described [28]. BMP4 in pCMV-SPORT6 (Clone Id: 4399276; Termofisher) was transferred via pDONR201 (Invitrogen) to the lentiviral plasmid pLNT-SFFV-WPRE-Gateway (obtained through Dr Peter van der Sluijs from Dr Adrian Thrasher, University College London, UK). Recombinant lentiviruses were prepared as described above. BMP4 cDNA was verified by dye termination sequencing.

Conditioned media were obtained by culturing control and BMP-4 transduced Nalm-6 cells at a density of  $5 \times 10^6$  cells/mL for 48 h.

### 2.2. Monocyte Isolation and Culture

Buffy coats from healthy donors (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Spain) were used to obtain peripheral blood mononuclear cells by density gradient centrifugation with Lymphocytes Isolation Solution (Rafer). Monocytes were isolated by positive magnetic separation using CD14 immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec). To generate DCs, CD14<sup>+</sup> cells ( $10^6$ /mL) were cultured for 5–6 days in RPMI-1640 with 10% FBS plus 20 ng/mL rhGM-CSF and 20 ng/mL rhIL-4 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), and half of the medium was replaced by fresh medium with cytokines every 2 days. CD14<sup>+</sup> monocytes ( $5 \times 10^5$ /mL) were also cultured for 3–5 days with 5 ng/mL rhGM-CSF or 10 ng/mL of rhM-CSF (ImmunoTools GmbH) to obtain M1 or M2 M $\phi$ s, respectively, and in both cases the same concentration of cytokines was added every 2 days. To study the effects of leukaemia-derived soluble factors, monocytes were differentiated to DCs and M1 M $\phi$ s in the presence of 50% conditioned media from control and BMP4-transduced Nalm-6 cells.

### 2.3. PCR Analysis

RNA isolation was performed using Absolutely RNA Microprep Kit (Stratagene Cloning Systems, Agilent Technologies), including a DNase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total cDNA was synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), according to the supplier's instructions, and then used as target in the PCR amplifications. Real-time PCR was performed using pre-designed TaqMan probes from Applied Biosystems (Table 1).

**Table 1.** TaqMan gene expression assays.

Gene	Reference	Gene	Reference
TNF- $\alpha$	Hs00174128_m1	COX2	Hs00153133_m1
IL-1 $\beta$	Hs01555410_m1	ALDH1A1	Hs00946916_m1
IL-6	Hs00985639_m1	GAL-1	Hs00355202_m1
IL-10	Hs00961622_m1	VEGF-A	Hs00900055_m1
TFG- $\beta$ 1	Hs00998133_m1	MMP9	HS00234579_m1
IL-8	Hs00174103_m1	FOLR2	Hs_01044732_g1
CCL2	Hs00234140_m1	MAF	Hs_04185012_s1
CCL3	Hs00234142_m1	ACTA	Hs01081598_m1
CCL4	Hs00237011_m1	BMP2	Hs00154192_m1
CCL5	Hs00174575_m1	BMP4	Hs00370078_m1
CXCL10	Hs01124251_g1	BMP6	Hs01099594_m1
IDO1	Hs00984148_m1	BMP7	Hs00233476_m1

All PCR reactions were set in duplicate using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The amplifications, detections and analyses were performed in a 7.900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, Complutense University, Madrid, Spain). The  $\Delta$ Ct method was used for normalization to GNB2L1 mRNA.

#### 2.4. Flow Cytometry

The following mAbs conjugated to FITC/Alexa 488, PE, PE-Cy5 or APC/Alexa 647 were used for flow cytometry analysis: CD1a (HI149), CD3 (HIT3a), CD4 (OKT4), CD8 (RPA-T8), CD14 (47-3D6) and CD163 (GH/S1) from ImmunoStep, BioLegend and BD Biosciences. Immunofluorescence stainings were carried out by incubating cells in PBS containing 1% FBS and 0.1% NaN<sub>3</sub> in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated mAbs for 30 min at 4 °C. To avoid binding of antibodies to Fc receptors, cells were pre-incubated for 5 min at 4 °C with FcR Blocking Reagent, following supplier's instructions (Miltenyi Biotec). All analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Complutense University, Madrid, Spain)

#### 2.5. Mixed Lymphocyte Reaction Assays

DCs differentiated in the absence or presence of Nalm-6-derived conditioned media were cultured overnight with 50 ng/mL LPS and then used as stimulators for allogeneic CD3<sup>+</sup> T cells isolated with nylon wool columns from buffy coats (DC:T cell ratio, 1:10). Lymphocytes were labelled with 5  $\mu$ M CFSE (Sigma-Spain) to determine their proliferative response by the CFSE dilution method after 5–6 days of culture.

#### 2.6. BMP4 and Cytokine Measurements

Culture supernatants from mixed lymphocyte reaction assays were harvested and the levels of IFN- $\gamma$  were assayed by ELISA (R&D Systems). The production of BMP4 was determined using an ELISA kit from R&D Systems and following the manufacturer's instructions.

#### 2.7. Statistical Analysis

The Mann–Whitney test was used to compare differences. Values of  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*) and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) were considered to be statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. ALL Cells Induce the Generation of DCs with Immunosuppressive Features

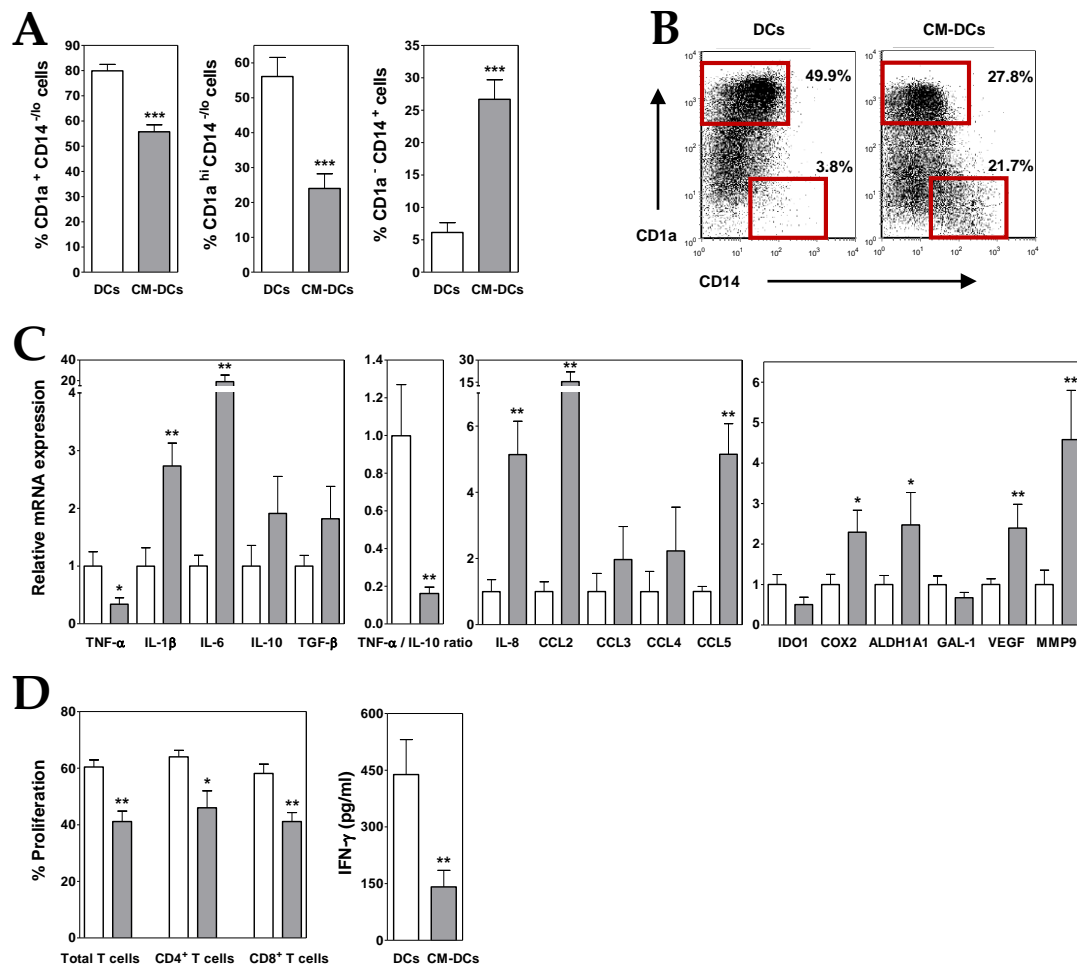
Human peripheral blood monocytes were induced to differentiate into DCs in the presence or absence of conditioned media (CM) from ALL cells. During this differentiation process, monocytes downregulated CD14 and upregulated CD1a, so that after 5 days of culture under control conditions CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>-/lo</sup> cells constituted the main cell population, and moreover, most of them expressed high levels of CD1a (Figure 1A,B). However, the presence of ALL-derived CM induced a reduction in the proportion of total CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>-/lo</sup> cells, mainly affecting the terminally differentiated CD1a<sup>hi</sup> CD14<sup>-/lo</sup> DCs (~30% and 60%, respectively), and concomitantly a notable increase in the proportion of CD1a<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> cells (Figure 1A,B). In addition, a reduced expression of HLA-DR was also observed (Supplementary Figure S1A). These results suggested that one or more factors contained in ALL-derived CM altered the differentiation of DCs. Interestingly, Nalm-6 ALL cells expressed BMP4, but not other related BMP ligands such as BMP2, BMP6 or BMP7 (Table 2), and neutralization of BMP4 in ALL-derived CM reduced (by 40–50%) the accumulation of CD1a<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> cells and increased the generation of CD1a<sup>hi</sup> CD14<sup>-/lo</sup> DCs (data not shown; manuscript in preparation).

**Table 2.** Expression of Bone Morphogenetic Protein (BMP) ligands in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cell lines.

	Control Nalm-6	BMP4-transduced Nalm-6
BMP2 mRNA Expression (arbitrary units)	ND	ND
BMP4 mRNA Expression (arbitrary units)	44 ± 15	43384 ± 4260
BMP6 mRNA Expression (arbitrary units)	ND	ND
BMP7 mRNA Expression (arbitrary units)	ND	ND
BMP4 Expression (pg/mL)	7 ± 1	1786 ± 35

ND: Not detected/Under the limit of detection.

A further analysis of DCs generated in the presence of ALL-derived CM (CM-DCs) showed that these cells exhibited an immunosuppressive profile. In CM-DCs, transcription of TNF- $\alpha$  was repressed whereas IL-10 expression was increased, which resulted in a drastic decrease of TNF- $\alpha$ /IL-10 expression ratio (~80–90%) (Figure 1C). An enhanced expression of other cytokines, such as IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ , as well as chemokines, such as IL-8, CCL3, CCL4 and CCL5, was also detected in CM-DCs (2- to 5-fold increases), being IL-6 and CCL2 the ones that underwent the highest increase (19- and 15-fold increase, respectively) (Figure 1C). Likewise, CM-DCs showed an upregulated expression (2- to 5-fold increases) of pro-tumoural factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP9), and cyclooxygenase-2 (COX2) and aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A), both enzymes involved in biosynthesis of prostaglandins and retinoic acid, respectively (Figure 1C). However, the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO1) enzyme and the carbohydrate-binding protein galectin-1 (GAL-1), both with immunosuppressive activity, was reduced in DCs differentiated in the presence of ALL-derived CM (Figure 1C).

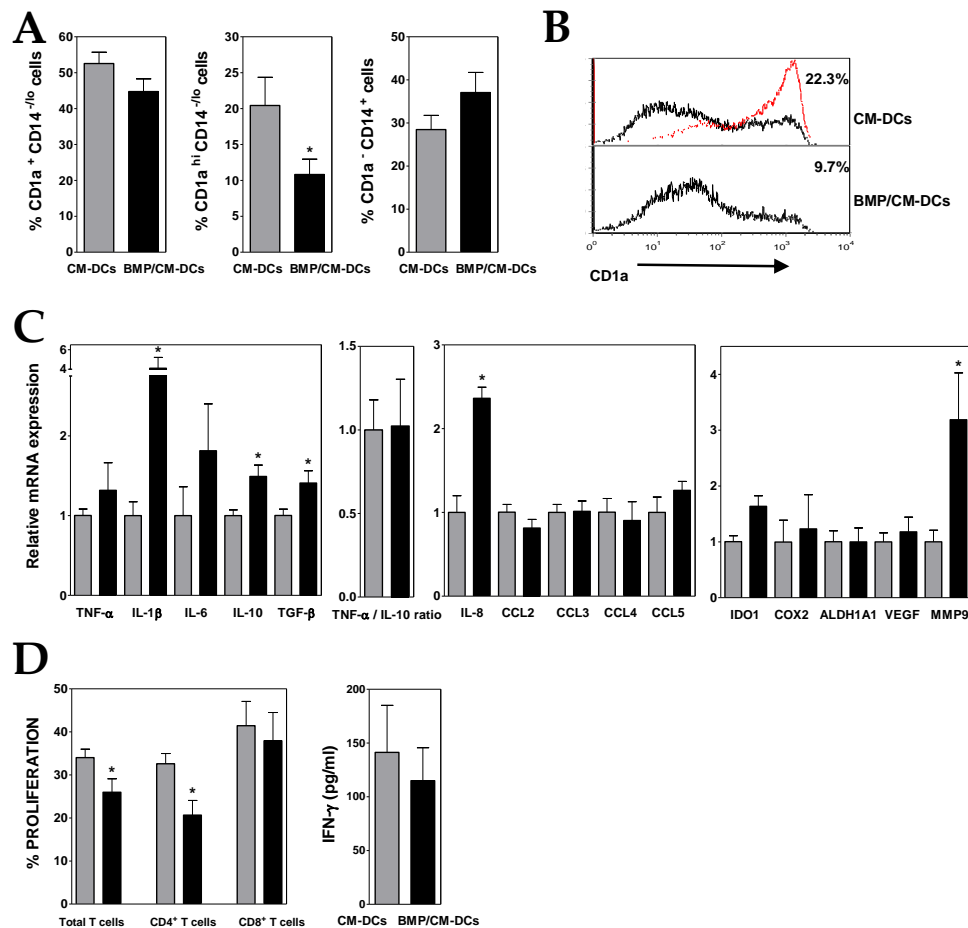


**Figure 1.** ALL cells alter the differentiation of dendritic cells (DCs). (A) Percentages of CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>-/lo</sup>, CD1a<sup>hi</sup> CD14<sup>-/lo</sup> and CD1a<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> cells recovered after 5–6 days of culture in the absence (white bars; DCs) or presence (grey bars; CM-DCs) of conditioned media from ALL cells. Data represent the mean  $\pm$  SEM of 12 to 15 independent experiments. (B) Representative dot plots showing CD14 versus CD1a expression. Percentages of CD1a<sup>hi</sup> CD14<sup>-/lo</sup> and CD1a<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> cell populations, delimited by red gates, are shown. (C) Real-time PCR quantification of mRNA levels in DCs differentiated from monocytes in the absence (white bars) or presence (grey bars) of conditioned media from ALL cells. Relative mRNA expression was calculated by dividing all individual data by the mean expression in control DCs. Results represent the mean  $\pm$  SEM of five to seven independent experiments. (D) Histograms show the percentages of proliferating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, gated on the CD3<sup>+</sup> cell population and calculated by the CFSE dilution method in mixed lymphocyte reaction assays. Data are the mean  $\pm$  SEM of seven independent experiments. Supernatants from DC/T cell co-cultures were harvested at day 5–6 and the amount of IFN- $\gamma$  was quantified by ELISA. Data are the mean  $\pm$  SEM of three to six independent experiments. Asterisks represent statistically significant differences between DCs and CM-DCs (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  and \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; by Mann–Whitney test).

To analyse the capacity of ALL cells to affect DC functionality, CM-DCs were co-cultured with allogeneic CD3<sup>+</sup> T lymphocytes. In correlation with the above results, the mixed lymphocyte reaction assays revealed that CM-DCs were able to stimulate T cell proliferative responses less efficiently than control DCs (Supplementary Figure S2). Figure 1D shows that the proliferative responses induced by CM-DCs were on average reduced by 30%, affecting both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. In addition, levels of IFN- $\gamma$  secreted by activated T cells were severely reduced in the presence of CM-DCs (Figure 1D).

### 3.2. BMP4 Overexpression Potentiates the Ability of ALL Cells to Induce Immunosuppressive DCs

Conditioned media from BMP4-overexpressing ALL cells (BMP/CM) (Table 2) was next used to generate DCs from monocytes (BMP/CM-DCs). In the presence of BMP/CM the proportion of CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>-/lo</sup> cells was further reduced when compared to CM-DCs, being the terminally differentiated CD1a<sup>hi</sup> CD14<sup>-/lo</sup> DC subset the most affected by the high BMP4 expression (Figure 2A,B). A parallel increment in the proportion of CD1a<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> cells was also observed in the presence of BMP/CM (Figure 2A).



**Figure 2.** BMP4-overexpressing ALL cells exhibit a higher capacity to generate immunosuppressive DCs. (A) Percentages of CD1a<sup>+</sup> CD14<sup>-/lo</sup>, CD1a<sup>hi</sup> CD14<sup>-/lo</sup> and CD1a<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> cells recovered after 5–6 days of culture in the presence of conditioned media from control (grey bars; CM-DCs) and BMP4-transduced (black bars; BMP/CM-DCs) ALL cells. Data represent the mean ± SEM of 10 to 12 independent experiments. (B) Representative histograms showing CD1a expression in CM- and BMP/CM-DCs. Percentages of CD1a<sup>hi</sup> cells are shown. For comparison, red line shows CD1a expression in DCs grown in the absence of conditioned media. (C) Real-time PCR quantification of mRNA levels in DCs differentiated from monocytes in the presence of conditioned media from control (grey bars) and BMP4-transduced (black bars) ALL cells. Relative mRNA expression was calculated by dividing all individual data by the mean expression in CM-DCs. Results represent the mean ± SEM of three to six independent experiments. (D) Histograms show the percentages of proliferating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, gated on the CD3<sup>+</sup> cell population and calculated by the CFSE dilution method in mixed lymphocyte reaction assays. Data are the mean ± SEM of four to six independent experiments. Supernatants from DC/T cell co-cultures were harvested at day 5–6 and the amount of IFN-γ was quantified by ELISA. Data are the mean ± SEM of five to six independent experiments. Asterisks represent statistically significant differences between CM-DCs and BMP/CM-DCs (\* *p* ≤ 0.05; by Mann–Whitney test).

Gene expression analysis showed that, in comparison to CM-DCs, BMP/CM-DCs expressed higher levels of IL-10, and also TNF- $\alpha$  (Figure 2C), what hardly affected the low TNF- $\alpha$ /IL-10 expression ratio. The presence of high levels of BMP4 during DC differentiation also induced an increased expression of TGF- $\beta$ , IL-6 and mainly IL-1 $\beta$  and IL-8 (2- to 4-fold increases) (Figure 2C). Upregulated transcription levels of IDO1 and MMP9 were also detected in BMP/CM-DCs (Figure 2C).

In agreement with the acquisition of a more pronounced immunosuppressive phenotype, the co-culture with CD3<sup>+</sup> T lymphocytes evidenced that BMP/CM-DCs exhibited a diminished allostimulatory capacity (Figure 2D and Supplementary Figure S2). The proliferative response of CD8<sup>+</sup> T cells was much less affected than that of CD4<sup>+</sup> T cells, and consequently IFN- $\gamma$  secretion underwent only a further slight decrease when compared with CM-DCs (Figure 2D).

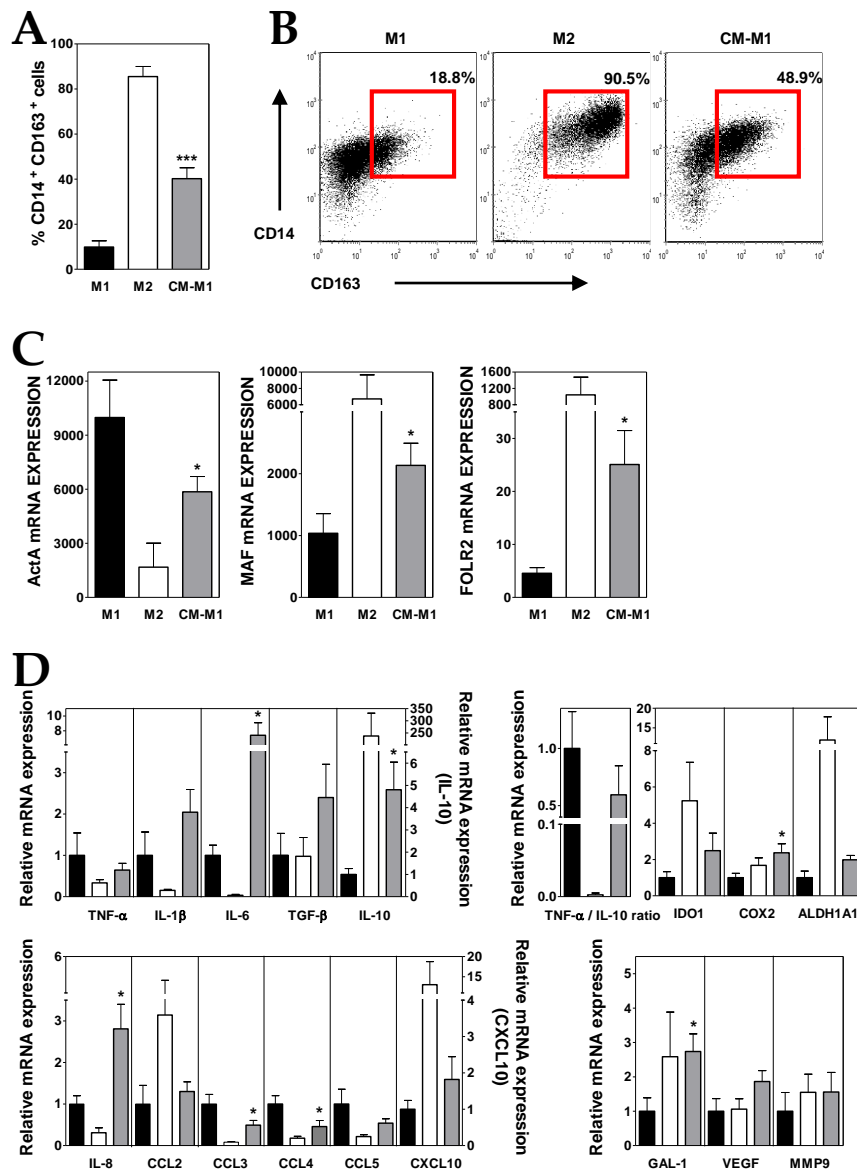
### 3.3. ALL Cells Promote M $\phi$ Polarization Towards an Anti-inflammatory M2-Like Phenotype

Peripheral blood monocytes were cultured with rhGM-CSF, in the absence or presence of ALL-derived CM, to induce the differentiation to pro-inflammatory M1-like M $\phi$ s. For comparison, anti-inflammatory M2-like M $\phi$ s were differentiated from monocytes by culturing them with rhM-CSF. The addition of ALL-derived CM during M1 differentiation induced an average 4-fold increase in the proportion of CD14<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> cells, a phenotype usually associated with M2 features in M $\phi$ s [29] (Figure 3A,B). The analysis of the expression of several markers differentially expressed by M1- and M2-like M $\phi$ s [30] showed that ALL-derived CM caused a notable reduction (~50%) in the expression of the M1 marker Activin A (ActA) (Figure 3C). In addition, the presence of ALL-derived CM induced the expression of the M2 markers folate receptor  $\beta$  (FOLR2) and MAF transcription factor (5- and 2-fold increases, respectively) (Figure 3C). Intermediate expression levels of CD206, CD209 and HLA-DR were also observed (Supplementary Figure S1B). These observations indicated that some factors present in ALL-derived CM skewed M1-like M $\phi$  polarization towards a less pro-inflammatory phenotype. Interestingly, the neutralization of BMP4 in ALL-derived CM reduced (~40–50%) the generation of CD14<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> cells and partially inhibited the increases in FOLR2 and MAF expression and the reduction in ActA expression (data not shown; manuscript in preparation).

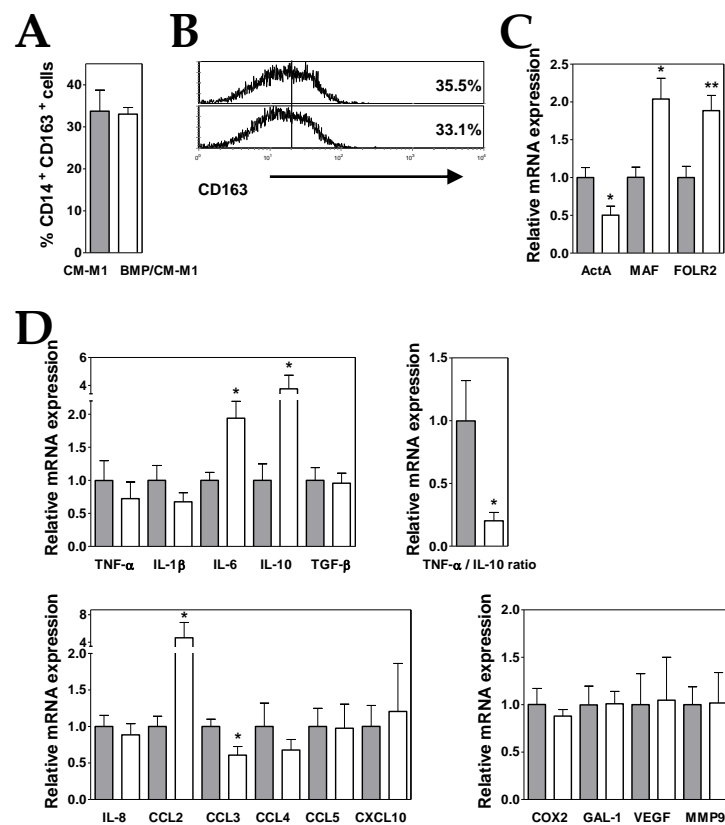
A further characterization supported that the culture of monocytes with ALL-derived CM during M1 polarization induced the acquisition of an immunosuppressive profile in the resulting M $\phi$ s (CM-M1). Compared to M1, CM-M1 M $\phi$ s exhibited a decreased expression of TNF- $\alpha$  and an upregulated IL-10 expression (Figure 3D), what reduced by 40% the TNF- $\alpha$ /IL-10 expression ratio. Likewise, CM-M1 M $\phi$ s showed intermediate features between M1- and M2-like M $\phi$ s for the expression of the chemokines CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL10 as well as IDO1 and ALDH1A enzymes (Figure 3D). By contrast, the transcription of IL-6 and IL-8, but also IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , COX2, GAL-1, VEGF and MMP9, was notably upregulated in CM-M1 M $\phi$ s, even above the M1 and M2 values (Figure 3D).

### 3.4. BMP4 Overexpressing-ALL Cells Favour the Generation of M2-Like M $\phi$ s with Pro-tumoural Features

Monocytes were induced to differentiate into M1-like M $\phi$ s in the presence of conditioned media from BMP4-overexpressing ALL cells (BMP/CM-M1). Under high levels of BMP4, similar proportions of CD14<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> cells were generated (Figure 4A,B) although BMP/CM-M1 M $\phi$ s displayed an enhanced M2-like phenotype, in comparison to CM-M1 M $\phi$ s. Expression levels of M2 markers MAF and FOLR2 underwent a further 2-fold increase whereas ActA transcription was additionally repressed by 50% (Figure 4C).



**Figure 3.** ALL cells promote M2-like macrophage (MØ) differentiation. (A) Percentages of CD14<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> MØs generated from monocytes cultured for five days with GM-CSF (black bars; M1), M-CSF (white bars; M2) and GM-CSF plus conditioned media from ALL cells (grey bars; CM-M1). Data represent the mean  $\pm$  SEM of 12 independent experiments. (B) Representative dot plots showing CD14 versus CD163 expression. Percentages of CD14<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> MØs, delimited by red gates, are shown. (C,D) Real-time PCR quantification of mRNA levels in MØs differentiated from monocytes after 3 days of culture with GM-CSF, M-CSF and GM-CSF plus conditioned media from ALL cells. Relative mRNA expression in (D) was calculated by dividing all individual data by the mean expression in M1 MØs. Results represent the mean  $\pm$  SEM of three to ten independent experiments. Asterisks represent statistically significant differences between M1 and CM-M1 MØs (\*  $p \leq 0.05$  and \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; by Mann–Whitney test).



**Figure 4.** BMP4 overexpression in ALL cells potentiates their ability to generate M2-like MØs. (A) Percentages of CD14<sup>+</sup> CD163<sup>+</sup> MØs generated from monocytes cultured for five days with GM-CSF plus conditioned media from control (grey bars; CM-M1) and BMP4-transduced (white bars; BMP/CM-M1) ALL cells. Data represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. (B) Representative histograms showing CD163 expression in CM-M1 and BMP/CM-M1 MØs. (C,D) Real-time PCR quantification of mRNA levels in MØs differentiated from monocytes after three days of culture with GM-CSF plus conditioned media from control (grey bars) and BMP4-transduced (white bars) ALL cells. Relative mRNA expression was calculated by dividing all individual data by the mean expression in CM-M1 MØs. Results represent the mean  $\pm$  SEM of three to five independent experiments. Asterisks represent statistically significant differences between CM-M1 and BMP/CM-M1 MØs (\*  $p \leq 0.05$  and \*\*  $p \leq 0.01$ ; by Mann-Whitney test).

When compared to CM-M1 MØs, the gene expression analysis showed that BMP/CM-M1 MØs also exhibited a less pro-inflammatory profile though with some enhanced pro-tumoural features (Figure 4D). A 4-fold increment in IL-10 expression together with a reduced TNF- $\alpha$  expression led to a remarkable further decrease in the TNF- $\alpha$ /IL-10 expression ratio (by about 80%) (Figure 4D). In addition, the expression levels of CCL2 and IL-6 were upregulated (4- and 2-fold increases, respectively) in comparison to CM-M1 MØs (Figure 4D).

#### 4. Discussion

Immune evasion is a recognized hallmark of cancer, being the inhibition of the normal anti-tumour functions of DCs and MØs one of the immunosuppressive mechanisms used by cancer cells to evade immunity in solid as well as haematological malignancies.

Quantitative and qualitative alterations in DCs have been described to be a common feature shared by different haematological tumours including chronic myeloid leukaemia [31], myelodysplastic syndromes [32], acute myeloid leukaemia [33], multiple myeloma [34] or chronic lymphocytic leukaemia [35]. Similarly, in B cell precursor ALL patients the levels of both conventional and plasmacytoid DCs were reduced in blood as well as in bone marrow at diagnosis, and DC levels

were related to the extent of the disease being lower in those patients with unfavourable prognostic features [16,36,37]. Likewise, Zhou et al. have described an aberrant functionality of DCs in adult B lineage ALL [38] and Mami et al. [37] were not able to generate CD1a<sup>+</sup> myeloid or ILT3<sup>+</sup> plasmacytoid DCs from circulating CD34<sup>+</sup> precursor cells of ALL patients, suggesting that DC differentiation was altered in B cell precursor ALL. In support, our data provide evidence that DCs differentiated from monocytes in the presence of ALL-derived soluble factors show an atypical phenotype exhibiting features usually seen in tolerogenic DCs as well as immunosuppressive tumour-associated DCs [7,39–41]. These characteristics include a low TNF- $\alpha$ /IL-10 expression ratio and high expression of the immunosuppressive cytokine TGF- $\beta$  and other cytokines (IL-6, IL-1 $\beta$ ), chemokines (mainly CCL2, CCL5 and IL-8) and factors (the COX2 and ALDH1A enzymes involved in biosynthesis of prostaglandins and retinoic acid, respectively, the pro-angiogenic factor VEGF, and the protease MMP9 engaged in degradation and remodelling of extracellular matrix). All in combination would contribute to impair the effector immune response, to favour monocyte recruitment and the development of other cell types with immunosuppressive activity and to promote the growth, survival and invasiveness of leukemic cells.

In haematological malignancies, as in solid tumours, M $\phi$ s also infiltrate the tumour tissues and many of these tumour-associated M $\phi$ s are induced to differentiate to M2-like M $\phi$ s exhibiting pro-tumoural functions [9,42]. The frequency of CD163<sup>+</sup> M2-like M $\phi$ s has been reported to be notably increased in acute and chronic myeloid leukaemia [43,44], chronic lymphocytic leukaemia [45], multiple myeloma [46] and also adult ALL [47]. In line with these data, our results show that soluble factors derived from ALL blasts are able to skew the differentiation of monocytes cultured under M1 conditions towards a M2-like phenotype. These M $\phi$ s express CD163 and M2-specific markers (increased expression of FOLR2 and MAF and reduced expression of ActA), and show an upregulated expression of different factors that favour tumour progression (including, among others, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IDO1, COX2 and GAL-1).

The generation of immunosuppressive/tolerogenic DCs and M2 M $\phi$ s has been proposed to be induced by different tumour-mediated mechanisms such as hypoxia, endoplasmic reticulum stress, and mainly exposition to several tumour-derived cytokines and growth factors [6,8,13,48]. In this context, the components of the TGF- $\beta$  superfamily, including the BMPs, have been extensively reported to participate in multiple aspects of tumour biology including immune evasion [21,49–51] but the relevance of BMP pathway in the origin and progression of leukaemias and lymphomas is now beginning to be uncovered [24,52]. Our present data show that Nalm-6 ALL cells mainly secrete BMP4, but not other BMP ligands previously reported to be involved in lymphoid malignancies [24,53]. In other ongoing studies, we also described the expression of BMP4 in primary ALL blasts obtained at the time of diagnosis, and notably this BMP4 expression was significantly increased in ALL cells derived from paediatric patients who later relapsed [54] (manuscript in preparation). In agreement with our results, Gaynes et al. [25] reported an upregulated expression of BMP4 in ALL cells infiltrating the central nervous system of transplanted NSG mice, in comparison to those leukemic cells located in bone marrow. However, Tesfai et al. [26] only found a BMP2 overexpression when compared pre-B ALL and CD34<sup>+</sup> cells.

We also point out that BMP4-containing CM from ALL cells impair the differentiation of DCs and M $\phi$ s from monocytes. The relevance of BMP4 is further supported by the results showing that BMP4 overexpression in ALL cells enhances the generation of immunosuppressive DCs which in addition exhibit a higher pro-tumoural activity, revealed by an upregulated expression of the immunosuppressive and tumour growth promoting factors TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IDO1 and MMP9, and a concomitant reduced allostimulatory capacity. The involvement of BMP signalling in DC differentiation and maturation has been previously reported by us and others [55,56]. BMP4-overexpressing ALL cells also have the ability to generate M $\phi$ s with a more marked M2-like phenotype and enhanced pro-tumoural features evidenced by a lower TNF- $\alpha$ /IL-10 expression ratio and upregulated expression levels of CCL2 and IL-6. In this line, we have recently described that BMP4, produced by bladder cancer cells, induces

monocyte differentiation toward a M2 phenotype, leading to the production of cytokines that favour tumour progression [57]. Interestingly, the ability to induce M2 macrophage polarization seems to be shared with other BMP ligands since BMP2 promotes the acquisition of a M2 phenotype during bone regeneration [58] and BMP-7 treatment increases M2 differentiation and reduces inflammation and plaque formation in atherosclerosis [59].

Together, our results indicate that BMP4 is an important ALL blast-derived soluble factor which contribute to switch the differentiation of monocyte-derived DCs from an immunostimulatory to an immunosuppressive state, and to promote the polarization of MØs to a pro-tumoural phenotype. Future work could focus on the blockade of BMP4 secretion by ALL cells which could help, in those patients who relapse, to control leukaemia progression by counteracting the development of a pro-tumour immune microenvironment.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/722/s1>, Figure S1: Phenotypic analysis of DCs and MØs differentiated in the absence or presence of conditioned media from ALL cells, Figure S2: Representative histograms showing the allostimulatory capacity of DCs differentiated in the absence or presence of conditioned media from ALL cells, Figure S3: Conditioned media from different ALL cell lines alter the differentiation of DCs and MØs.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.V. (Angeles Vicente) and A.V. (Alberto Varas); Methodology, J.V., L.M.F.-S., A.F.-R., R.S. and E.J.; Data curation, J.V., L.M.F.-S., A.F.-R., R.S. and E.J.; Supervision, A.V. (Angeles Vicente). and A.V. (Alberto Varas); Original draft, A.V. (Angeles Vicente). and A.V. (Alberto Varas); Review and editing, J.V., L.M.F.-S., A.F.-R., A.V. (Angeles Vicente). and A.V. (Alberto Varas).

**Funding:** This work was supported by grants SAF2015-66986-R (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness), Beca I-UnoEntreCienMil (Uno Entre Cien Mil Foundation), RD16/0011/0003 (Institute of Health Carlos III, Spain) and B2017/BMD-3692 AvanCell-CM (Community of Madrid). A.F.-R. was supported by Grant PR41/17-20974 (Santander-Universidad Complutense de Madrid). L.M.F.-S. is supported by a pre-doctoral fellowship (CT45/15-CT46/15) from the Complutense University of Madrid.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Shen, M.; Kang, Y. Complex interplay between tumor microenvironment and cancer therapy. *Front Med.* **2018**, *12*, 426–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wang, M.; Zhao, J.; Zhang, L.; Wei, F.; Lian, Y.; Wu, Y.; Gong, Z.; Zhang, S.; Zhou, J.; Cao, K.; et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer* **2017**, *8*, 761–773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Belli, C.; Trapani, D.; Viale, G.; D'Amico, P.; Duso, B.A.; Della Vigna, P.; Orsi, F.; Curigliano, G. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev.* **2018**, *65*, 22–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Roma-Rodrigues, C.; Mendes, R.; Baptista, P.V.; Fernandes, A.R. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Tabe, Y.; Konopleva, M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br. J. Haematol.* **2014**, *164*, 767–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Conejo-Garcia, J.R.; Rutkowski, M.R.; Cubillos-Ruiz, J.R. State-of-the-art of regulatory dendritic cells in cancer. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *164*, 97–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Galati, D.; Corazzelli, G.; De Filippi, R.; Pinto, A. Dendritic cells in hematological malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *108*, 86–96. [[CrossRef](#)]
8. Goswami, K.K.; Ghosh, T.; Ghosh, S.; Sarkar, M.; Bose, A.; Baral, R. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. *Cell Immunol.* **2017**, *316*, 1–10. [[CrossRef](#)]
9. Komohara, Y.; Niino, D.; Ohnishi, K.; Ohshima, K.; Takeya, M. Role of tumor-associated macrophages in hematological malignancies. *Pathol. Int.* **2015**, *65*, 170–176. [[CrossRef](#)]
10. Clappaert, E.J.; Murgaski, A.; Van Damme, H.; Kiss, M.; Laoui, D. Diamonds in the Rough: Harnessing Tumor-Associated Myeloid Cells for Cancer Therapy. *Front Immunol.* **2018**, *9*, 2250. [[CrossRef](#)]
11. De Vlaeminck, Y.; Gonzalez-Rascon, A.; Goyvaerts, C.; Breckpot, K. Cancer-Associated Myeloid Regulatory Cells. *Front Immunol.* **2016**, *7*, 113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wylie, B.; Macri, C.; Mintern, J.D.; Waithman, J. Dendritic Cells and Cancer: From Biology to Therapeutic Intervention. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Yang, L.; Zhang, Y. Tumor-associated macrophages: From basic research to clinical application. *J. Hematol. Oncol.* **2017**, *10*, 58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bhojwani, D.; Yang, J.J.; Pui, C.H. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Clin. N. Am.* **2015**, *62*, 47–60. [[CrossRef](#)]
15. Terwilliger, T.; Abdul-Hay, M. Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* **2017**, *7*, e577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Laane, E.; Bjorklund, E.; Mazur, J.; Lonnerholm, G.; Soderhall, S.; Porwit, A. Dendritic cell regeneration in the bone marrow of children treated for acute lymphoblastic leukaemia. *Scand. J. Immunol.* **2007**, *66*, 572–583. [[CrossRef](#)]
17. Liu, Y.F.; Chen, Y.Y.; He, Y.Y.; Wang, J.Y.; Yang, J.P.; Zhong, S.L.; Jiang, N.; Zhou, P.; Jiang, H.; Zhou, J. Expansion and activation of granulocytic, myeloid-derived suppressor cells in childhood precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *102*, 449–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Rouce, R.H.; Shaim, H.; Sekine, T.; Weber, G.; Ballard, B.; Ku, S.; Barese, C.; Murali, V.; Wu, M.F.; Liu, H.; et al. The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2016**, *30*, 800–811. [[CrossRef](#)]
19. Salem, M.L.; El-Shanshory, M.R.; Abdou, S.H.; Attia, M.S.; Sobhy, S.M.; Zidan, M.F.; Zidan, A.A. Chemotherapy alters the increased numbers of myeloid-derived suppressor and regulatory T cells in children with acute lymphoblastic leukemia. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2018**, *40*, 158–167. [[CrossRef](#)]
20. Wang, R.N.; Green, J.; Wang, Z.; Deng, Y.; Qiao, M.; Peabody, M.; Zhang, Q.; Ye, J.; Yan, Z.; Denduluri, S.; et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* **2014**, *1*, 87–105. [[CrossRef](#)]
21. Bach, D.H.; Park, H.J.; Lee, S.K. The Dual Role of Bone Morphogenetic Proteins in Cancer. *Mol. Ther. Oncolytics* **2018**, *8*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zhang, L.; Ye, Y.; Long, X.; Xiao, P.; Ren, X.; Yu, J. BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination. *Oncotarget* **2016**, *7*, 78206–78218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Toofan, P.; Wheadon, H. Role of the bone morphogenic protein pathway in developmental haemopoiesis and leukaemogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 1455–1463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zylbersztein, F.; Flores-Violante, M.; Voeltzel, T.; Nicolini, F.E.; Lefort, S.; Maguer-Satta, V. The BMP pathway: A unique tool to decode the origin and progression of leukemia. *Exp. Hematol.* **2018**, *61*, 36–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gaynes, J.S.; Jonart, L.M.; Zamora, E.A.; Naumann, J.A.; Gossai, N.P.; Gordon, P.M. The central nervous system microenvironment influences the leukemia transcriptome and enhances leukemia chemo-resistance. *Haematologica* **2017**, *102*, e136–e139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Tesfai, Y.; Ford, J.; Carter, K.W.; Firth, M.J.; O’Leary, R.A.; Gottardo, N.G.; Cole, C.; Kees, U.R. Interactions between acute lymphoblastic leukemia and bone marrow stromal cells influence response to therapy. *Leuk. Res.* **2012**, *36*, 299–306. [[CrossRef](#)]
27. Vicente Lopez, A.; Vazquez Garcia, M.N.; Melen, G.J.; Entrena Martinez, A.; Cubillo Moreno, I.; Garcia-Castro, J.; Orellana, M.R.; Gonzalez, A.G. Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: Correlations with the course of disease. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84496. [[CrossRef](#)]
28. Naldini, L.; Blomer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F.H.; Verma, I.M.; Trono, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **1996**, *272*, 263–267. [[CrossRef](#)]
29. Ambarus, C.A.; Krausz, S.; van Eijk, M.; Hamann, J.; Radstake, T.R.; Reedquist, K.A.; Tak, P.P.; Baeten, D.L. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J. Immunol. Methods* **2012**, *375*, 196–206. [[CrossRef](#)]
30. Sierra-Filardi, E.; Puig-Kroger, A.; Blanco, F.J.; Nieto, C.; Bragado, R.; Palomero, M.I.; Bernabeu, C.; Vega, M.A.; Corbi, A.L. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* **2011**, *117*, 5092–5101. [[CrossRef](#)]
31. Mohty, M.; Isnardon, D.; Vey, N.; Briere, F.; Blaise, D.; Olive, D.; Gaugler, B. Low blood dendritic cells in chronic myeloid leukaemia patients correlates with loss of CD34+/CD38- primitive haematopoietic progenitors. *Br. J. Haematol.* **2002**, *119*, 115–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Ma, L.; Delforge, M.; van Duppen, V.; Verhoef, G.; Emanuel, B.; Boogaerts, M.; Hagemeijer, A.; Vandenberghe, P. Circulating myeloid and lymphoid precursor dendritic cells are clonally involved in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **2004**, *18*, 1451–1456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Derolf, A.R.; Laane, E.; Bjorklund, E.; Saft, L.; Bjorkholm, M.; Porwit, A. Dendritic cells in bone marrow at diagnosis and after chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia. *Scand. J. Immunol.* **2014**, *80*, 424–431. [[CrossRef](#)]
34. Brimnes, M.K.; Svane, I.M.; Johnsen, H.E. Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma. *Clin. Exp. Immunol.* **2006**, *144*, 76–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mami, N.B.; Mohty, M.; Aurrant-Schleinitz, T.; Olive, D.; Gaugler, B. Blood dendritic cells in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Immunobiology* **2008**, *213*, 493–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Maecker, B.; Mougiakakos, D.; Zimmermann, M.; Behrens, M.; Hollander, S.; Schrauder, A.; Schrappe, M.; Welte, K.; Klein, C. Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia* **2006**, *20*, 645–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Mami, N.B.; Mohty, M.; Chambost, H.; Gaugler, B.; Olive, D. Blood dendritic cells in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2004**, *126*, 77–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zhou, Z.; Lin, W.; Li, X.; Huang, Y.; Ren, J.; Gao, Y.; Li, J. Aberrant Phenotype and Function of Dendritic Cells in Adult B Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *Immunol. Invest.* **2019**, 1–13. [[CrossRef](#)]
39. Keirse, J.; Van Damme, H.; Van Ginderachter, J.A.; Laoui, D. Exploiting tumor-associated dendritic cell heterogeneity for novel cancer therapies. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *102*, 317–324. [[CrossRef](#)]
40. Kim, S.H.; Jung, H.H.; Lee, C.K. Generation, Characteristics and Clinical Trials of Ex Vivo Generated Tolerogenic Dendritic Cells. *Yonsei Med. J.* **2018**, *59*, 807–815. [[CrossRef](#)]
41. Shurin, G.V.; Ma, Y.; Shurin, M.R. Immunosuppressive mechanisms of regulatory dendritic cells in cancer. *Cancer Microenviron.* **2013**, *6*, 159–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Takeya, M.; Komohara, Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: Friend or foe? *Pathol. Int.* **2016**, *66*, 491–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Al-Matary, Y.S.; Botezatu, L.; Opalka, B.; Hones, J.M.; Lams, R.F.; Thivakaran, A.; Schutte, J.; Koster, R.; Lennartz, K.; Schroeder, T.; et al. Acute myeloid leukemia cells polarize macrophages towards a leukemia supporting state in a Growth factor independence 1 dependent manner. *Haematologica* **2016**, *101*, 1216–1227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Song, J.X.; Dian, Z.J.; Wen, Y.; Mei, F.; Li, R.W.; Sa, Y.L. Assessment of the Number and Phenotype of Macrophages in the Human BMB Samples of CML. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *2016*, 8086398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chen, Y.C.E.; Mapp, S.; Blumenthal, A.; Burgess, M.L.; Mazzieri, R.; Mattarollo, S.R.; Mollee, P.; Gill, D.; Saunders, N.A. The duality of macrophage function in chronic lymphocytic leukaemia. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2017**, *1868*, 176–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Beider, K.; Bitner, H.; Leiba, M.; Gutwein, O.; Koren-Michowitz, M.; Ostrovsky, O.; Abraham, M.; Wald, H.; Galun, E.; Peled, A.; et al. Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype. *Oncotarget* **2014**, *5*, 11283–11296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Hohtari, H.; Bruck, O.; Blom, S.; Turkki, R.; Sinisalo, M.; Kovanen, P.E.; Kallioniemi, O.; Pellinen, T.; Porkka, K.; Mustjoki, S. Immune cell constitution in bone marrow microenvironment predicts outcome in adult ALL. *Leukemia* **2019**. [[CrossRef](#)]
48. Zong, J.; Keskinov, A.A.; Shurin, G.V.; Shurin, M.R. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunol. Immunother* **2016**, *65*, 821–833. [[CrossRef](#)]
49. Ahmadi, A.; Najafi, M.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Transforming growth factor-beta signaling: Tumorigenesis and targeting for cancer therapy. *J. Cell Physiol.* **2019**, *234*, 12173–12187. [[CrossRef](#)]
50. Ning, J.; Zhao, Y.; Ye, Y.; Yu, J. Opposing roles and potential antagonistic mechanism between TGF-beta and BMP pathways: Implications for cancer progression. *EBioMedicine* **2019**, *41*, 702–710. [[CrossRef](#)]
51. Pickup, M.W.; Owens, P.; Moses, H.L. TGF-beta, Bone Morphogenetic Protein, and Activin Signaling and the Tumor Microenvironment. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)]
52. Toofan, P.; Busch, C.; Morrison, H.; O'Brien, S.; Jorgensen, H.; Copland, M.; Wheadon, H. Chronic myeloid leukaemia cells require the bone morphogenic protein pathway for cell cycle progression and self-renewal. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Holien, T.; Sundan, A. The role of bone morphogenetic proteins in myeloma cell survival. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2014**, *25*, 343–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Fernández-Sevilla, L.M.; Sánchez-Valdepeñas, C.; Gonzalez-Murillo, A.; Entrena, A.; Martínez-Laperche, C.; Melen, G.J.; Varas, A.; Vicente, A.; Ramírez, M. BMP-4 levels in childhood B-ALL of low/intermediate-risk groups identify children with poor outcome. *Haematologica* **2017**, *102*, 195.
55. Martínez, V.G.; Hidalgo, L.; Valencia, J.; Hernandez-Lopez, C.; Entrena, A.; del Amo, B.G.; Zapata, A.G.; Vicente, A.; Sacedon, R.; Varas, A. Autocrine activation of canonical BMP signaling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **2014**, *44*, 1031–1038. [[CrossRef](#)]
56. Yasmin, N.; Bauer, T.; Modak, M.; Wagner, K.; Schuster, C.; Koffel, R.; Seyerl, M.; Stockl, J.; Elbe-Burger, A.; Graf, D.; et al. Identification of bone morphogenetic protein 7 (BMP7) as an instructive factor for human epidermal Langerhans cell differentiation. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 2597–2610. [[CrossRef](#)]
57. Martínez, V.G.; Rubio, C.; Martínez-Fernandez, M.; Segovia, C.; Lopez-Calderon, F.; Garin, M.I.; Teijeira, A.; Munera-Maravilla, E.; Varas, A.; Sacedon, R.; et al. BMP4 Induces M2 Macrophage Polarization and Favors Tumor Progression in Bladder Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 7388–7399. [[CrossRef](#)]
58. Wei, F.; Zhou, Y.; Wang, J.; Liu, C.; Xiao, Y. The Immunomodulatory Role of BMP-2 on Macrophages to Accelerate Osteogenesis. *Tissue Eng. Part A* **2018**, *24*, 584–594. [[CrossRef](#)]
59. Singla, D.K.; Singla, R.; Wang, J. BMP-7 Treatment Increases M2 Macrophage Differentiation and Reduces Inflammation and Plaque Formation in Apo E<sup>-/-</sup> Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147897. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## FIBROBLASTIC RETICULAR CELLS

**Characterization of human fibroblastic reticular cells as potential immunotherapeutic tools**JARIS VALENCIA<sup>1,\*</sup>, EVA JIMÉNEZ<sup>1,\*</sup>, VÍCTOR G. MARTÍNEZ<sup>1</sup>, BEATRIZ G. DEL AMO<sup>1</sup>, LAURA HIDALGO<sup>1</sup>, ANA ENTRENA<sup>1</sup>, LIDIA M. FERNÁNDEZ-SEVILLA<sup>1</sup>, FRANCISCO DEL RÍO<sup>2</sup>, ALBERTO VARAS<sup>1</sup>, ÁNGELES VICENTE<sup>1</sup> & ROSA SACEDÓN<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain, and <sup>2</sup>Department of Medicine, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain**Abstract**

Fibroblastic reticular cells (FRCs) are essential players during adaptive immune responses not only as a structural support for the encounter of antigen-presenting cells and naive T lymphocytes but also as a source of modulatory signals. However, little is known about this cell population in humans. To address the phenotypical and functional analysis of human FRCs here we established splenic (SP) and mesenteric lymph node (LN) CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>podoplanin<sup>+</sup> myofibroblastic cell cultures. They shared the phenotypical characteristics distinctive of FRCs, including the expression of immunomodulatory factors and peripheral tissue antigens. Nevertheless, human FRCs also showed particular features, some differing from mouse FRCs, like the lack of nitric oxide synthase (NOS2) expression after interferon (IFN) $\gamma$  stimulation. Interestingly, SP-FRCs expressed higher levels of interleukin (IL)-6, BMP4, CCL2, CXCL12 and Notch molecules, and strongly adapted their functional profile to lipopolysaccharide (LPS), polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) and IFN $\gamma$  stimulation. In contrast, we found higher expression of transforming growth factor (TGF) $\beta$  and Activin A in LN-FRCs that barely responded via Toll-Like Receptor (TLR)3 and constitutively expressed retinaldehyde dehydrogenase 1 enzyme, absent in SP-FRCs. This study reveals human FRCs can be valuable models to increase our knowledge about the physiology of human secondary lymphoid organs in health and disease and to explore the therapeutic options of FRCs.

**Key Words:** human fibroblastic reticular cells, immunomodulation, lymph node, spleen**Introduction**

Immunomodulation is a complex task but also a potent and versatile therapeutic strategy. We are taking part in a new era, where cell therapies based on the inoculation of modified and/or *in vitro* expanded cell populations are designed to redirect immune function to fight against cancer and pathogens, restore immunotolerance or promote wound healing and tissue regeneration.

Fibroblastic reticular cells (FRCs) are a mesenchymal cell lineage, related to mesenchymal stromal cells (MSCs), tissue fibroblasts or type B synoviocytes. They present specific features imprinted during the ontogeny of secondary lymphoid organs (SLO) [1]. FRCs build up a tridimensional network that

supports and guides the encounter of leukocyte populations and antigens in SLO [2]. However, FRCs are also important immune players with multipurpose functions. They, for example, participate in peripheral tolerance [3,4] and restrain T-cell responses [5–8] but also produce factors that favor T-cell survival and priming [1,9], B-cell homeostasis [10–12] and define the configuration of leukocyte populations attracted to and retained in SLO [13,14]. A recent study has shown in mice that *ex vivo* expanded allogenic FRCs significantly increased survival after septicemia or sepsis, where MSC treatment fails [15]. Hence a single intraperitoneal dose of FRC has a systemic effect dependent on nitric oxide synthase (NOS2) activity in FRCs, which attenuates septic cytokine storm, and reduces bacteremia [15].

\*These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Rosa Sacedón, PhD, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. E-mail: rmsacedo@ucm.es

(Received 30 November 2016; accepted 31 January 2017)

In spite of this masterful and valuable role of FRCs organizing immune responses, these cells are the forgotten cell population in human immunotherapy. Although stromal cell lines derived from human spleen [16,17] and tonsils [18] have been obtained, only one recent study focused on developing strategies to obtain and properly define human FRCs from lymph node (LN), but the investigators did not further characterize their immune features [19]. Our knowledge about FRCs is, therefore, largely based on data obtained in mice but we cannot merely extrapolate results obtained in the murine model to humans.

In the present work, we used a simple and reproducible strategy to obtain human FRCs from spleen (SP-FRCs) and LN (LN-FRCs). Their phenotypic characterization reveals that they share basic features with their murine equivalents but they also show important differences. Interestingly, although they were *in vitro* expanded cells, SP-FRCs and LN-FRCs were different, suggesting they indeed are two distinct FRC lineages epigenetically sustained that maintain their peculiarities outside organ cues. The functional and phenotypical features of SP-FRCs suggest that they play a key role as innate sentinels of blood-borne pathogens and in the establishment of the specific microenvironment that supports the homeostasis of splenic myeloid populations. Although to a lesser extent, LN-FRCs may serve also as pathogen-sensing cells. Also, certain characteristics of LN-FRCs, such as induction of HLA-DR and higher expression peripheral tissue-restricted antigens, suggest a tight relationship with T cells.

## Material and methods

### Human FRC cultures

Human spleen and mesenteric LN tissues were obtained from both male and female brain-dead organ donors, with informed consent from next of kin through the Transplant Coordination Unit, Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain). The study was conducted in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and was reviewed and approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínico San Carlos and of our university (Complutense University of Madrid).

To obtain SP-FRC cultures, spleen fragments were dissected and all capsule tissue and bigger trabeculae were removed. Tissue homogenates were obtained by mechanical disruption using a sterile glass potter. After erythrocytes were lysed, the homogenate was enriched in smaller fragments and aggregates by two consecutive centrifugations at low speed. Then, they were gently disaggregated with needles and cultured in 15% fetal calf serum (FCS; Gibco, Thermo Fisher Scientific) RPMI 1640 medium supplemented with

100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2 mmol/L L-glutamine and 1 mmol/L pyruvate (all from Lonza), referred to as RPMI-complete medium. Plates were washed after 5–7 days to remove fragments and non-adherent. When the adherent cell layer was 70%–80% confluent, cells were gently trypsinized and cultured at 1:3 split for up to three passages, to ensure that all contaminating hematopoietic cells had been totally washed out of the flask before extensive characterization. Then, cells were frozen in FCS-10% dimethyl sulfoxide (DMSO) at –80°C until use.

LN-FRCs were obtained as described above but culturing complete cell suspensions.

All studies described in this report were performed on cells between three and eight passages.

### FRC stimulation

In this study,  $5 \times 10^4$  FRCs were plated on 6-well plates with 2 mL of RPMI-complete medium and allowed to adhere and grow. When the layer was 70%–80% confluent, FRCs were stimulated with IFN $\gamma$  (10 ng/mL), LPS (100 ng/mL) or polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C; 12.5 µg/mL) (all from Invitrogen) for 6 h for messenger RNA (mRNA) expression, and for 48 h for flow cytometry and tryptophan and kynurenine determination.

### FRC T-cell co-culture

In this study,  $20 \times 10^3$  SP-FRCs or  $10 \times 10^3$  LN-FRCs/well were seeded on 24-well plate coated with anti-human CD3 (10 µg/mL) (Biolegend) and allowed to adhere overnight. Then medium was removed and naïve CD4<sup>+</sup> T cells, isolated as described [20], were added at a 1:20 of FRC/T-cell ratio in 10% FCS RPMI-complete medium containing soluble anti-human CD28 (4 µg/mL) (Biolegend). For transwell co-cultures, after the overnight adhesion of FRCs in the lower chamber, isolated naïve CD4<sup>+</sup> T cells were added on the CD3 pre-coated transwell inserts (pore size 0.4 µm, Corning, Lonza).

### FACS analysis

The following monoclonal antibodies conjugated with Alexa 488, fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, phycoerythrin cyanin 5.5, Alexa 647 or allophycocyanin were used for flow cytometric analysis: CD40 (5C3), CD80 (L307.4), CD44 (G44-26), CD45 (2DI), CD31 (M89D3), CD29 (MAR4) (BD Biosciences); HLA-ABC (W6/32), HLA-DR (L243), CD86 (IT2.2), CD90 (5E10), CXCR4 (12G5), CD273/PD-L2 (24F.10C12), CD274/PD-L1 (29E.2A3) and CD54 (HCD54) (Biolegend). Immunofluorescence staining was performed by incubating the cells in phosphate-buffered saline (PBS) containing 5 mmol/L

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 1% FCS in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min at 4°C. To avoid the binding of antibodies to the Fc receptor, cells were pre-incubated for 5 min at 4°C with FcR Blocking Reagent, according to the supplier's instructions (Miltenyi Biotec). Staining with purified monoclonal anti-LT-βR (31G4D8) (Biolegend) or polyclonal anti-Podoplanin (PDPN) (FL-162) (Santa Cruz Biotechnology) antibodies was followed by incubation with fluorochrome-conjugated, multiadsorbed f(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin (Ig)G (Jackson ImmunoResearch Laboratories). The cells were fixated with CellFix solution (BD Biosciences) prior to flow cytometry analysis. For the intracellular staining, and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences) and stained with monoclonal SMA (EPR5368) (Millipore), followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), all diluted in Perm/Wash buffer. Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Complutense University, Madrid, Spain).

#### *Real-time quantitative reverse transcription PCR*

RNA isolation was performed using Absolutely RNA Microprep kit (Stratagene), including a DNase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total complementary DNA (cDNA) was synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), according to the supplier's instructions, and then used as target in the PCR amplifications.

Real-time PCR was performed using specific pre-designed TaqMan Gene expression assays for different genes ([Supplementary Table S1](#)), all of them obtained from Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). GNB2L1 was used as endogenous control. All PCR reactions were set in duplicates using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Amplifications, detections and analyses were performed in a 7.900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, Complutense University, Madrid, Spain). The  $\Delta C_t$  method was used for normalization to GNB2L1. Hence, the expression of each target gene was calculated as  $2^{-(C_t\text{GNB2L1} - C_t\text{target gene})}$  and 1 arbitrary unit corresponds to a  $\Delta C_t$  value of -10. Fold-change expression was then

calculated as the ratio between the expression in treated versus intra-individual control cells.

#### *Kynurenine and tryptophan quantification by high pressure liquid chromatography*

Tryptophan and Kynurenine were quantified by reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC). All cell supernatants were deproteinized with trichloroacetic acid treatment before analysis. Kynurenine concentration was measured recording ultraviolet (UV) absorbance at a wavelength of 360 nm using a HPLC-UV-system (Spectra-Physics (SP8800 HPLC pump, SP100 UV absorbance detector and SP4400 computing integrator from Thermo Electron Corporation). Tryptophan emission fluorescence at 366 nm, after excitation at 286, was detected using a HPLC-Fluorescence-Spectra System (P2000 HPLC pump, SCM1000 Vacuum Membrane Solvent Degasser, FL3000 fluorescence detector, Thermo Electron Corporation). In both cases, stationary phase was Spherisorb ODS2 C18 columns 5  $\mu$  (25 mm x 4.6 mm internal diameter) (Waters). The eluent was 5% CH<sub>3</sub>CN in 15 mmol/L acetate buffer, pH 4.00 (Panreac AppliChem) and elution flow was set at 1 mL/min. For quantification, the peak area of each sample injected was compared with standard curves ( $r^2 = 0.99$ ), obtained in parallel, using ChromQuest™ 4.4 software (Thermo).

#### *Statistical analyses*

All values reported in the figures are given as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Mann-Whitney test was used to compare differences. Statistical analysis was performed using Statgraphics Centurion XVI. Values of  $P \leq 0.05$  (\*),  $P \leq 0.01$  (\*\*) or  $P \leq 0.001$  (\*\*\*) were considered to be statistically significant.

## **Results**

### *Human LN and SP-FRCs share basic phenotypic characteristics with murine FRCs*

To analyse the functional characteristics of human FRCs, we established cell cultures from mesenteric LNs and spleen. We characterized LN-FRC cultures from four donors and SP-FRC cultures from six donors that were grown up to eight passages. All the cell cultures derived from the same organ showed similar phenotypic characteristics.

Since the first passage, the adherent cells grew in monolayer and exhibited fibroblastic morphological features that were distinct depending on their origin. LN-FRCs were larger, with a fusiform shape featuring

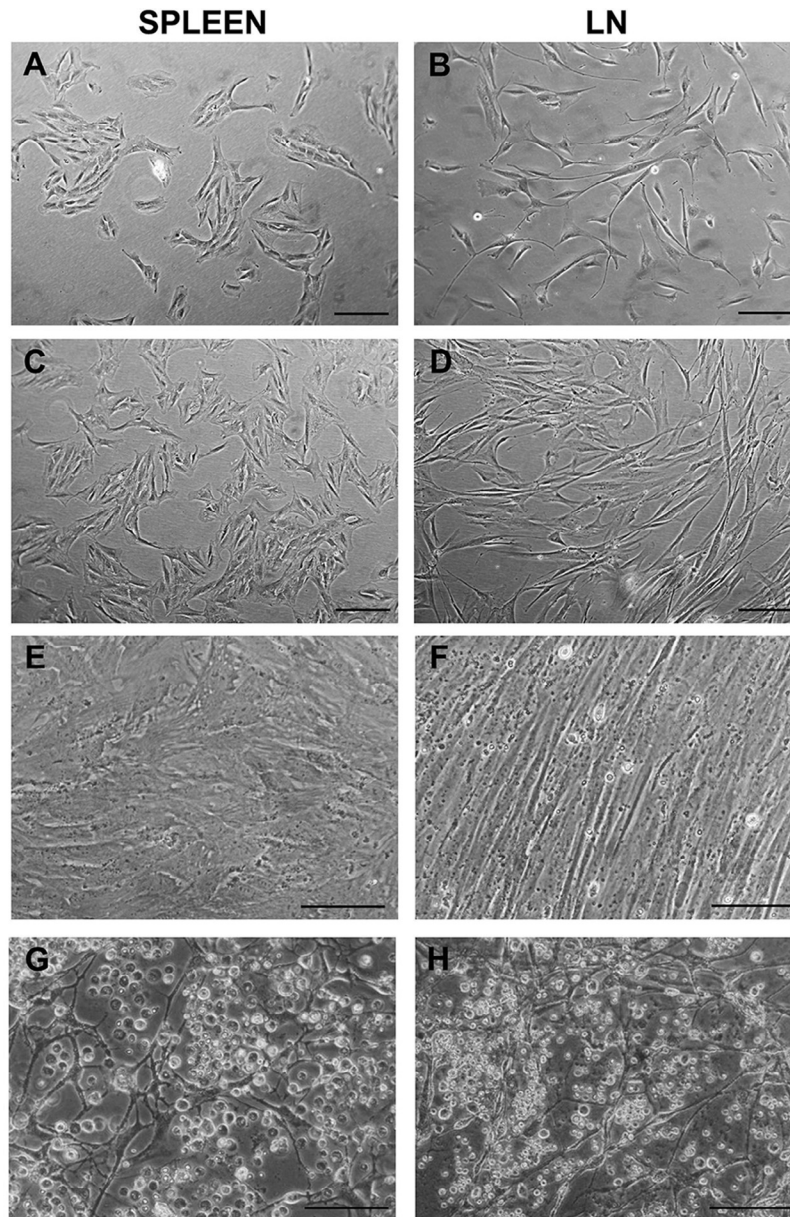


Figure 1. FRCs form a cell network after cell-to-cell interaction with activated T cells. (A–D) Phase-contrast images showing differences in morphological features of SP- (A, C) and LN- (B, D) FRCs maintained under standard cell culture conditions. (E–F) Changes in FRC expansion and organization after 5 days of co-culture with CD3–CD28 activated T cells at a 1:20 FRC:T-cell ratio. Phase-contrast micrographs of SP (E, G) and LN (F, H) FRCs cultured in the absence (E, F) or presence (G, H) of activated T cells. Scale bar is 200  $\mu\text{m}$  in A–D images and 100  $\mu\text{m}$  in E–H images.

long extensions (Figure 1B and D and Supplemental Figure S1), whereas splenic cells grew in groups and were rich in lamellipodia (Figure 1A and C and Supplemental Figure S1). When these cells were co-cultured at low ratios with CD3- to CD28-stimulated T lymphocytes, FRCs restrained their proliferation and did not reach cell confluence, organizing themselves as reticular networks displaying a star-like shape and by intertwining long cell projections (Figure 1E and H). When FRCs and activated T cells were cultured

in transwell plates, separated by a porous membrane, FRCs' morphology and proliferation were barely affected, suggesting the importance of cell-to-cell contact (data not shown).

Flow cytometry characterization showed that, from the third passage, all cell cultures were non-hematopoietic ( $\text{CD45}^-$ ), non-endothelial ( $\text{CD31}^-$  [PECAM1]), myofibroblastic ( $\text{CD90}^+\text{CD29}^+$  vimentin $^+$  smooth muscle  $\alpha$ -actin [SMA] $^+$ ) and podoplanin positive (PDPN $^+$ ) cells (Figure 2A and Supplemental

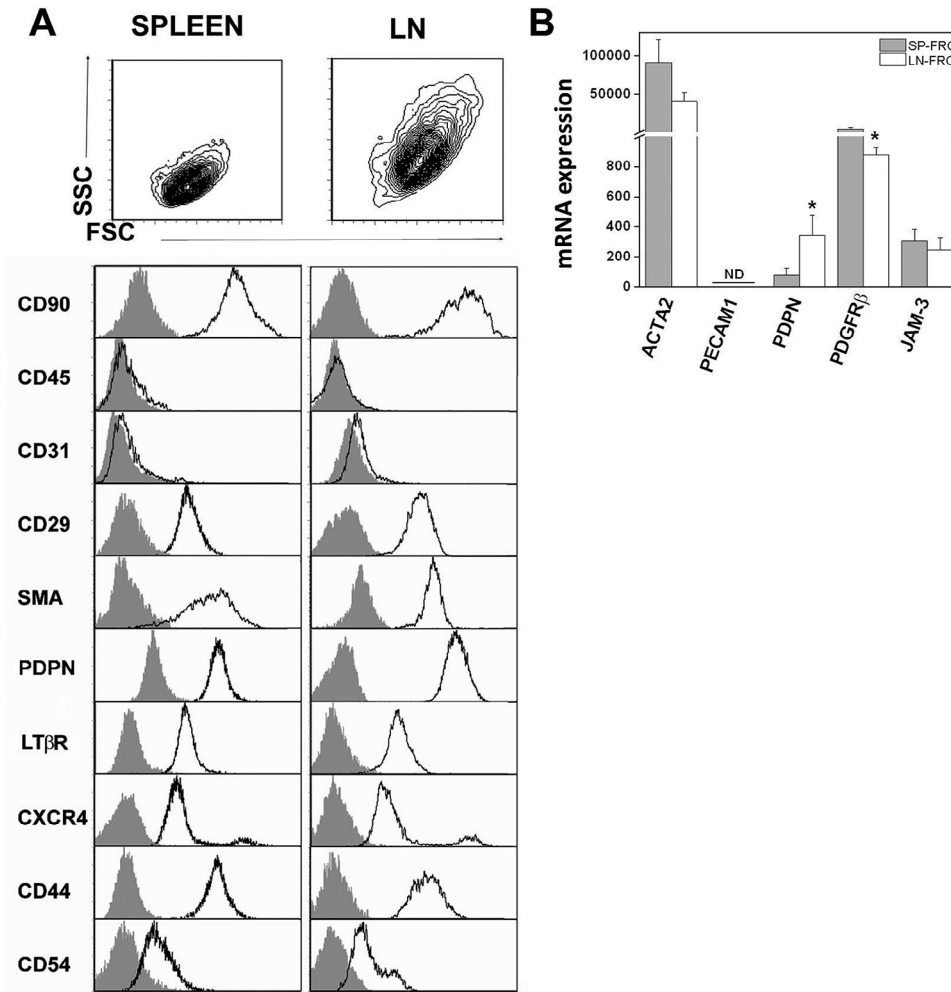


Figure 2. Phenotypic characterization of FRCs. (A) FRCs derived from human spleen (left panels) and LN (right panels) from passage 3–6 were analyzed using flow cytometry. The forward and side light scatter properties (FSC-SSC, upper dot plot) and expression of the indicated molecules (open histograms) are depicted. Gray-filled histograms represent isotype control staining. A representative experiment out of four is shown. (B) Transcripts for ACTA2 (coding for SMA), PECAM1 (coding for CD31), PDNP, PDGFR $\beta$  and JAM-3 were determined using real-time PCR in SP-FRCs (gray bars) and LN-FRCs (white bars). GNB2L1 was used as endogenous control. Bars depict the mean  $\pm$  SEM and represent 3–5 independent experiments run in duplicate from at least three cell cultures from different donors. ND, not detected. \* $P \leq 0.05$  using Mann-Whitney test.

Figure S1). The expression of podoplanin, confirmed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), was detected in higher levels on LN-FRCs (Figure 2B). These features agreed with the specific phenotype described for *ex vivo* isolated FRCs in mice [5,19] and humans [19]. FRCs showed strong expression of CD44, a multifunctional adhesion molecule, and lower levels of CD54 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM1). Lymphotoxin beta receptor (LT $\beta$ R) and CXCR4, implicated in FRC homeostasis [21,22], were also constitutively expressed. Interestingly, we found a small and constant CXCR4<sup>hi</sup> subpopulation in both types of FRCs (Figure 2A). qPCR analysis also demonstrated the expression of the receptor for platelet-derived growth factor (PDGFR $\beta$ ) largely responsible for myofibroblast proliferation [23], and

of junctional adhesion molecule-3 (JAM-3), a member of a family of transmembrane proteins that forms part of tight junctions. Signalling through this adhesion molecule has been recently described to control CXCL12 and CCL21 chemokine secretion in murine FRCs [24] (Figure 2B).

#### *Constitutive expression of immunomodulatory factors in human FRCs*

Further analysis of the transcription profile of FRCs allowed a better knowledge of their functional capabilities (Figure 3). We found transcripts for trophic molecules such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), FMS-like tyrosine kinase

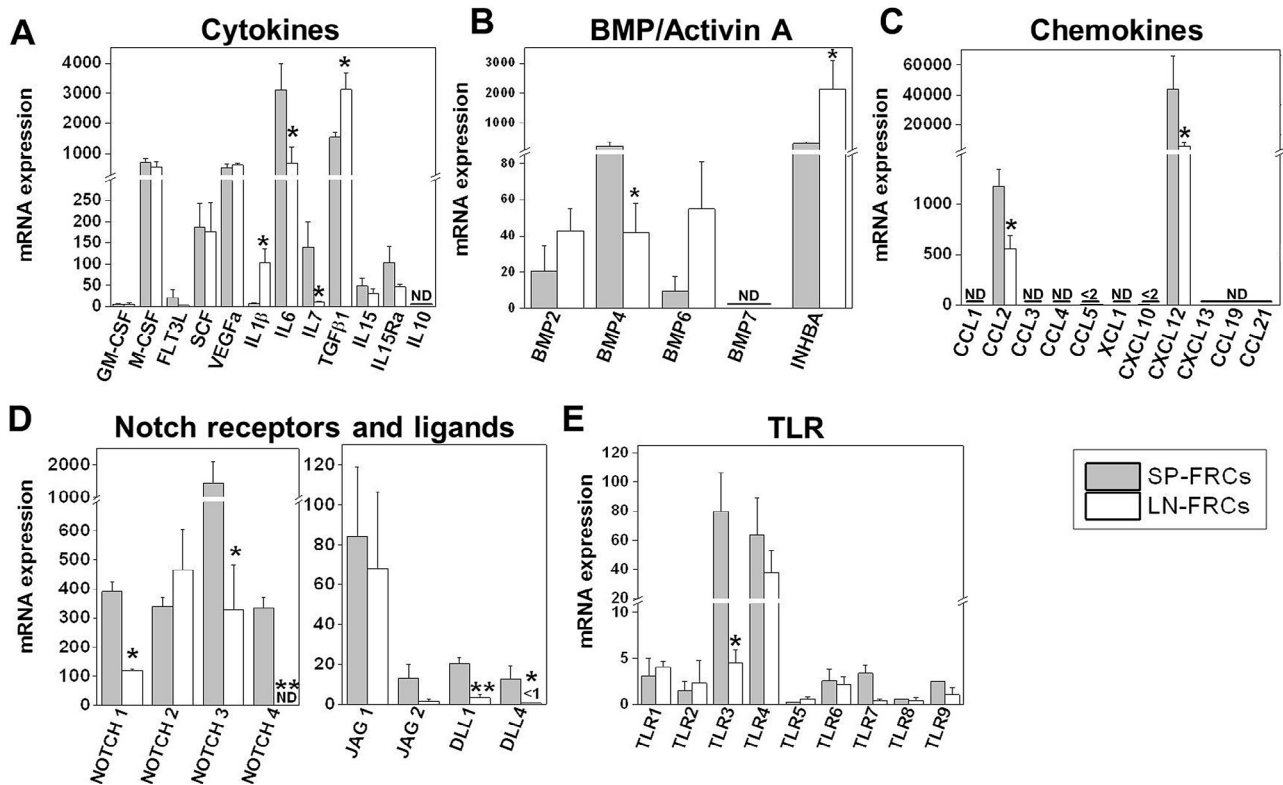


Figure 3. Expression of immunomodulatory molecules in human FRCs. Real-time reverse transcription PCR was performed to analyze the expression of the indicated genes in FRCs derived from spleen (gray bars) and LN (white bars) under basal conditions. (A) Cytokines, (B) BMP ligands and activin A (INHBA), (C) Chemokines, (D) Notch receptors and ligands and (E) Toll-like receptors (TLR) mRNA expression are shown as mean  $\pm$  SEM of 3–5 independent experiments run in duplicate from at least three cell cultures from different donors. GNB2L1 was used as endogenous control. ND, not detected. Low values are indicated. \* $P \leq 0.05$  and \*\* $P \leq 0.01$  using Mann-Whitney test.

3 ligand, stem cell factor, vascular endothelial growth factor A and interleukin (IL)-7 while IL-10 was not expressed. The transcription of both IL-15 and IL-15 receptor alpha (IL15RA) suggests their ability to induce an efficient IL-15-mediated signal as was described in human spleen-derived fibroblastic cells [17]. FRCs produced high levels of transcripts encoding the two important pleiotropic immunomodulatory signals transforming growth factor (TGF) $\beta$  and IL-6, yet SP-FRCs expressed less TGF $\beta$  and more IL-6 than LN-derived cells. *A priori*, they could be considered, respectively, pro-inflammatory and anti-inflammatory signals. However, TGF $\beta$  is a powerful cytodifferentiating factor for myofibroblast [23] and necessary for Th17 polarization [25], whereas IL-6 can also promote the development of immunosuppressive myeloid populations [26]. IL-1 $\beta$  was also detected but at quite lower levels, almost undetectable in SP-FRCs. Other members of the TGF $\beta$  superfamily, BMP2, BMP4, BMP6 and Activin A (INHBA) transcripts, were expressed in FRCs. Of note, splenic cells produce high levels of BMP4, whereas in LN-derived cells Activin A was strongly transcribed (Figure 3B).

Under steady state, FRCs did not expressed the chemokines CCL1, CCL3, CCL4, CCL5, XCL1 and CXCL10 but contained transcripts for CCL2 and CXCL12 (Figure 3C). It is remarkable that SP-FRC expressed two-fold CCL2 and eight times as much CXCL12 than LN-FRCs. We were neither able to detect transcripts for CXCL13, whose expression is restricted to follicular dendritic cells and marginal reticular cells, nor CCL19 and CC21, both associated with T-cell areas. Nonetheless, 48 h of co-culture with T cells was sufficient to induce the transcriptions of CCL19 in LN- and SP-FRCs, whereas CCL21 and CXCL13 remained undetectable (not depicted).

Notch receptors and ligands conform to an ancient cell-to-cell signalling pathway that defines cellular niches in lymphoid tissues regulating immunity [27]. Furthermore, expression of Delta like canonical Notch ligand 1 (DLL1) and Delta like canonical Notch ligand 4 (DLL4) in CCL19 + FRCs is key in the contribution of Notch-mediated signals instructing hematopoietic lineages within the regional compartments of SLOs [28]. This study shows that DLL1-expressing fibroblastic cells drive the differentiation of MZ B cells and MZ Esam + dendritic cells

(DCs) in the spleen while DLL4 is the essential ligand required for the differentiation of follicular helper T cells in the LN [28]. However, our results showed that human FRCs presented a higher transcription of Notch receptors than their ligands (Figure 3D), although this could reflect the higher turnover of Notch receptors as a consequence of  $\gamma$ -secretase activity during signalling. Notch-4 expression was restricted to SP-FRCs, which also showed four-fold more Notch1 and Notch3 transcripts than LN-FRCs. Splenic cells also expressed more Jagged 2, DLL1 and DLL4 ligands than LN-FRCs, although Jagged 1 was, in any case, the most transcribed. These important differences found in the pattern of expression of Notch molecules in LN- and SP-FRCs suggest that they may support functionally different niches and that they would also differ in their response after contacting with Notch-ligand-expressing leukocyte populations.

#### *Pro-inflammatory response of FRCs to innate and adaptive immune signals*

In steady state, FRCs produced transcripts for most Toll-Like Receptors (TLR) (Figure 3E), which qualifies them as sentinels of an innate immune system. TLR4, a sensor of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and cell damage-associated molecular patterns, showed the highest expression in both SP- and LN-FRCs. We also found that the expression of TLR3, which is activated by double-stranded RNA, detecting viral infections, was more than ten-fold higher in splenic cells than in LN-FRCs.

To ascertain whether human FRCs could actually respond to pathogen threat and adapt their characteristics to infection, we analysed the effect of LPS or Poly I:C treatments on the expression of immunomodulatory molecules in FRCs. To compare the responses to innate and adaptive signals, we also included IFN $\gamma$  treatment as a typical cytokine produced by stimulated T cells.

As shown in Figure 4, after 6 h in the presence of these inflammatory stimuli, the changes in the transcription profile of FRCs were noticeable. TLR4 stimulation modified the expression of a wide array of immunomodulatory genes, which would promote the recruitment and stimulation of most leukocyte populations. Although the response was stronger in the splenic cells, both types of FRCs sharply increased the production of CCL2 transcripts and began to express CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL10 in response to LPS (Figure 4A). Moreover, this stimulus drastically induced GM-CSF transcription, and also augmented significantly M-CSF, IL-6, IL-15 and IL-15RA production (Figure 4B).

The response of SP-FRCs via TLR3 was similar to the above described to LPS but unable to induce

the expression of two important factors such are GM-CSF and M-CSF. In contrast, according to the lower expression of TLR3 found in LN-FRCs, Poly I:C treatment merely increased the transcripts for CXCL10 in these cells reducing also the transcription of M-CSF.

IFN $\gamma$  stimulation has a more reduced effect on FRCs than pathogen threats. It exclusively increased the transcription of IL-15, IL-15RA, CCL2 and CXCL10 in SP-FRCs but not in LN-FRCs, which were only induced to overexpress vascular endothelial growth factor A. However, in these cells the amounts of CXCL12 and TGF $\beta$  transcripts were reduced after any of the assayed stimuli.

We further assessed the effect of these inflammatory signals on the expression of cell membrane immunomodulatory molecules. Flow cytometry analysis showed that, under steady state, FRCs hardly expressed the co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86. Furthermore, their levels did not change after 48 h of culture neither in the presence of TLR stimuli nor in response to IFN $\gamma$  (data not shown). Interestingly, the expression of classic HLA class I antigens increased in these conditions and, exclusively LN-FRCs began to express detectable levels of surface HLA class II molecules in response to IFN $\gamma$  (Figure 4C).

#### *FRCs also activate immunosuppressive pathways in response to inflammatory signals*

Duration and strength of T-cell expansion during the acute immune response is finely regulated in SLO by immunosuppressive mechanisms to reach a balance between effectiveness and tissue damage. Among them, Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), which mediates tryptophan (Trp) degradation and the synthesis of its immunomodulatory metabolites [29], and Arginase 1 (ARG1), which metabolizes L-arginine to L-ornithine and urea [30], can both limit the expansion of pathogens and suppress T-cell responses independently of antigen specificity. Our results showed that short-time (6 h) exposure to IFN $\gamma$  induced in human FRCs the expression of transcripts for IDO1 (Figure 5A) but not for IDO2 nor ARG1 (not depicted). We wanted to confirm IDO enzymatic activity by quantification of Trp and Kynurenine metabolites in supernatants using HPLC. We found a sharp reduction on Trp concentration in 48-h IFN $\gamma$ -treated cultures, which evidenced its Trp catabolism in these cultures. IDO activity was further confirmed by a remarkable increase in kynurenine production only in IFN $\gamma$ -treated FRCs (Figure 5B and C).

We next tested using qPCR the expression in FRCs of another two typically inducible enzyme activities, Cyclooxygenase 2 (COX2) and NOS2. COX2, the rate-limiting enzyme for the synthesis of prostanoids,

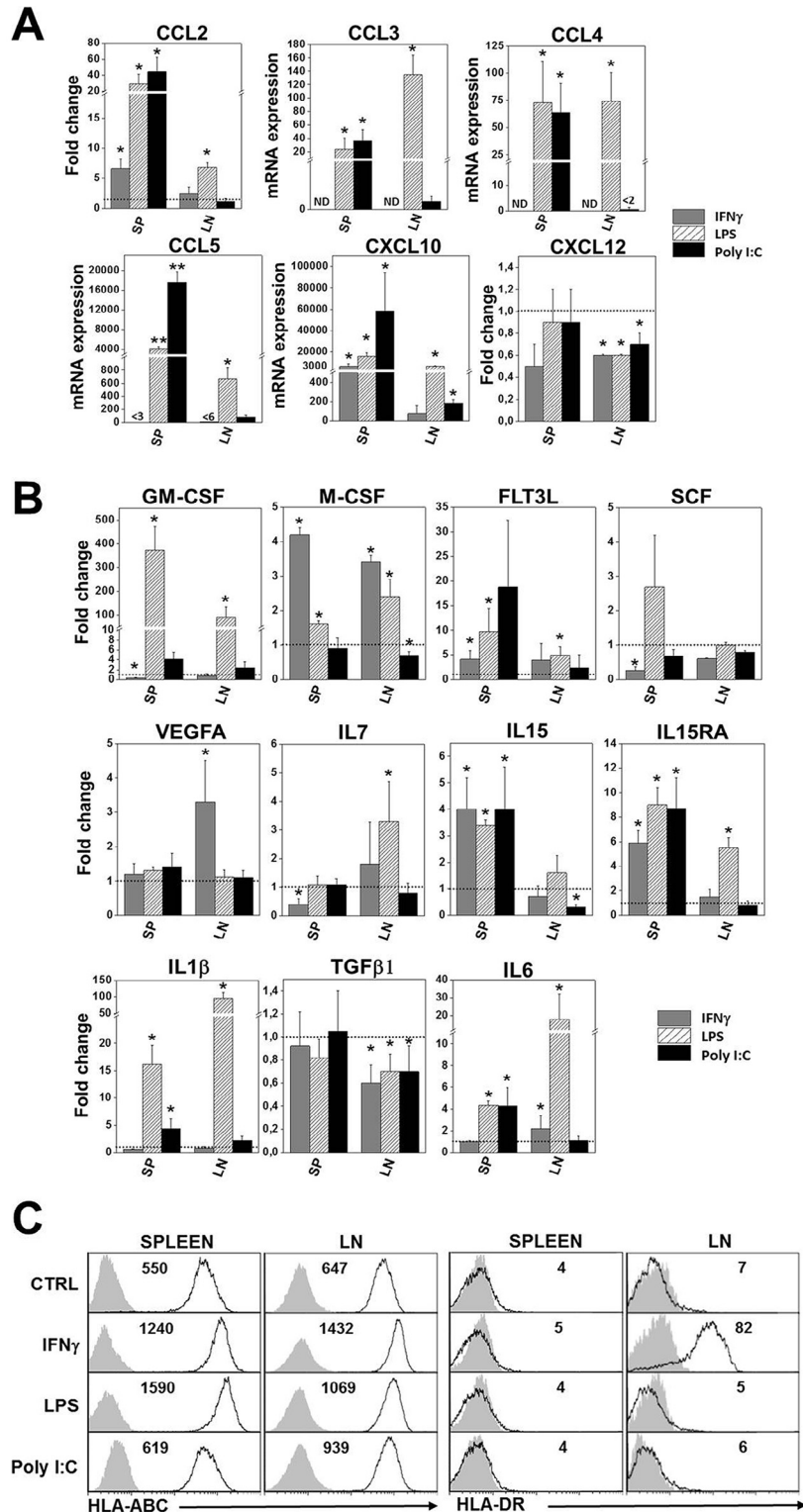


Figure 4. Regulation of immunomodulatory molecules in FRC lines in response to inflammatory signals. Semi-confluent SP- and LN-FRCs were cultured during 6 h in media alone (CTRL) or in the presence of IFN $\gamma$  (10 ng/mL) or LPS (100 ng/mL) or Poly I:C (12.5 mg/mL). The expression of transcripts for cytokines (A) and chemokines (B) was determined using quantitative PCR. Data show the fold-change relative to individual control values (dotted line; set as 1) except for CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL10 that are represented in absolute terms, as arbitrary units, because at least in one experiment, the expression in control cells was undetectable. GNB2L1 was used as endogenous control. Bars represent the mean  $\pm$  SEM of 3–4 independent experiments. ND, not detected. Low values are indicated. \* $P \leq 0.05$  and \*\* $P \leq 0.01$  using Mann-Whitney test. (C) Flow cytometry analysis of the expression of HLA molecules on FRCs cultured during 48 h in the presence of the indicated stimuli (open histograms). The total mean fluorescence intensity (MFI) and background fluorescence (gray filled) are shown in each histogram. Data are representative of three independent experiments performed with three cell cultures from different donors.

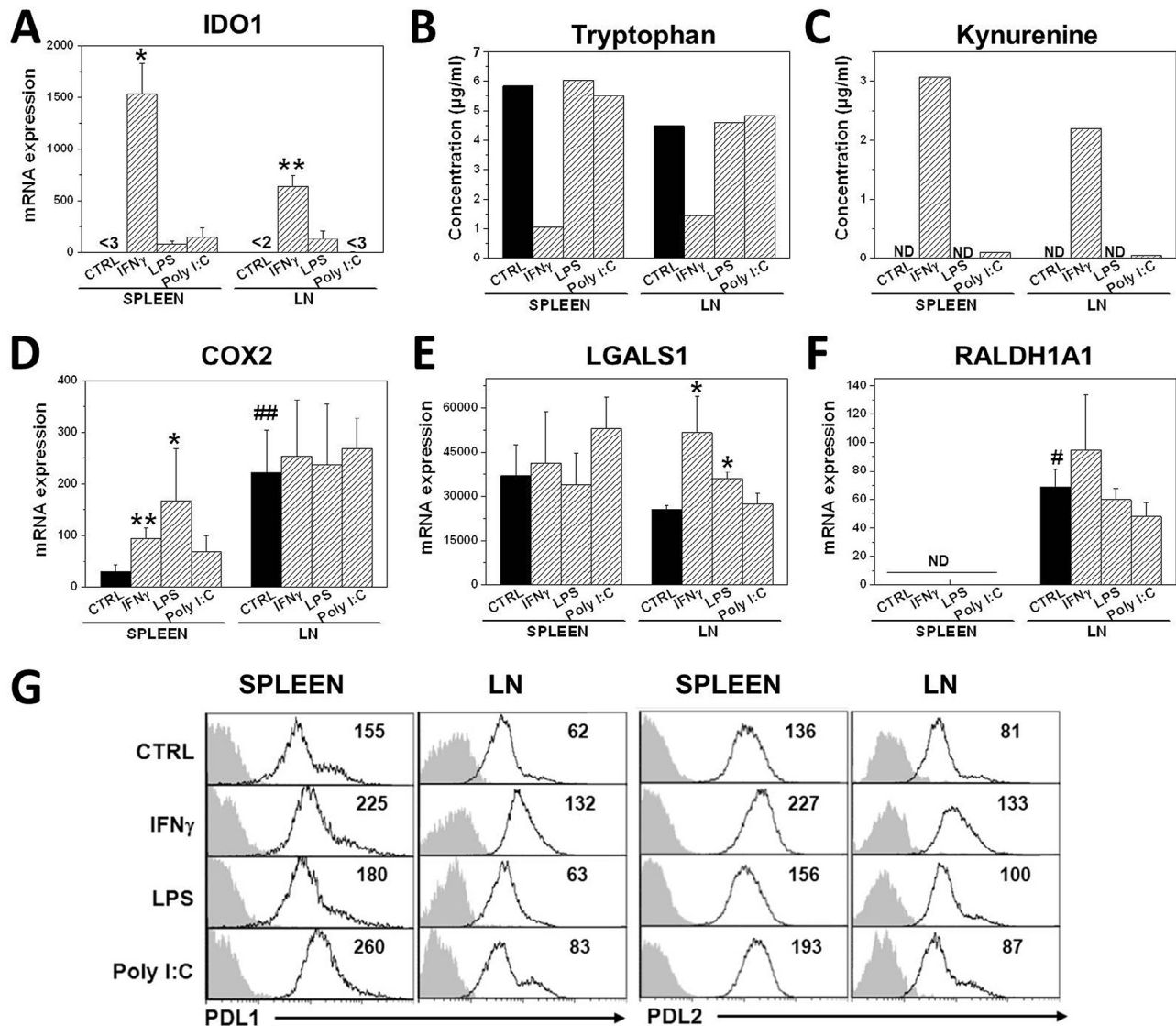


Figure 5. Induction of immunosuppressive mechanisms by inflammatory stimuli in FRCs. Spleen or LN FRCs were cultured in media alone (CTRL) or in the presence of IFN $\gamma$ , LPS or Poly I:C during 6 h (A, D, E and F) or 48 h (B, C and G). (A, D, E and F) The expression of the indicated genes was determined using qPCR. GNB2L1 was used as endogenous control. Mean  $\pm$  SEM of 3–5 independent experiments run in duplicate from at least three cell cultures from different donors are shown. ND, not detected. Low values are indicated. ## $P \leq 0.01$ , significance of LN-FRCs to SP-FRCs under control conditions; \* $P \leq 0.05$  and \*\* $P \leq 0.01$ , significance of stimulated to CTRL cells (both using Mann-Whitney test). (B and C) The concentrations of tryptophan (B) and kynurenine (C) in cell-free and protein-depleted culture supernatants were quantified using HPLC. Data represent one of two independent experiments with similar results. ND, not detected. (G) Expression of PDL1 and PDL2 (open histograms) was determined using flow cytometry. The total MIF and the background staining (gray histograms) are shown in each histogram. Data are representative of three independent experiments.

was constitutively expressed in human FRCs. LN-FRCs produced twice as many transcripts as splenic cells but only SP-FRCs increased its transcription, after stimulation with IFN $\gamma$  or LPS (Figure 5D). In mice, the inhibitory effect exerted by FRCs on T cells is mediated by NO production [5,6,8]. In contrast, human FRCs did not express NOS2 in response to any of the stimuli assayed even after 48 h of culture (not depicted). Neither the synergistic action of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  nor the direct contact with activated T cells were able to induce either the transcription of

NOS2 or detection of NO in culture supernatants (not depicted).

Among the plethora of immunosuppressive signals, soluble Galectin-1 (LGALS1) affects a wide variety of cells by diverse mechanisms, reversing the clinical symptoms of autoimmune and chronic inflammation in mice [31]. We found that FRCs constitutively expressed this galectin and that its expression was up-regulated in LN-derived cells in response to IFN $\gamma$  or LPS, but remained yet in levels similar to those found in SP-FRCs (Figure 5E). Of note, we also

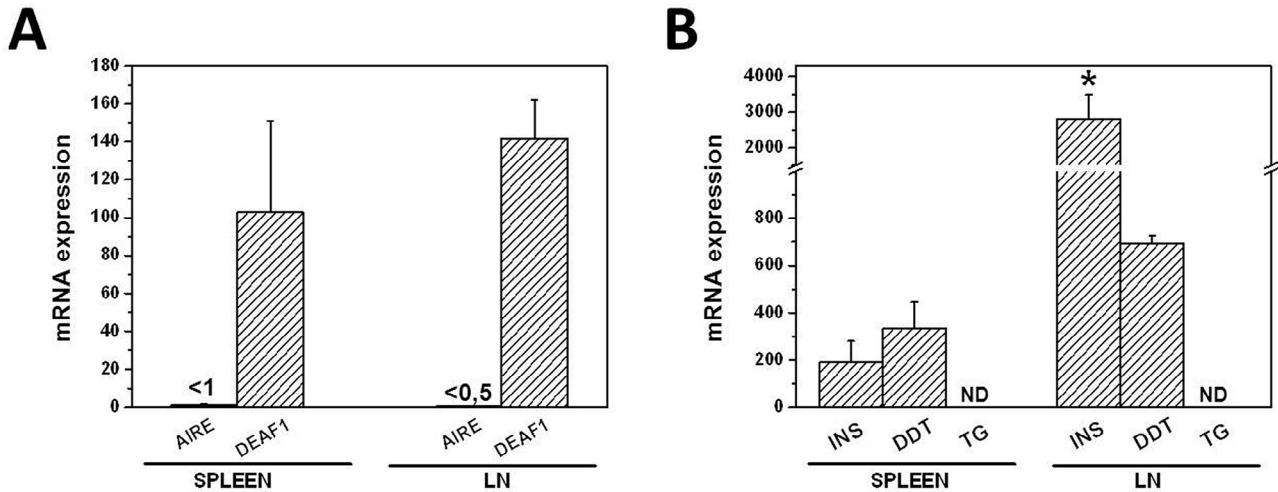


Figure 6. Human FRCs express DEAF1 and relevant PTA. mRNA expression of (A) AIRE and DEAF1 and (B) INS, DDT and TG antigen were measured using quantitative PCR in cultured SP- and LN-FRCs. GNB2L1 was used as endogenous control. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments from at least three cell cultures from different donors. ND, not detected. Low values are indicated. \* $P \leq 0.05$  using Mann-Whitney test.

tested the ability of human FRCs to produce the immunosuppressor cytokine IL-10 but found that none of the stimuli used in this study was able to induce its expression.

Retinoic acid (RA) is synthesized by certain immune populations, linking environmental cues to immune response and cell fate [32]. The role of this vitamin A metabolite is of special relevance in the intestine where it is crucial to generate gut-homing T cells [33], influencing also in the balance between effector and regulatory T-cell differentiation [34]. The tissue-restricted production of RA is mediated by the expression of cell-specific retinaldehyde dehydrogenases (RALDHs) [32], demonstrated in the stroma of mesenteric LNs but absent in skin draining LNs in mice [33]. Interestingly only FRCs derived from mesenteric LNs constitutively expressed retinaldehyde dehydrogenase 1 that remains invariant in response to inflammatory stimuli (Figure 5F). This suggests that these cells maintain their specific organ identity. Future experiments would help in determining their efficiency to direct the expression of CCR9 and  $\alpha 4\beta 7$  integrin on stimulated T cells.

Flow cytometry analyses demonstrated that FRCs expressed Programmed Death 1 (PD-1) ligands, PD-L1 and PD-L2, which can function as potent co-inhibitory signals on T cells [35]. SP-FRCs presented on their membrane higher levels of PD-1 ligands than LN-FRCs and only IFN $\gamma$  and Poly I:C promoted its increase (Figure 5G). In addition, whereas they remained lower in LN-FRCs after stimulation via TLR, again IFN $\gamma$  was more effective at inducing the expression of inhibitory signals.

#### Human FRCs express deformed epidermal autoregulatory factor 1 and peripheral tissue-restricted antigens

Thymic stroma drives the deletion of a great proportion of autoreactive T cells and controls the differentiation of natural regulatory T cells. However, peripheral selection of autoreactive clones that escape intrathymic selection is essential for tolerance to peripheral tissue-restricted antigens (PTA) [36]. This mission is achieved in murine LN, where FRCs express deformed epidermal autoregulatory factor 1 (Deaf1) [4,37]. This Aire-like transcription factor mediates the ectopic expression of PTAs that are relevant in autoimmunity. FRCs are able to present PTAs to CD8<sup>+</sup>T lymphocytes directly deleting self-reactive clones [3,4]. Our results demonstrated that, as in mice, human FRCs expressed DEAF-1, whereas AIRE was at the limits of detection (Figure 6A). We also detected relevant levels of transcripts encoding for insulin (INS), higher in LN-FRCs, and the product of differentiated melanocytes, D-dopachrome tautomerase (DDT) enzyme. On the contrary, thyroglobulin (TG), considered a prototype of hidden self-antigen but expressed in the human thymus [38], was absent in FRCs (Figure 6B).

#### Discussion

The analysis of FRCs derived from human spleen and mesenteric LN reveals that these cell populations present similar, but not identical, phenotypic and immunomodulatory features to those described in animal models. However, although FRCs are maintained *in vitro*, without the influence of organ-specific

cues, FRCs derived from spleen and LN show distinct morphological and phenotypic features suggesting that specific epigenetic information would largely sustain their lineage identity. Nonetheless, our results confirm the requirement of a signaling interplay between FRCs and their cellular environment for their terminal differentiation and functional specialization. Thus, human FRCs lack CCL19 and CCL21 expression but they restart the transcription of the former after co-culture with T cells. Immortalized murine FRCs also lose the capacity to secrete these chemokines [39,40] and *in vivo* experiments demonstrate that T-cell area FRCs require LT $\beta$ R signaling for CCL19 expression while fluid flow is the unique requisite for CCL21 transcription [41]. Consequently, although we can tentatively propose that FRCs belong to a particular subpopulation, they probably may present a functional plasticity regulated by the cross-talk with other leukocytes or stromal cell populations.

Remarkable is the dramatic change in FRC morphology observed after the contact with stimulated T cells, organizing themselves in an open reticulum that reminds the network found *in vivo* in SLO. The culture of murine FRCs in matrix gels favors their spreading and the extension of protrusions, with PDPN as a critical regulator of the FRC cytoskeleton. There is no known PDPN ligand expressed on T lymphocytes but these cells, particularly activated T cells, express the membrane anchored lymphotoxin heterotrimer [42,43] that is required for the terminal differentiation of FRCs. Indeed, Katakai *et al.* [40] showed that simultaneous stimulation through tumor necrosis factor receptor (TNFR) and LT $\beta$ R was enough to induce the organization of a network by murine FRC lines.

Spleen protects the body against blood-borne pathogens. Splenectomized patients are more prone to develop sepsis, pneumonia and meningitis [44], but splenectomy might also dampen systemic inflammation after trauma [45]. The functional characteristics of human SP-FRCs indicate that they take a relevant part of this immune sentinel role. They are more disposed to respond to pathogen threats than LN-FRCs, and their pro-inflammatory responses to LPS or Poly I:C are more robust. However, the mesenteric origin of LN-FRCs could explain part of the differences observed, associated with gut immunity. In mice, FRCs from mesenteric LN show lower expression of several cytokines, including IL-6 and IL-7, than those from skin draining LNs [1,19], whereas among the short list of genes up-regulated stand out those involved in the RA metabolism or those up-regulated by RA [19]. In consonance, human mesenteric LN-FRCs express retinaldehyde dehydrogenase 1 enzyme, which is indicative of the capacity

to synthesize RA. Probably also in agreement with their mesenteric origin, the autoantigen INS was up-regulated, although the expression of DEAF1 was similar to SP-FRCs. The clinical relevance of PTA expression in SLO was recently demonstrated [37]. Pancreatic LNs from type 1 diabetic patients lack INS expression, which correlates with the up-regulation of a dysfunctional isoform of DEAF-1.

BMP4 and Activin A, members of TGF $\beta$  superfamily, are also differentially expressed in SP- and LN-FRCs. Both molecules have an immunomodulatory role, and DCs [46,47] and T lymphocytes [20,48–50] are among their target cells. Activin A, expressed at higher levels in LN-FRCs, has different effects depending on the cellular and cytokine context. It drives follicular helper T-cell differentiation [48] and synergizes with TGF $\beta$ 1 favoring Th17 polarization [50] or the induction of peripheral regulatory T cells [49]. On the other hand, BMP4, expressed at important levels in SP-FRCs, is implicated in the homeostasis of naïve T cells [20], and its expression is up-regulated in the murine spleen during acute anemia promoting the expansion of a particular population of resident stress erythroid progenitors [51]. Supporting a role for FRCs in this process, hypoxia induces BMP4 expression in murine splenic fibroblastic stromal cells [52]. Although this issue has not been reported in humans yet, the expression of BMP4, CXCL12 and stem cell factor by SP-FRCs points to a possible role for human FRCs regulating splenic extramedullary hematopoiesis.

Myeloid populations in LN and spleen are essentially different. Splenic stroma must provide particular niches that control their homeostasis. SP-FRCs express constitutively M-CSF, a survival and differentiation factor for monocytes and macrophages and two-fold as much CCL2 as LN-FRCs, an important chemokine for monocyte recruitment. Spleen hosts a reservoir of bona fide monocytes in the red pulp that outnumber their equivalents in circulation that are mobilized to the bloodstream after acute injury and a fraction of these egressed monocytes contributes to wound healing [53]. However, paradoxically CCR2<sup>-/-</sup> mice have normal numbers of monocytes in the spleen [53]. Instead, the increment of CCL2 production in the spleen of tumor-bearing mice is necessary for the accumulation of myeloid cells in the MZ where cross-present tumor Ag and tolerize CD8<sup>+</sup> T lymphocytes [54]. Trauma [55] and sepsis [56] also trigger the accumulation of this immunosuppressive population in mouse spleen. Furthermore, from the spleen also egress myeloid cells that contribute to the tumor-associated macrophage (TAM) population [57]. Interestingly, SP-FRCs respond to stimulation via TLR4, increasing drastically the transcription, among others, of CCL2, CCL5, CXCL10, GM-CSF, M-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-15/IL-15Ra without reducing

TGF $\beta$  or LGALS1, while increasing concomitantly COX2 transcription. Together, this would result in a signaling milieu that may promote the recruitment of monocytes and myeloid progenitors that could differentiate in the spleen in this new context. Future experiments with FRCs would help in a better understanding of how cancer and inflammation can promote the production of tolerogenic myeloid populations in the spleen.

After IFN $\gamma$  stimulation, IDO1 activity is strongly up-regulated in human FRCs and consequently tryptophan availability decreases, which would hamper the proliferation of cancer cells. However, immune function is also sensitive to Trp scarcity and Trp metabolites, favoring tolerance [29]. Under normal circumstances, IDO activity should only occur in FRCs when T-cell activation has been achieved, and then it would attempt to control the immune responses. In humans, IDO1 expression is also found in cancer cells and cancer-associated stromal cells, however, tumor-draining LNs do not seem to differ in the number or the nature of IDO1-expressing cells [58], suggesting that cancer cells do not induce the expression of IDO1 in FRCs.

NO release is the main mechanism exerted by murine FRCs to suppress T-cell responses [5,6,8]. Moreover, in a model of sepsis, the pro-survival effect of FRC therapy is completely dependent on their NOS2 expression [15], suggesting a pleiotropic role for released NO. In contrast, our results indicate that human FRCs do not up-regulate NOS2 transcription, and IDO1 appears to be the most important enzymatic pathway induced after IFN $\gamma$  stimulation. The equivalent difference between human and mouse is observed in MSCs. Hence, IDO activity mediates the suppressive effect exerted by human MSCs on T cells, whereas the mediator of mouse MSCs is NO [59]. COX2 expression is also detected in FRCs but, in contrast to MSCs [60], it is not considerably up-regulated after inflammatory stimulation. So human and murine FRCs would regulate T-cell responses using different mechanisms than murine or human MSCs, which suggests particular qualitative functional outcomes.

This report illustrates human FRCs as important potential players integrating innate and adaptive immune responses and balancing tolerance and immunogenicity. Phenotypically, FRCs are a committed cell lineage with no differentiating potential and then they cannot directly contribute to tissue repair-producing new resident cells as MSCs do. However, their transcription profile points to a strong capacity of human FRCs to act as immunomodulators but using mechanisms that may differ from mice. Henceforward, FRC cultures will be valuable cellular models to increase our knowledge about human SLO

microenvironments in health and disease. Also, the feasibility of obtaining FRCs without a complex protocol opens the possibility of using autologous FRCs as a therapeutic tool such as MSCs or as feeder cells to produce *in vitro* therapeutic leukocytes.

### Acknowledgments

This work was supported by grants SAF2015-66986-R (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness) and RD12/0019/0007 (Institute of Health Carlos III, Spain). The authors would like to thank Manuel González Romero and the rest of the Transplant Coordination Unit team (Hospital Clínico San Carlos) for their collaboration in samples collection and María Dolores Blanco Gaitán (Department of Biochemistry and Molecular Biology III, Faculty of Medicine, UCM) for her collaboration in the HPLC work.

**Disclosure of interests:** The authors indicate no potential conflicts of interest.

### References

- [1] Malhotra D, Fletcher AL, Astarita J, Lukacs-Kornek V, Tayalia P, Gonzalez SF, et al. Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol* 2012;13(5):499–510.
- [2] Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, Gonzalez SF, Verschoor A, Mebius RE, et al. Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity* 2009;30(2):264–76.
- [3] Lee JW, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura AR, et al. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol* 2007;8(2):181–90.
- [4] Fletcher AL, Lukacs-Kornek V, Reynoso ED, Pinner SE, Bellemare-Pelletier A, Curry MS, et al. Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J Exp Med* 2010;207(4):689–97.
- [5] Khan O, Headley M, Gerard A, Wei W, Liu L, Krummel MF. Regulation of T cell priming by lymphoid stroma. *PLoS ONE* 2011;6(11):e26138.
- [6] Siegert S, Huang HY, Yang CY, Scarpellino L, Carrie L, Essex S, et al. Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide. *PLoS ONE* 2011;6(11):e27618.
- [7] Abe J, Shichino S, Ueha S, Hashimoto S, Tomura M, Inagaki Y, et al. Lymph node stromal cells negatively regulate antigen-specific CD4+ T cell responses. *J Immunol* 2014;193(4):1636–44.
- [8] Lukacs-Kornek V, Malhotra D, Fletcher AL, Acton SE, Elpek KG, Tayalia P, et al. Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat Immunol* 2011;12(11):1096–104.
- [9] Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, et al. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* 2007;8(11):1255–65.
- [10] Mionnet C, Mondor I, Jorquera A, Loosveld M, Maurizio J, Arcangeli ML, et al. Identification of a new stromal cell type

- involved in the regulation of inflamed B cell follicles. *PLoS Biol* 2013;11(10):e1001672.
- [11] Wang X, Cho B, Suzuki K, Xu Y, Green JA, An J, et al. Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J Exp Med* 2011;208(12):2497–510.
- [12] Cremasco V, Woodruff MC, Onder L, Cupovic J, Nieves-Bonilla JM, Schildberg FA, et al. B cell homeostasis and follicle confines are governed by fibroblastic reticular cells. *Nat Immunol* 2014;15(10):973–81.
- [13] Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, et al. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 2006;25(6):989–1001.
- [14] Bajenoff M, Glaichenhaus N, Germain RN. Fibroblastic reticular cells guide T lymphocyte entry into and migration within the splenic T cell zone. *J Immunol* 2008;181(6):3947–54.
- [15] Fletcher AL, Elman JS, Astarita J, Murray R, Saeidi N, D’Rozario J, et al. Lymph node fibroblastic reticular cell transplants show robust therapeutic efficacy in high-mortality murine sepsis. *Sci Transl Med* 2014;6(249):249ra109.
- [16] Briard D, Azzarone B, Brouty-Boye D. Importance of stromal determinants in the generation of dendritic and natural killer cells in the human spleen. *Clin Exp Immunol* 2005;140(2):265–73.
- [17] Briard D, Brouty-Boye D, Azzarone B, Jasmin C. Fibroblasts from human spleen regulate NK cell differentiation from blood CD34(+) progenitors via cell surface IL-15. *J Immunol* 2002;168(9):4326–32.
- [18] Ame-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, Caulet-Maugendre S, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* 2007;109(2):693–702.
- [19] Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, Lukacs-Kornek V, Bellemare-Pelletier A, Curry M, et al. Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Front Immunol* 2011;2:35.
- [20] Martinez VG, Sacedon R, Hidalgo L, Valencia J, Fernandez-Sevilla LM, Hernandez-Lopez C, et al. The BMP pathway participates in human naive CD4+ T cell activation and homeostasis. *PLoS ONE* 2015;10(6):e0131453.
- [21] Chai Q, Onder L, Scandella E, Gil-Cruz C, Perez-Shibayama C, Cupovic J, et al. Maturation of lymph node fibroblastic reticular cells from myofibroblastic precursors is critical for antiviral immunity. *Immunity* 2013;38(5):1013–24.
- [22] Gil-Ortega M, Garidou L, Barreau C, Maumus M, Breasson L, Tavernier G, et al. Native adipose stromal cells egress from adipose tissue *in vivo*: evidence during lymph node activation. *Stem Cells* 2013;31(7):1309–20.
- [23] Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmouliere A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(6):1145–57.
- [24] Frontera V, Arcangeli ML, Zimmerli C, Bardin F, Obrados E, Audebert S, et al. Cutting edge: JAM-C controls homeostatic chemokine secretion in lymph node fibroblastic reticular cells expressing thrombospondin. *J Immunol* 2011;187(2):603–7.
- [25] Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 2010;140(6):845–58.
- [26] Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 2010;185(4):2273–84.
- [27] Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol* 2013;13(6):427–37.
- [28] Fasnacht N, Huang HY, Koch U, Favre S, Auderset F, Chai Q, et al. Specific fibroblastic niches in secondary lymphoid organs orchestrate distinct Notch-regulated immune responses. *J Exp Med* 2014;211(11):2265–79.
- [29] Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol* 2013;34(3):137–43.
- [30] Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol* 2014;5:532.
- [31] Rabinovich GA, Toscano MA. Turning ‘sweet’ on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009;9(5):338–52.
- [32] Larange A, Cheroutre H. Retinoic acid and retinoic acid receptors as pleiotropic modulators of the immune system. *Annu Rev Immunol* 2016;34:369–94.
- [33] Hammerschmidt SI, Ahrendt M, Bode U, Wahl B, Kremmer E, Forster R, et al. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells *in vivo*. *J Exp Med* 2008;205(11):2483–90.
- [34] Liu ZM, Wang KP, Ma J, Guo Zheng S. The role of all-trans retinoic acid in the biology of Foxp3+ regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 2015;12(5):553–7.
- [35] Giancchetti E, Delfino DV, Fierabracci A. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2013;12(11):1091–100.
- [36] Fletcher AL, Malhotra D, Turley SJ. Lymph node stroma broaden the peripheral tolerance paradigm. *Trends Immunol* 2011;32(1):12–18.
- [37] Yip L, Su L, Sheng D, Chang P, Atkinson M, Czesak M, et al. Deaf1 isoforms control the expression of genes encoding peripheral tissue antigens in the pancreatic lymph nodes during type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2009;10(9):1026–33.
- [38] Spitzweg C, Joba W, Heufelder AE. Expression of thyroid-related genes in human thymus. *Thyroid* 1999;9(2):133–41.
- [39] Acton SE, Astarita JL, Malhotra D, Lukacs-Kornek V, Franz B, Hess PR, et al. Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity* 2012;37(2):276–89.
- [40] Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, Shimizu A. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med* 2004;200(6):783–95.
- [41] Tomei AA, Siegert S, Britschgi MR, Luther SA, Swartz MA. Fluid flow regulates stromal cell organization and CCL21 expression in a tissue-engineered lymph node microenvironment. *J Immunol* 2009;183(7):4273–83.
- [42] Ware CF, Crowe PD, Grayson MH, Androlewicz MJ, Browning JL. Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J Immunol* 1992;149(12):3881–8.
- [43] Browning JL, Sizing ID, Lawton P, Bourdon PR, Rennert PD, Majeau GR, et al. Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J Immunol* 1997;159(7):3288–98.
- [44] Kristinsson SY, Gridley G, Hoover RN, Check D, Landgren O. Long-term risks after splenectomy among 8,149 cancer-free American veterans: a cohort study with up to 27 years follow-up. *Haematologica* 2014;99(2):392–8.
- [45] Crandall M, Shapiro MB, West MA. Does splenectomy protect against immune-mediated complications in blunt trauma patients? *Mol Med* 2009;15(7–8):263–7.

- [46] Shurin MR, Ma Y, Keskinov AA, Zhao R, Lokshin A, Agassandian M, et al. BAFF and APRIL from Activin A-treated dendritic cells upregulate the antitumor efficacy of dendritic cells *in vivo*. *Cancer Res* 2016;76(17):4959–69.
- [47] Martinez VG, Hidalgo L, Valencia J, Hernandez-Lopez C, Entrena A, del Amo BG, et al. Autocrine activation of canonical BMP signaling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2014;44(4):1031–8.
- [48] Locci M, Wu JE, Arumemi F, Mikulski Z, Dahlberg C, Miller AT, et al. Activin A programs the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol* 2016;17(8):976–84.
- [49] Huber S, Stahl FR, Schrader J, Luth S, Presser K, Carambia A, et al. Activin A promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells. *J Immunol* 2009;182(8):4633–40.
- [50] Kang JO, Lee JB, Chang J. Cholera toxin promotes Th17 cell differentiation by modulating expression of polarizing cytokines and the antigen-presenting potential of dendritic cells. *PLoS ONE* 2016;11(6):e0157015.
- [51] Lenox LE, Perry JM, Paulson RF. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood* 2005;105(7):2741–8.
- [52] Wu DC, Paulson RF. Hypoxia regulates BMP4 expression in the murine spleen during the recovery from acute anemia. *PLoS ONE* 2010;5(6):e11303.
- [53] Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009;325(5940):612–16.
- [54] Ugel S, Peranzoni E, Desantis G, Chioda M, Walter S, Weinschenk T, et al. Immune tolerance to tumor antigens occurs in a specialized environment of the spleen. *Cell Rep* 2012;2(3):628–39.
- [55] Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, Perez LA, Ochoa JB. CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *J Immunol* 2006;176(4):2085–94.
- [56] Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)/CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med* 2007;204(6):1463–74.
- [57] Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(7):2491–6.
- [58] Theate I, van Baren N, Pilotte L, Moulin P, Larrieu P, Renaud JC, et al. Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. *Cancer Immunol Res* 2015;3(2):161–72.
- [59] Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'Huillie A, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 2009;27(8):1954–62.
- [60] Najjar M, Raicevic G, Boufker HI, Fayyad Kazan H, De Bruyn C, Meuleman N, et al. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: combined comparison of adipose tissue, Wharton's jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol* 2010;264(2):171–9.

#### Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.jcyt.2017.01.010.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Blockade of bone morphogenetic protein signaling potentiates the pro-inflammatory phenotype induced by interleukin-17 and tumor necrosis factor- $\alpha$ combination in rheumatoid synoviocytes

Alberto Varas<sup>1\*</sup>, Jaris Valencia<sup>1</sup>, Fabien Lavocat<sup>2</sup>, Víctor G. Martínez<sup>1</sup>, Ndiémé Ndongo Thiam<sup>2</sup>, Laura Hidalgo<sup>1</sup>, Lidia M. Fernández-Sevilla<sup>1</sup>, Rosa Sacedón<sup>1</sup>, Angeles Vicente<sup>1</sup> and Pierre Miossec<sup>2\*</sup>

## Abstract

**Introduction:** Bone morphogenetic proteins (BMPs) are multifunctional secreted growth factors regulating a broad spectrum of functions in numerous systems. An increased expression and production of specific BMPs have been described in the rheumatoid arthritis (RA) synovium. The aim of this study was to analyze the involvement of the BMP signaling pathway in RA synoviocytes in response to interleukin-17 (IL-17) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

**Methods:** The expression of components of the BMP signaling pathway (BMP receptors, BMP ligands, BMP signal transducers, and BMP antagonists) was analyzed by quantitative polymerase chain reaction before and after treatment of RA synoviocytes with TNF- $\alpha$  or IL-17 or both. Regulation was studied in the presence of the specific BMP inhibitor DMH1 (dorsomorphin homologue 1) or an exogenous BMP ligand, BMP6. Expression and production of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), chemokines (IL-8, CCL2, CCL5, and CXCL10), and matrix metalloproteinases (MMP-1, -2, -3, -9, and -13) were analyzed.

**Results:** RA synoviocytes express BMP receptors (mainly BMPRIA, ACTRIA, and BMPRII), signal transducers of the Smad family (Smad1 and 5 and co-Smad4), and different BMP antagonists. The modulation of the expression of the BMP target genes—Id (inhibitor of DNA-binding/differentiation) proteins and Runx (Runt-related transcription factor) transcription factors—after the addition of exogenous BMP shows that the BMP signaling pathway is active. RA synoviocytes also express BMP ligands (BMP2, BMP6, and BMP7) which are highly upregulated after activation with TNF- $\alpha$  and IL-17. Autocrine BMP signaling pathway can be blocked by treatment with the inhibitor DMH1, leading to an increase in the upregulated expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines, and MMPs induced by the activation of RA synoviocytes with TNF- $\alpha$  and IL-17. Conversely, the additional stimulation of the BMP pathway with the exogenous addition of the BMP6 ligand decreases the expression of those pro-inflammatory and pro-destructive factors.

**Conclusion:** The results indicate that the canonical BMP pathway is functionally active in human RA synoviocytes and that the inhibition of autocrine BMP signaling exacerbates the pro-inflammatory phenotype induced in RA synoviocytes by the stimulation with IL-17 and TNF- $\alpha$ .

\* Correspondence: avaras@ucm.es; pierre.miossec@univ-lyon1.fr

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain

<sup>2</sup>Immunogenomics and Inflammation Research Unit and Department of Clinical Immunology and Rheumatology, Hospices Civils de Lyon, EA 4130 University of Lyon 1, Hôpital Edouard Herriot, Lyon 69437, France

## Introduction

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are secreted signaling proteins which form a subgroup of the transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) superfamily [1]. BMPs are dimeric proteins which, once secreted, bind to type I and type II BMP receptors constituting multimeric receptor-ligand complexes. Type II receptors are constitutively active serine/threonine kinases which trans-phosphorylate type I receptors upon ligand binding; subsequently, activated type I receptors phosphorylate and activate some components of the Smad protein family, Smad1, 5, and 8, called BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads) [1–3]. The common mediator Smad4 next binds to BR-Smads, and the heteromeric complexes translocate to the nucleus to regulate the transcription of BMP target genes, including Id (inhibitor of DNA-binding/differentiation) proteins and Runx (Runt-related transcription factor) transcription factors [1, 2]. In addition to this canonical signaling pathway, activated BMP receptors may initiate non-canonical Smad-independent signaling pathways [1].

BMPs were originally identified as growth and differentiation factors for osteogenic cells but now are considered multifunctional proteins implicated in the development of virtually all organs and the renewal and maintenance of different adult tissues [1, 4–6]. The relevance of this pathway is further emphasized by the fact that an aberrant BMP signaling can result in several developmental defects and distinct human disorders, including cancer, chronic kidney diseases, endocrine alterations, vascular diseases, and joint and musculoskeletal disorders [7–10]. Rheumatoid arthritis (RA) is the most common form of chronic inflammatory arthritis characterized by persistent synovial inflammation, articular damage, and altered immune response [11]. Several BMP ligands, including BMP2, BMP6, and BMP7, have been shown to be upregulated in the synovium of patients with RA as well as in tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) transgenic mice developing arthritis and in collagen-induced arthritis models [12–14]. High levels of BMP7 have also been demonstrated in the synovial fluid of patients with RA, and levels are correlated with severity of disease [15]. In contrast, BMP4 and BMP5 ligands are downregulated in the RA synovium [16]. In collagen-induced arthritis, a dynamic activation of the BMP signaling pathway has been reported, showing a time-dependent increase of the amount of phosphorylated BR-Smads and the number of phospho-Smad1/5/8-positive cells [13]. Furthermore, fibroblast-like synoviocytes from patients with RA have been demonstrated to express BMP receptors [17] and to upregulate the expression of BMP2 and mainly BMP6 after stimulation with pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ), and IL-17 [14, 18, 19].

Despite all these data, however, only a few studies have addressed the involvement of BMP signaling in RA,

pointing out a role for BMP6 and BMP7 in stimulating the survival and the proliferation and extracellular matrix component biosynthesis, respectively, in synoviocytes [12, 14]. In the present study, we show that the canonical BMP pathway is functionally active in human RA synoviocytes and that autocrine BMP signaling modulates the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinases (MMPs).

## Methods

### Isolation and culture of rheumatoid arthritis synoviocytes

Synoviocytes were grown from synovial tissue samples obtained from RA patients undergoing joint surgery. The patients with RA fulfilled the American College of Rheumatology criteria for RA [20]. Each individual signed an informed consent form, and the protocol was approved by the committee for the protection of persons participating in biomedical research of the Hospital of Lyon, in compliance with the Helsinki Declaration. Briefly, synovial tissue was minced in small pieces which were allowed to fix on plastic plates. Those samples were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Eurobio, Courtabouef, France) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Life Technologies, part of Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), 2 % Penicillin-Streptomycin (Eurobio), 1 % L-glutamine (Eurobio), and 1 % Amphotericin B (Eurobio) until cells grew out of the tissue and colonized the plastic dishes. After cells reached confluence, tissue pieces were removed and cells were trypsinized. Synoviocytes were used between passages 4 and 9. Each independent experiment was performed with a different batch of synoviocytes isolated from different RA donors.

### RNA extraction and purification

Cells were seeded in 12-well plates at a density of  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Cells then were treated for 12 h with different combinations of IL-17 50 ng/mL (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), TNF- $\alpha$  0.5 ng/mL (R&D Systems), BMP-6 10 ng/mL (HumanZyme, Chicago, IL, USA), and dorsomorphin homologue 1 (DMH1) 30  $\mu$ M (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA). After 12-h treatment, RNA was extracted by using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Venlo, Limburg, The Netherlands) in accordance with the instructions of the manufacturer. RNA then was quantified by using a Qubit RNA BR Assay Kit (Life Technologies).

### Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

Total cDNA was synthesized by using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) in accordance with the instructions of the supplier and then used as a target in the polymerase chain reaction (PCR) amplifications. Pre-designed TaqMan

gene expression assays for different genes were obtained from Applied Biosystems. GNB2L1 was used as an endogenous control. All PCRs were set in duplicates by using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) in accordance with the instructions of the manufacturer. Amplifications, detections, and analyses were performed in a 7.900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, Complutense University, Madrid, Spain). The  $\Delta C_t$  method was used for normalization to GNB2L1.

**Cytokine measurements**

Culture supernatants of RA synoviocytes were harvested after 12 h of treatment. IL-8 secretion was measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay (BioLegend, San Diego, CA, USA) and IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) were measured by using Cytometric Bead Array assays (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) in accordance with the instructions of the manufacturers.

**Statistical analysis**

The Mann–Whitney test was used to compare differences. Values of  $P \leq 0.05$  (\*),  $P \leq 0.01$  (\*\*), and  $P \leq 0.001$  (\*\*\*) were considered to be statistically significant.

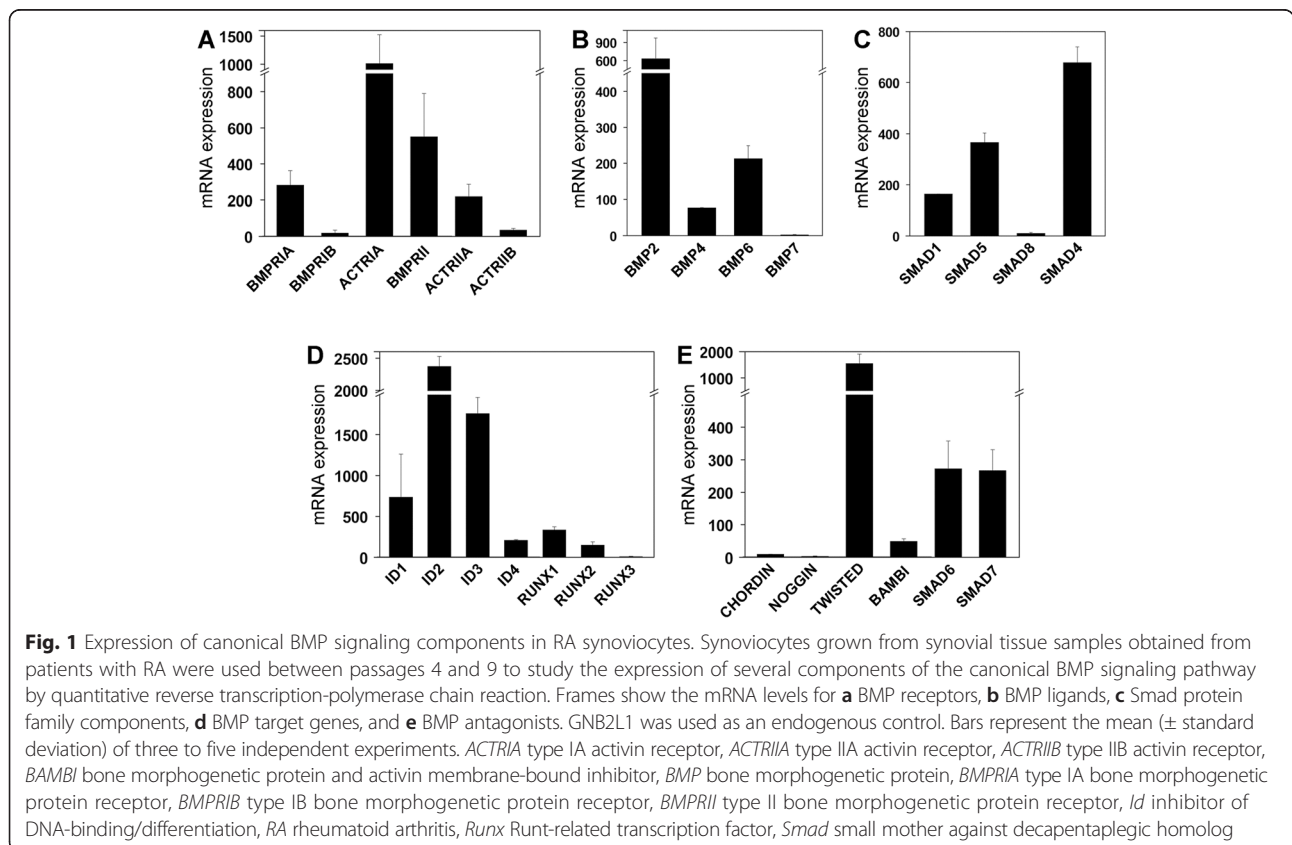
**Results**

**Bone morphogenetic protein signaling pathway is functionally active in human rheumatoid arthritis synoviocytes**

The expression of different components of the BMP signaling pathway was analyzed in RA synoviocytes. BMP receptor complexes are constituted by one of the following type I receptors, type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRIB)/ALK-6, and type IA activin receptor (ACTRIA)/ALK-2, which commonly combine with type II BMP receptor (BMPRII) but also the type IIA and IIB activin receptors (ACTRIIA and ACTRIIB). In RA synoviocytes, BMPRIA and ACTRIA were the most abundantly expressed type I receptors, and the BMP-specific type II receptor BMPRII showed a high level of expression (Fig. 1a).

Among ligands, the most highly expressed were BMP2 and BMP6 (Fig. 1b). Synoviocytes also expressed specific RNAs for the Smad signal transducers, Smad1, Smad5, and the common partner Smad4, as well as the well-known BMP target genes, the Id protein family and Runx transcription factors [1] (Fig. 1c, d).

Furthermore, BMP signaling is finely regulated at multiple levels: at the extracellular space, several high-affinity antagonists bind selectively with BMPs to inhibit their biological actions; at the plasma membrane, the



pseudoreceptor BAMBI associates with BMP receptors, preventing the formation of active receptor complexes; and intracellularly, inhibitory Smads and Smurfs inhibit further signaling and activation of target genes [21]. The expression of different BMP antagonists was also detected in RA synoviocytes, mainly the extracellular antagonist Twisted gastrulation and the intracellular inhibitors Smad6 and Smad7 (Fig. 1e). In contrast, only low levels of the pseudoreceptor BAMBI and the extracellular antagonists Noggin and Chordin could be detected in non-stimulated RA synoviocytes (Fig. 1e).

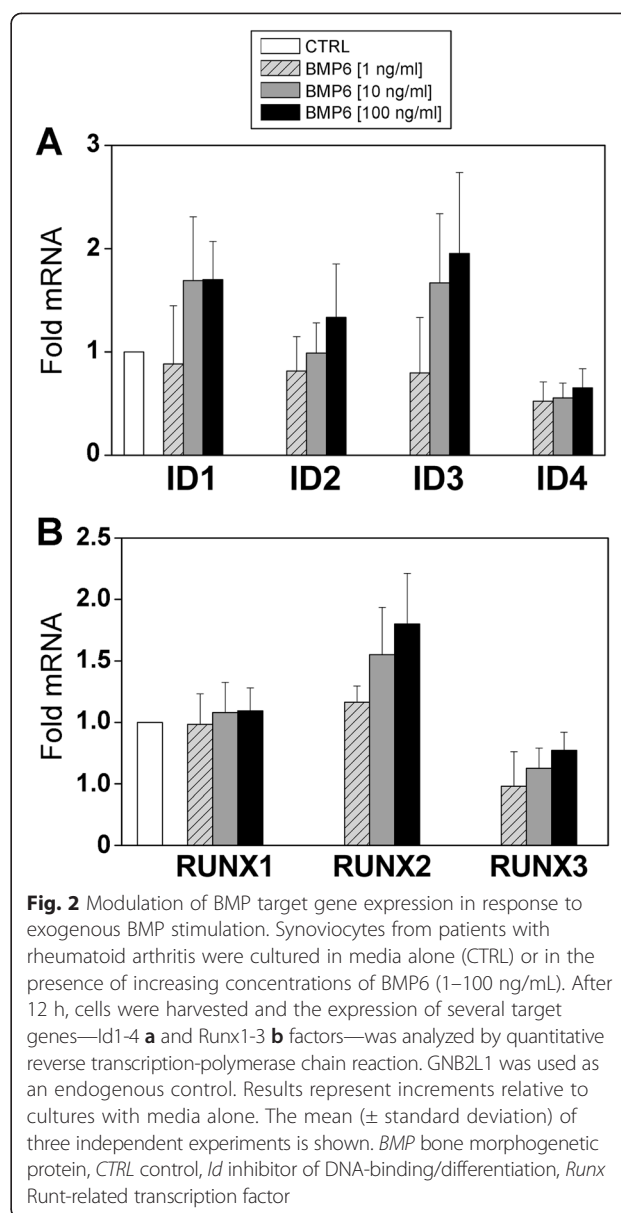
The functionality of the BMP pathway was analyzed by studying the modulation of the expression of the components of Id protein and Runx families after addition of exogenous BMP. As shown in Fig. 2, stimulation of BMP signaling in synoviocytes showed a dose-dependent trend to increase the mRNA levels of Id1, Id2, and mainly Id3 and Runx2. On the contrary, the levels of transcripts for Id4 and Runx3 tended to decrease after BMP stimulation (Fig. 2a, b). These data indicated that BMP signaling pathway is functional in RA synoviocytes.

**Expression of bone morphogenetic protein pathway components is upregulated by pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synoviocytes**

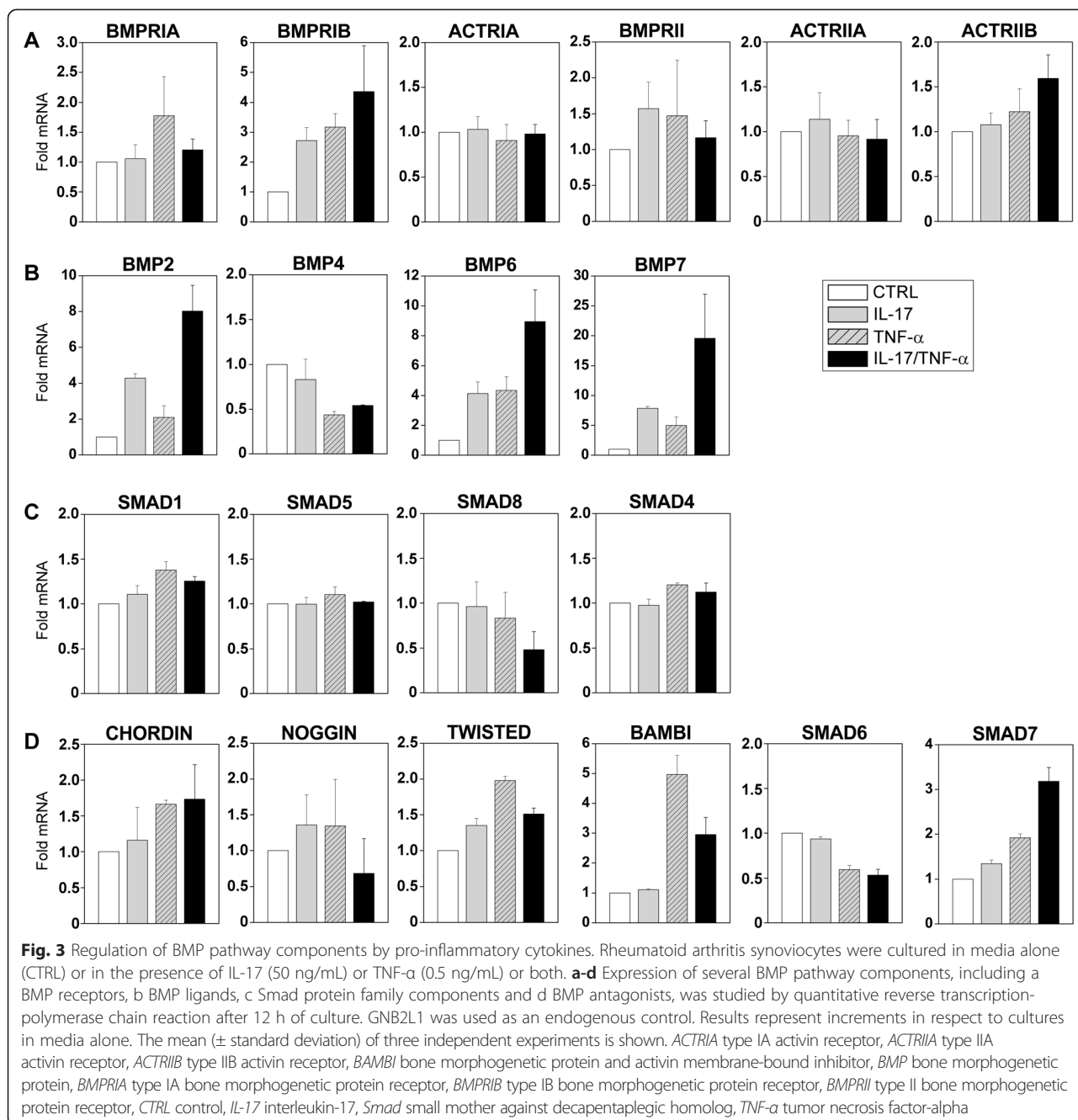
We next examined the effects of critical pro-inflammatory cytokines in RA, such as TNF- $\alpha$  and IL-17, on the expression of the different components of the BMP signaling pathway. The culture of synoviocytes with IL-17 and TNF- $\alpha$  alone or in combination induced mainly a 3- to 4-fold increase in the expression of BMPRII, the least expressed type I BMP receptor in unstimulated synoviocytes, and slight increases in the mRNA levels of BMPRII and AC $\text{TRIIB}$  receptors (Fig. 3a). The expression of Smad transcripts was hardly affected by the pro-inflammatory treatment. In contrast, the expression of BMP2, BMP6, and BMP7 ligands was notably increased after culture with IL-17 and TNF- $\alpha$  and mainly when the two cytokines were used in combination (8-, 9-, and 20-fold increases for BMP2, BMP6, and BMP7, respectively) (Fig. 3b, c). The levels of BMP4 mRNA were, however, reduced mainly in the presence of TNF- $\alpha$  (Fig. 3b). Interestingly, stimulation with TNF- $\alpha$  alone or with IL-17 enhanced the levels of transcripts encoding the membrane-bound antagonist BAMBI and the intracellular inhibitor Smad7 (3- to 5-fold and 2- to 3-fold increases, respectively) and, to a lesser extent, the extracellular modulator Twisted gastrulation (Fig. 3d).

**Blockade of canonical bone morphogenetic protein signaling potentiates cytokine production in rheumatoid arthritis synoviocytes**

The above data showing BMP receptor expression on synoviocytes, along with an upregulated BMP expression



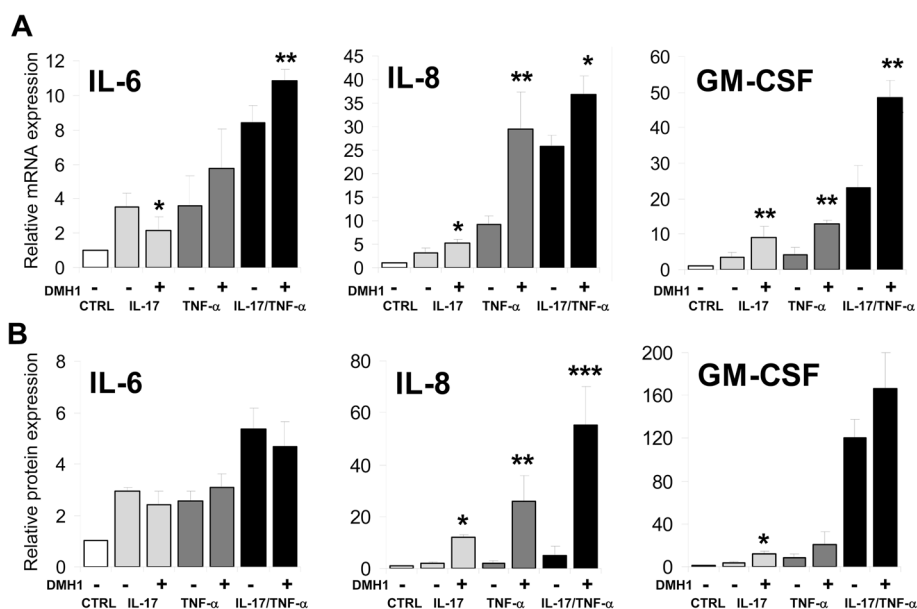
after pro-inflammatory cytokine stimulation, suggested that BMP ligands produced by RA synoviocytes could act in an autocrine manner. The highly selective type I BMP receptor inhibitor DMH1, which blocks the canonical BMP signaling pathway by inhibiting the BMP-induced Smad 1/5/8 activation [22], was used to study the role of endogenously produced BMP ligands in the expression of inflammatory factors in synoviocytes. As reported [18], IL-17, TNF- $\alpha$ , and mainly the combination of the two cytokines mostly upregulated the expression levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and GM-CSF as well as the chemokine IL-8, all involved in RA pathogenesis (Fig. 4a). Remarkably, the simultaneous blockade of the canonical BMP signaling pathway induced a further



upregulation of the expression of these genes, so that in some cases the higher levels reached after treatment with IL-17 or TNF- $\alpha$  or both underwent a further 2- to 3-fold increase (Fig. 4a). When protein levels were measured in the culture supernatants, the secretion of IL-8 and GM-CSF was also notably increased after treatment with the BMP inhibitor DMH1 (Fig. 4b). No significant variations were seen when IL-6 protein levels were determined (Fig. 4b). Therefore, these results suggested an anti-inflammatory role for BMP signaling.

**Modulation of chemokine and metalloproteinase expression in rheumatoid arthritis synoviocytes after canonical bone morphogenetic protein signaling inhibition**

The expression of chemokines other than IL-8 was analyzed, and the results showed that BMP signaling inhibition mainly augmented the expression of CCL2 induced by IL-17 (Fig. 5a). However, the presence of the BMP inhibitor DMH1 did not significantly alter the expression of CCL2 and CCL5 or markedly reduced the high



**Fig. 4** Effects of BMP signaling blockade on TNF- $\alpha$  and IL-17-induced cytokine and chemokine mRNA and protein expression in RA synoviocytes. RA synoviocytes were simultaneously treated with the BMP pathway inhibitor DMH1 and IL-17 (50 ng/mL) or TNF- $\alpha$  (0.5 ng/mL) or both. **a** After 12 h, mRNA levels were analyzed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Cells were left untreated as control, and the fold induction is shown for each treatment. GNB2L1 was used as an endogenous control. Bars represent the mean ( $\pm$  SD) of four to six independent experiments. Asterisks represent statistically significant differences between DMH1-treated and DMH1-non-treated cells (\* $P$   $\leq$  0.05; \*\* $P$   $\leq$  0.01; \*\*\* $P$   $\leq$  0.005; by Mann-Whitney test). **b** Protein levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay/Cytometric Bead Array assays. Data shown are expressed as fold induction compared with the untreated condition. Asterisks represent statistically significant differences between DMH1-treated and DMH1-non-treated cells (\* $P$   $\leq$  0.05; \*\* $P$   $\leq$  0.01; \*\*\* $P$   $\leq$  0.005; by  $t$  test). Bars represent the mean ( $\pm$  SD) of three to five independent experiments. *BMP* bone morphogenetic protein, *CTRL* control, *DMH1* dorsomorphin homologue 1, *GM-CSF* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *IL* interleukin, *MMP* matrix metalloproteinase, *RA* rheumatoid arthritis, *SD* standard deviation, *TNF- $\alpha$*  tumor necrosis factor- $\alpha$

expression levels of CXCL10 induced in the presence of TNF- $\alpha$  alone or in combination with IL-17 (Fig. 5a).

The treatment of RA synoviocytes with IL-17 or TNF- $\alpha$  or both also upregulated the expression of MMP-2 and MMP-3 metalloproteinases involved in synoviocyte migration and invasion as well as joint destruction [18, 23] (Fig. 5b). When the canonical BMP signaling pathway was simultaneously inhibited by the addition of DMH1, the expression of both metalloproteinases underwent a further significant increase, mainly after treatment with TNF- $\alpha$  alone or together with IL-17 (Fig. 5b). In contrast, the upregulation of MMP-1, MMP-9, and MMP-13 metalloproteinase expression induced by IL-17 and TNF- $\alpha$  [24] was not significantly affected by the blockade of BMP signaling (Fig. 5b).

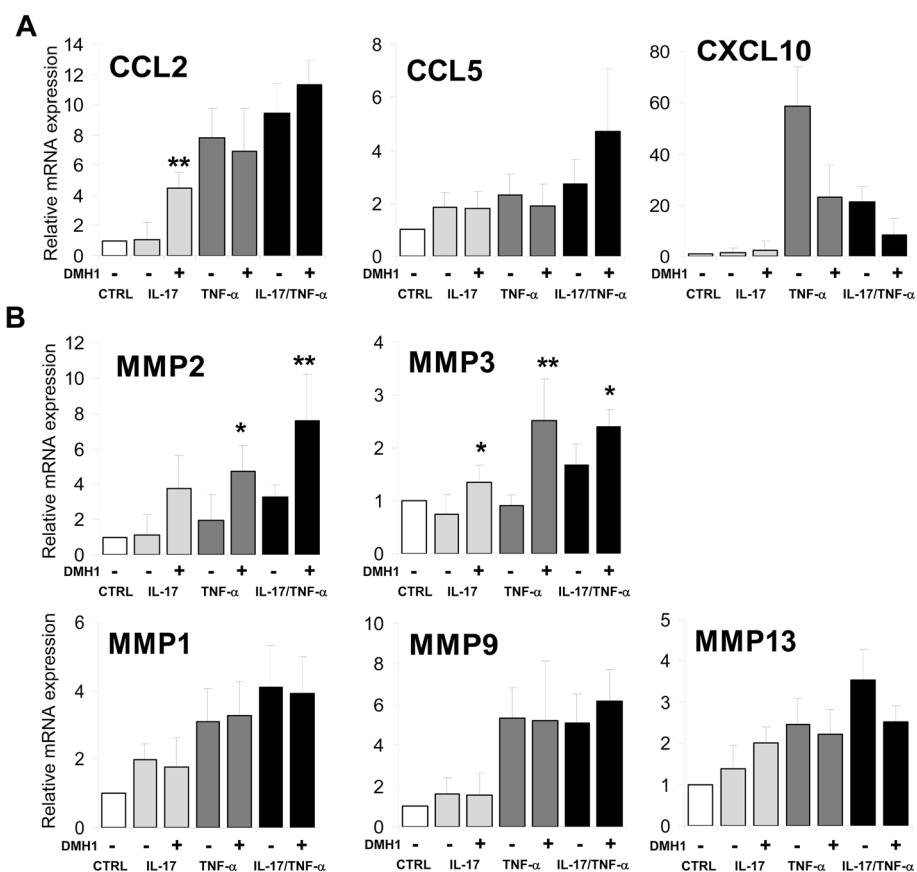
**Effects of the addition of BMP6 on cytokine, chemokine, and metalloproteinase expression in rheumatoid arthritis synoviocytes**

The effects of the addition of an exogenous BMP ligand, inducing an additional BMP signaling pathway activation, were also addressed. BMP6 was chosen because of its notable expression levels in RA synoviocytes and its high upregulation after synoviocyte stimulation with pro-

inflammatory cytokines (Figs. 1b and 3b). Remarkably, in non-stimulated RA synoviocytes, cultured in the absence of IL-17 or TNF- $\alpha$ , the expression of IL-6, GM-CSF, and IL-8 was reduced by 50–70 % by the presence of BMP6, and to a lesser extent CCL2, MMP-3, and MMP-13 expression was reduced by 40 % (Fig. 6a). No relevant changes were observed in the expression of the metalloproteinases MMP-2, MMP-1, and MMP-9 and the chemokines CCL5 and CXCL10 (Fig. 6a). Meanwhile, in cytokine-activated RA synoviocytes, it could be noted that the further stimulation of BMP signaling tended to decrease the expression of most of the studied genes, mainly when TNF- $\alpha$  was present (Fig. 6b). No consistent differences were observed for the expression of MMP-1, MMP-9, and MMP-13 metalloproteinases after BMP ligand addition (not shown). All these data, then, supported the idea that the BMP pathway would have anti-inflammatory effects.

**Discussion**

The increased expression and production of specific BMPs (i.e., BMP2, BMP6, and BMP7) in the synovium and synovial fluid of patients with RA as well as in mouse models of arthritis have been reported by different groups



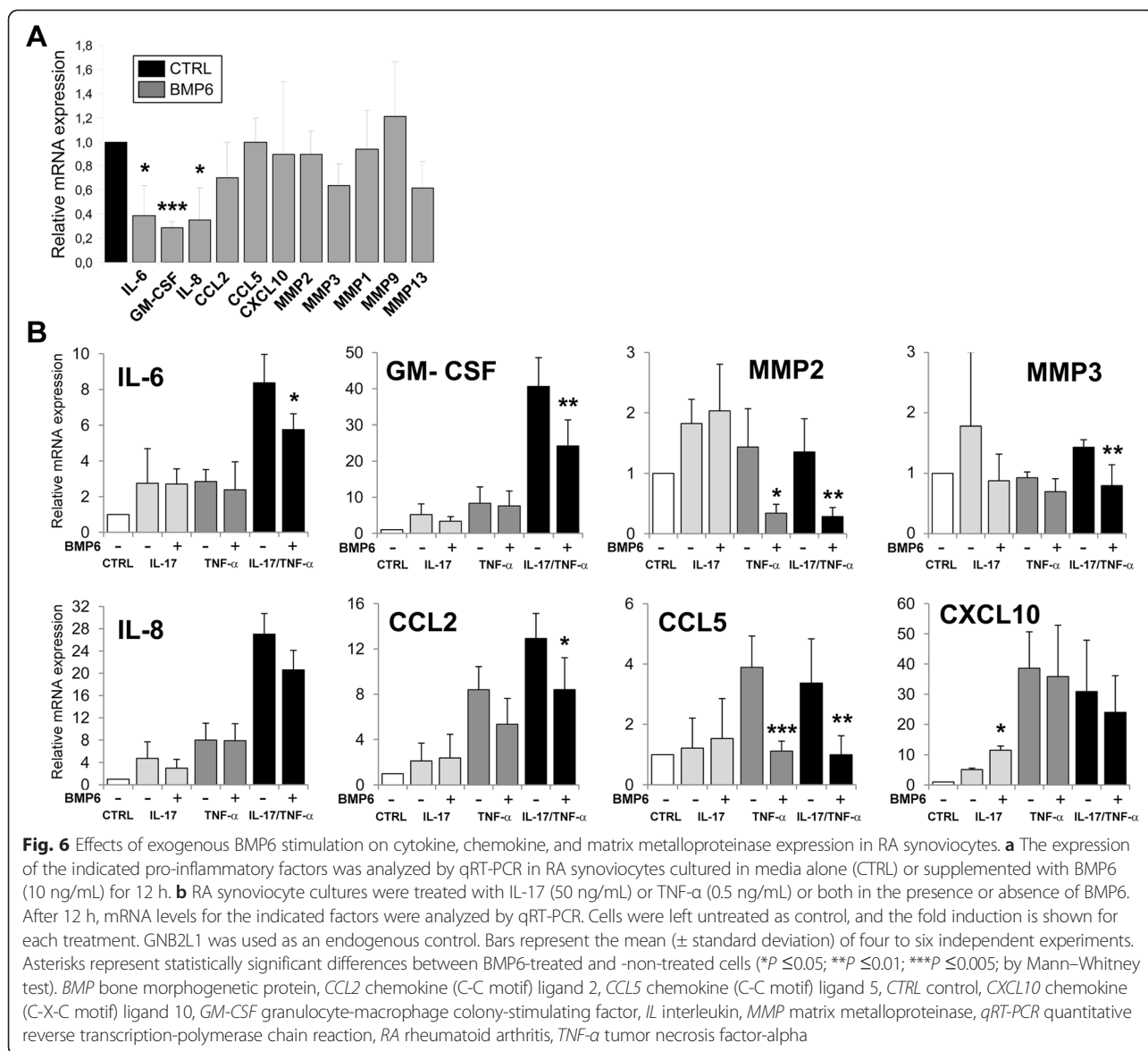
**Fig. 5** Effects of bone morphogenetic protein inhibitor DMH1 treatment on TNF-α and IL-17 combination-induced chemokine and matrix metalloproteinase mRNA expression in RA synoviocytes. Synoviocytes from patients with RA were left untreated (CTRL) or stimulated with IL-17 (50 ng/mL) or TNF-α (0.5 ng/mL) or both in the presence or absence of DMH1. The expression of **a** the indicated chemokines and **b** matrix metalloproteinases was analyzed by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction after 12 h of culture. GNB2L1 was used as an endogenous control. Fold induction relative to untreated cells is shown, and the mean (± standard deviation) of four to six independent experiments is presented. Asterisks represent statistically significant differences between DMH1-non-treated and DMH1-treated cells (\**P* ≤ 0.05; \*\**P* ≤ 0.01; \*\*\**P* ≤ 0.005; by Mann-Whitney test). *CCL2* chemokine (C-C motif) ligand 2, *CCL5* chemokine (C-C motif) ligand 5, *CTRL* control, *CXCL10* chemokine (C-X-C motif) ligand 10, *DMH1* dorsomorphin homologue 1, *IL-17* interleukin-17, *MMP* matrix metalloproteinase, *RA* rheumatoid arthritis, *TNF-α* tumor necrosis factor-alpha

[12–15]. However, the involvement of the BMP signaling pathway in RA pathogenesis has been poorly analyzed.

In this study, we show the presence of a functionally active BMP signaling pathway in synoviocytes. Human RA synoviocytes express the three type I BMP receptors, BMPRIA, BMPRIB, and ACTRIA, and the BMP-specific type II receptor BMPRII. RA synoviocytes also express the BR-Smads as well as the common partner Smad4. All of these components are found to be efficient in signal transduction given the ability of synoviocytes to modulate the expression of some BMP target genes, including some Runx factors and members of the Id protein family, in response to exogenous BMP stimulation. In addition, RA synoviocytes express BMP ligands which, in agreement with previous work [14, 18, 19], are notably upregulated after stimulation with pro-inflammatory cytokines. These data suggest that some functional activities of synoviocytes could be modulated by BMP in an autocrine

fashion, which is supported by our results using the selective BMP inhibitor DMH1.

The blockade of BMP signaling with DMH1 significantly enhances the expression of pro-inflammatory cytokines (i.e., IL-6 and GM-CSF), chemokines (i.e., IL-8, CCL2, and CCL5), and MMPs (i.e., MMP-2 and MMP-3) induced in RA synoviocytes by the simultaneous treatment with IL-17 and TNF-α alone or in combination. Conversely, the stimulation of the BMP signaling pathway with an exogenous BMP ligand reduces the expression of pro-inflammatory and pro-destructive factors in both unstimulated and stimulated RA synoviocytes, mainly with the IL-17 and TNF-α combination. Therefore, it could be hypothesized that BMP signaling could have an anti-inflammatory role in the control and maintenance of low levels of pro-inflammatory factors in healthy synoviocytes and probably also in the early stages of RA (Fig. 7). In this regard, Lories and Luyten [25] also

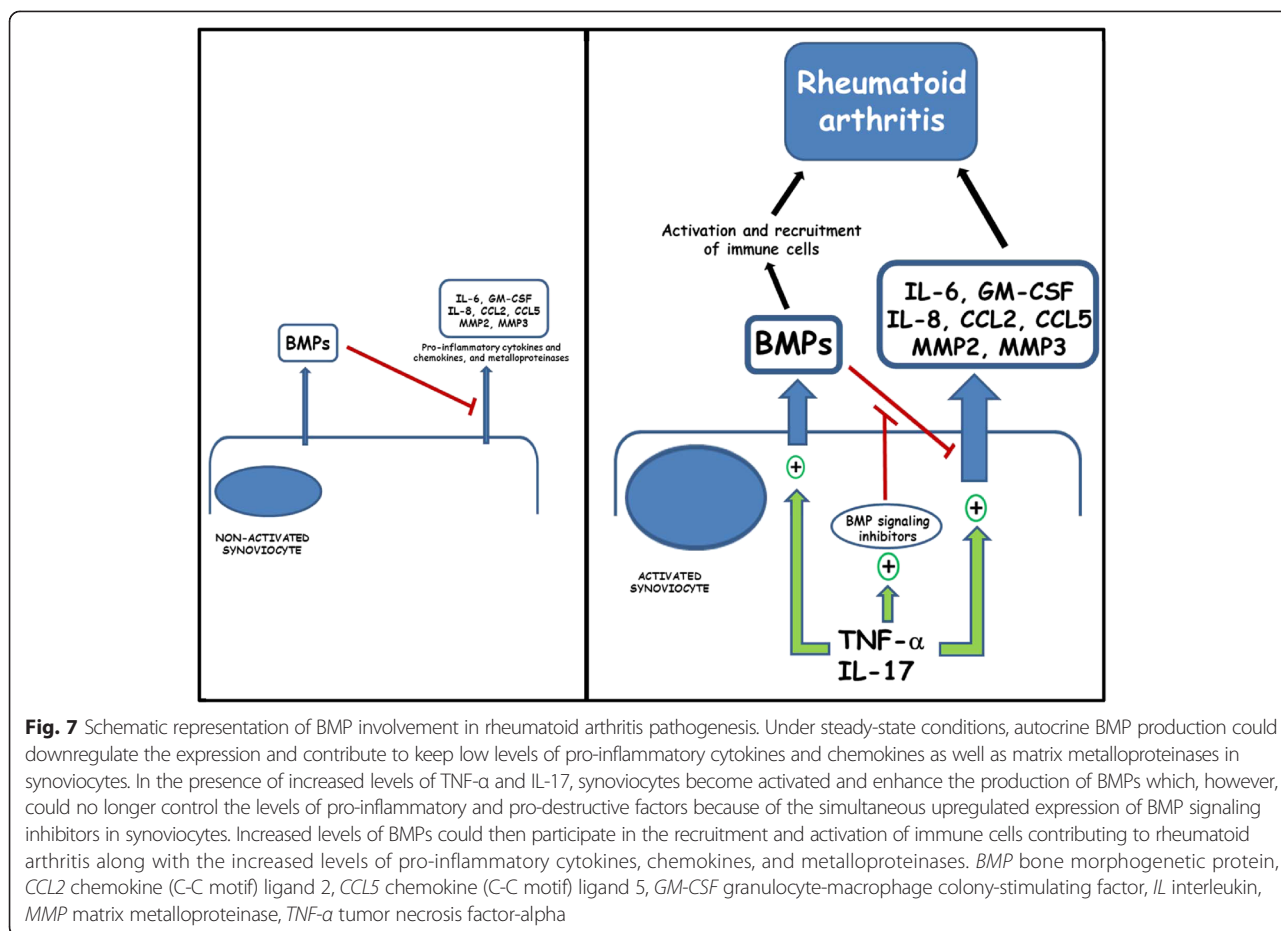


proposed that BMPs may play a disease-controlling role as joint-protective factors since BMP2 was described to promote synoviocyte apoptosis. Likewise, BMP7 has been shown to be able to suppress alterations in synoviocytes induced by synovial fluid from patients with RA, pointing out a role for BMP in maintaining a quiescent phenotype of the synovial lining layer [26].

However, the stimulation of RA synoviocytes induces the expression not only of BMP ligands but also of BMP antagonists, mainly after treatment with TNF- $\alpha$  alone or in combination with IL-17. Smad7 and BAMBI are the main upregulated BMP antagonists, which act at the intracellular and the plasma membrane level, respectively [21], indicating that BMP signaling inhibition must occur in the synoviocytes themselves. This finding suggests that in late stages of RA the BMP signaling pathway probably

is no longer able to control and maintain the low levels of pro-inflammatory factors, which then will rise and persist at chronically high levels contributing to RA pathogenesis [27] (Fig. 7).

In this context, the high levels of BMP ligands produced by stimulated synoviocytes could also contribute to the chronic inflammation associated with RA by acting in a paracrine fashion on surrounding cells present in the inflamed synovium (Fig. 7). BMPs have been shown to induce a pro-inflammatory phenotype in endothelial cells [28, 29] and to stimulate chemotactic responses in monocytes/macrophages [30, 31], which play a central role in RA. BMP pathway activation increases monocyte adherence to endothelial cells [28] and stimulates the production of pro-inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6, by macrophages [32, 33]. We and others



have shown that BMP stimulation induces maturation of dendritic cells [34], increases T-cell proliferation and activation [35, 36], and promotes T helper 17 (Th17) differentiation [36]. Furthermore, BMPs have been shown to be chemotactic for mesenchymal stem cells [37–39], which can expand Th17 cells, as we reported previously [40], and osteoclast differentiation and activity can also be enhanced by some BMP ligands [41], which could contribute to the bone destruction seen in RA.

### Conclusions

We propose that BMPs would play a dual role in the synovium, controlling the production of pro-inflammatory cytokines and inhibiting synoviocyte transformation in healthy and non-inflammatory conditions, but in advanced stages of RA could contribute to chronic inflammation, allowing the functional deregulation of synoviocytes and promoting the activation and pro-inflammatory functions of immune and non-immune cells accumulating in the inflamed arthritic joint.

### Abbreviations

ACTRIA: Type IA activin receptor; ACTRIIA: Type IIA activin receptor; ACTRIIB: Type IIB activin receptor; BAMBI: Bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor; BMP: Bone morphogenetic protein;

BMPRIA: Type IA bone morphogenetic protein receptor; BMPRIB: Type IB bone morphogenetic protein receptor; BR-Smad: Bone morphogenetic protein receptor-regulated Smad; CCL2: Chemokine (C-C motif) ligand 2; CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5; CXCL10: Chemokine (C-X-C motif) ligand 10; DMH1: Dorsomorphin homologue 1; GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Id protein: Inhibitor of DNA-binding/differentiation protein; MMP: Matrix metalloproteinase; RA: Rheumatoid arthritis; Runx: Runt-related transcription factor; Smad: Small mother against decapentaplegic homolog; TGF: Transforming growth factor; Th17: T helper 17; TNF: Tumor necrosis factor.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

AVa designed the research, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. JV, FL, VGM, NNT, LH, and LF-S performed the research, collected and analyzed data, and participated in interpretation of data and manuscript preparation. RS contributed to data analysis and critical revision of the manuscript. AVi contributed to the research design, interpretation of data, and critical revision of the manuscript. PM designed the research, interpreted the data, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgments

This work was supported by grants SAF2012-33180 (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness), S2010/BMD-2420 (Comunidad de Madrid, Spain), and RD12/0019/0007 (Institute of Health Carlos III, Spain). FL and NNT are supported by the IHU prometteur OPERA. PM is a senior member of and is supported by the Institut Universitaire de France.

Received: 20 March 2015 Accepted: 7 July 2015

Published online: 28 July 2015

## References

- Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*. 2010;147:35–51.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:251–63.
- Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20:343–55.
- Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*. 1996;10:1580–94.
- Reddi AH. BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:249–50.
- Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Borgermann JH, Graf D, Knaus P. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal*. 2010;3:mr1.
- Bandyopadhyay A, Yadav PS, Prashar P. BMP signaling in development and diseases: a pharmacological perspective. *Biochem Pharmacol*. 2013;85:857–64.
- Cai J, Pardali E, Sanchez-Duffhues G, ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett*. 2012;586:1993–2002.
- Kallioniemi A. Bone morphogenetic protein 4-A fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genet*. 2012;205:267–77.
- Meng XM, Chung AC, Lan HY. Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124:243–54.
- Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51:v3–v11.
- Bobacz K, Sunk IG, Hayer S, Amoyo L, Tohidast-Akrad M, Kollias G, et al. Differentially regulated expression of growth differentiation factor 5 and bone morphogenetic protein 7 in articular cartilage and synovium in murine chronic arthritis: potential importance for cartilage breakdown and synovial hypertrophy. *Arthritis Rheum*. 2008;58:109–18.
- Daans M, Lories RJ, Luyten FP. Dynamic activation of bone morphogenetic protein signaling in collagen-induced arthritis supports their role in joint homeostasis and disease. *Arthritis Res Ther*. 2008;10:R115.
- Lories RJ, Derese I, Ceuppens JL, Luyten FP. Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2807–18.
- Chubinskaya S, Frank BS, Michalska M, Kumar B, Merrihew CA, Thonar EJ, et al. Osteogenic protein 1 in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis: relationship with disease and levels of hyaluronan and antigenic keratan sulfate. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R73.
- Bramlage CP, Haupt T, Kaps C, Ungethüm U, Krenn V, Pruss A, et al. Decrease in expression of bone morphogenetic proteins 4 and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R58.
- Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Funa K, Maini RN, Zvaifler NJ. Mesenchymal cells expressing bone morphogenetic protein receptors are present in the rheumatoid arthritis joint. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2046–55.
- Hot A, Zrioual S, Toh ML, Lenief V, Miossec P. IL-17A- versus IL-17F-induced intracellular signal transduction pathways and modulation by IL-17RA and IL-17RC RNA interference in rheumatoid synoviocytes. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:341–8.
- Kehlen A, Pachnio A, Thiele K, Langner J. Gene expression induced by interleukin-17 in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis: upregulation of hyaluronan-binding protein TSG-6. *Arthritis Res Ther*. 2003;5:R186.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham 3rd CO, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1580–8.
- Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol*. 2002;250:231–50.
- Hao J, Ho JN, Lewis JA, Karim KA, Daniels RN, Gentry PR, et al. In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. *ACS Chem Biol*. 2010;5:245–53.
- Hot A, Zrioual S, Lenief V, Miossec P. IL-17 and tumour necrosis factor alpha combination induces a HIF-1alpha-dependent invasive phenotype in synoviocytes. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1393–401.
- Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res*. 2002;4:157–64.
- Lories RJ, Luyten FP. Bone morphogenetic proteins in destructive and remodeling arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9:207.
- Steenvoorden MM, Tolboom TC, van der Pluijm G, Lowik C, Visser CP, DeGroot J, et al. Transition of healthy to diseased synovial tissue in rheumatoid arthritis is associated with gain of mesenchymal/fibrotic characteristics. *Arthritis Res Ther*. 2006;8:R165.
- Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2008;118:3537–45.
- Csiszar A, Ahmad M, Smith KE, Labinskyy N, Gao Q, Kaley G, et al. Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype. *Am J Pathol*. 2006;168:629–38.
- Csiszar A, Labinskyy N, Jo H, Ballabh P, Ungvari Z. Differential proinflammatory and prooxidant effects of bone morphogenetic protein-4 in coronary and pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H569–77.
- Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:11740–4.
- Perron JC, Dodd J. ActRIIA and BMPRII Type II BMP receptor subunits selectively required for Smad4-independent BMP7-evoked chemotaxis. *PLoS One*. 2009;4, e8198.
- Hong JH, Lee GT, Lee JH, Kwon SJ, Park SH, Kim SJ, et al. Effect of bone morphogenetic protein-6 on macrophages. *Immunology*. 2009;128:e442–50.
- Lee GT, Jung YS, Lee JH, Kim WJ, Kim IY. Bone morphogenetic protein 6-induced interleukin-1beta expression in macrophages requires PU.1/Smad1 interaction. *Mol Immunol*. 2011;48:1540–7.
- Martinez VG, Hernandez-Lopez C, Valencia J, Hidalgo L, Entrena A, Zapata AG, et al. The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunol Cell Biol*. 2011;89:610–8.
- Varas A, Martinez VG, Hernandez-Lopez C, Hidalgo L, Entrena A, Valencia J, et al. Role of BMP signalling in peripheral CD4+ T cell proliferation. *Immunologia*. 2009;28:125–30.
- Yoshioka Y, Ono M, Osaki M, Konishi I, Sakaguchi S. Differential effects of inhibition of bone morphogenetic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. *Eur J Immunol*. 2012;42:749–59.
- Fiedler J, Roderer G, Gunther KP, Brenner RE. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem*. 2002;87:305–12.
- Lee DH, Park BJ, Lee MS, Lee JW, Kim JK, Yang HC, et al. Chemotactic migration of human mesenchymal stem cells and MC3T3-E1 osteoblast-like cells induced by COS-7 cell line expressing rhBMP-7. *Tissue Eng*. 2006;12:1577–86.
- Postlethwaite AE, Raghov R, Stricklin G, Ballou L, Sampath TK. Osteogenic protein-1, a bone morphogenetic protein member of the TGF-beta superfamily, shares chemotactic but not fibrogenic properties with TGF-beta. *J Cell Physiol*. 1994;161:562–70.
- Eljaafari A, Tartelin ML, Aissaoui H, Chevrel G, Osta B, Lavocat F, et al. Bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal cells promote Th17 cell expansion and activation through caspase 1 activation: contribution to the chronicity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64:2147–57.
- Jensen ED, Pham L, Billington Jr CJ, Espe K, Carlson AE, Westendorf JJ, et al. Bone morphogenetic protein 2 directly enhances differentiation of murine osteoclast precursors. *J Cell Biochem*. 2010;109:672–82.

RESEARCH ARTICLE

# The BMP Pathway Participates in Human Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Activation and Homeostasis

Víctor G. Martínez, Rosa Sacedón, Laura Hidalgo, Jaris Valencia, Lidia M. Fernández-Sevilla, Carmen Hernández-López, Angeles Vicente<sup>✉</sup>, Alberto Varas<sup>\*✉</sup>

Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

<sup>✉</sup> These authors contributed equally to this work.

\* [avaras@ucm.es](mailto:avaras@ucm.es)



CrossMark  
click for updates

**OPEN ACCESS**

**Citation:** Martínez VG, Sacedón R, Hidalgo L, Valencia J, Fernández-Sevilla LM, Hernández-López C, et al. (2015) The BMP Pathway Participates in Human Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Activation and Homeostasis. PLoS ONE 10(6): e0131453. doi:10.1371/journal.pone.0131453

**Editor:** Jon C.D. Houtman, University of Iowa, UNITED STATES

**Received:** January 26, 2015

**Accepted:** June 2, 2015

**Published:** June 25, 2015

**Copyright:** © 2015 Martínez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by grants SAF2012-33180 (Ministerio de Economía y Competitividad), S2010/BMD-2420 (Comunidad de Madrid) and RD12/0019/0007 (Instituto de Salud Carlos III). L.H. is supported by pre-doctoral fellowships (AP2009-4324) from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist

## Abstract

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) form a group of secreted factors that belongs to the TGF- $\beta$  superfamily. Among different roles in a number of immune cell types, BMPs are known to regulate T cell development within the thymus, although the role of BMP signaling in human mature T cells remains elusive. In this study, we demonstrate that canonical BMP signaling is necessary during two critical events that regulate the size and function of human naive CD4<sup>+</sup> T cell population: activation and homeostasis. Upon stimulation via TCR, naive CD4<sup>+</sup> T cells upregulate the expression of BMP ligands triggering canonical BMP signaling in CD25<sup>+</sup> cells. Blockade of BMP signaling severely impairs CD4<sup>+</sup> T cell proliferation after activation mainly through regulation of IL-2, since the addition of this cytokine recuperates normal T cell expansion after inhibition of BMP signaling. Similarly, activation of canonical BMP pathway is required for both the maintenance of cell survival and the homeostatic proliferation induced by IL-7, a key factor for T cell homeostasis. Moreover, upregulation of two critical receptors for T cell homeostasis, CXCR4 and CCR9, triggered by IL-7 is also abrogated in the absence of BMP signaling. Collectively, we describe important roles of the canonical BMP signaling in human naive CD4<sup>+</sup> T cell activation and homeostasis that could be valuable for clinical application.

## Introduction

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are multifunctional secreted growth factors that belong to the TGF- $\beta$  superfamily together with TGF- $\beta$  proteins, Activins and Inhibins, Nodal, Growth and Differentiation Factors (GDF), Miostatin and the anti-Mullerian hormone [1]. BMPs signal through heterotetrameric receptor complexes composed of two types of receptors. Among the type I receptors, ALK3/BMP receptor type IA (BMPRIA) and ALK6/BMPRIIB are specific for BMPs, while ALK1/Activin receptor type IA (ActRIA) can bind both BMPs and Activins [2]. Similarly, the BMP receptor type II (BMPRII) only recognizes BMPs, while Activin receptor type IIA (ActRIIA) and IIB (ActRIIB) are able to recognize both BMPs and Activins [3].

The canonical BMP signaling pathway is initiated when the ligand-bound receptor complex phosphorylates the BMP receptor regulated Smad proteins (Smad-1, -5 and -8, termed BR-Smads as a group). Phosphorylated BR-Smads form a complex with the common Smad (Smad-4/Co-Smad) that is translocated to the nucleus where they regulate the transcription of several target genes. Alternatively, non-canonical signaling pathways can be triggered by BMP ligands depending on different factors such as the oligomerization of the heteromeric receptor complex [4].

First discovered by their capacity to induce ectopic bone formation [5], the BMPs are now known to play essential roles during embryonic development (reviewed in [6]) as well as in tissue homeostasis in the adult [7]. Regarding those organs that depend on BMPs for proper function, a considerable number of reports have established a pivotal role for BMPs regulating the differentiation of T cells within the thymic gland. In brief, BMP ligands are produced by both the thymic stroma and the CD34<sup>+</sup> intrathymic precursor cells, which also express the components needed for BMP signaling. The BMP pathway blocks T cell differentiation at the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> double negative to CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive transition and maintains the intrathymic precursors by increasing their survival and inhibiting their proliferation [8–11]. The relationship between BMPs and T cells seems to continue during the mature stage of these cells, since a number of studies have described disparate responses induced by BMPs in differentiated T cells [12–14]. Most of these studies are based on mouse and cell line models, therefore the potential role of BMP signaling in human T cells has not been thoroughly addressed.

T cells constitute the main effector subset of the adaptive immunity. They are continuously generated in the thymus from where they emigrate to peripheral tissues as recent thymic emigrants [15]. When mature naive T cells confront their cognate antigen present on the surface of an antigen presenting cell, they become activated by signals transduced through the T cell receptor (TCR) and other costimulatory receptors such as CD28 [16]. Activation of T cells is characterized by a strong proliferative response accompanied by secretion of soluble factors.

During the steady state, contribution of the thymus to naive T cell repertoire maintenance is dominant at early stages of life but decays with age [17], whereas proliferation within the naive phenotype is dominant in older individuals [18]. Besides, naive T cells are characterized by a half-life of  $414 \pm 245$  days depending on the technique employed [19]. According to these facts, it has been demonstrated that T cell homeostasis is regulated in the periphery by factors modulating their survival and clonal expansion such as IL-7 [20]. Furthermore, in different situations where lymphopenia takes place, such as neonatal thymectomy and HIV infection, IL-7 signaling is increased in order to reestablish basal T cell numbers [21–23]. Alterations in T cell number and function can lead to the generation of severe pathologies that range from immunodeficiencies, when T cell function is somehow inhibited, to chronic inflammation, when T cells show hyperreactivity.

In this study we show that activation of the BMP pathway is critical for human naive CD4<sup>+</sup> T cell activation and homeostasis. Upon stimulation through the TCR, BMP production is induced in T cells acting in an autocrine fashion in the regulation of their proliferative response upstream to IL-2 signaling. Similarly, canonical BMP signaling is activated in response to IL-7 stimulation, mediating in the regulation of a number of features related to T cell homeostasis such as homing receptor expression, survival and homeostatic proliferation.

## Materials and Methods

### Cell culture

Buffy coats of healthy donors were obtained after written informed consent (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Spain). The study was approved by the Ethics Committee

for Clinical Investigation of the University Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain). PBMCs were obtained by density gradient centrifugation with Lymphocyte Isolation Solution (Rafer, Madrid, Spain). Naive CD4<sup>+</sup> T cells were isolated by negative selection using the Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotech). Unless otherwise stated, 2–3 × 10<sup>5</sup> T cells were cultured in 96-well flat-bottom culture plates in 200 μl of complete culture media, consisting in RPMI (Sigma-Spain) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (Invitrogen, Life Technologies), 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin (all components from Sigma-Spain). For T cell activation, isolated T cells were cultured with immobilized anti-human CD3 (10 μg/ml) and soluble anti-human CD28 (4 μg/ml) monoclonal antibodies (ImmunoStep) or co-cultured with cytokine-matured monocyte-derived dendritic cells, generated as previously described [24]. Alternatively, isolated T cells were cultured in complete media alone or supplemented with PHA, a cytokine cocktail including rhIL-2 (25 ng/ml) (Miltenyi Biotech), rhIL-6 (100 ng/ml) and rhTNF-α (25 ng/ml) (Invitrogen, Life Technologies), or with rhIL-7 [5 ng/ml] (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) alone. For determination of BMP2/4 and BMP6 expression by flow cytometry, brefeldin A (BioLegend) was added for the last 4 hours of culture. In some experiments, rhBMP2 or rhBMP4 (Humanzyme) was added to the cultures. Inhibition of BMP signaling was performed by addition of the recombinant human BMPRI-IA/ALK-3 Fc chimera (R&D Systems) or the inhibitor molecule DMH1 (Tocris) at the indicated doses, while unspecific mouse immunoglobulins or vehicle (DMSO), respectively, were used as controls. The small inhibitory molecule DMH1 functions as an ATP-competitive inhibitor showing a very specific activity impeding Smad1/5/8 phosphorylation by ActRIA/ALK2 and BMPRIA/ALK3 in response to BMPs without affecting either non canonical pathways nor the TGF-β type I receptor/ALK5 activity [25, 26].

## PCR analysis

RNA isolation was performed using Absolutely RNA Microprep kit (Stratagene Cloning Systems), including a DNase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total cDNA was synthesized by High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), according to the supplier's instructions, and then used as target in the PCR amplifications. Real-time PCR was performed with the following Taq-man assays: *BMPRIA* (Hs01034909\_g1), *BMPRIB* (Hs00176144\_m1), *ACVRIA* (Hs00153836\_m1), *BAMBI* (Hs00180818\_m1) *SMAD1* (Hs00195432\_m1), *SMAD4* (Hs00929647\_m1), *SMAD5* (Hs00195437\_m1), *SMAD8* (Hs00195441\_m1) and *IL2* (Hs00174114\_m1), all of them obtained from Applied Biosystems. *GNB2L1* (Pre-Developed TaqMan) was used as endogenous control. All PCR reactions were set in duplicates using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Amplifications, detections, and analyses were performed in a 7.900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, Complutense University, Madrid, Spain). The Delta CT method was used for normalization to *GNB2L1* mRNA.

## Flow cytometry

The following mAb conjugated with FITC, PE, PE-Cy5 or APC were used for flow cytometric analysis: CD3 (HIT3a), CD4 (OKT4), CD25 (BC96), CD62L (DREG-56), CD49d (9F10), CD11a (HI111), CD18 (6.7), CXCR4 (12G5), CCR9 (BL/CCR9), CCR7 (3D12) and CD127 (R34.34) from BD Biosciences, Immunotech and BioLegend. Two-, three- and four-color immunofluorescence stainings were performed by incubating the cells in PBS containing 1% FCS and 0.1% NaN<sub>3</sub> in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated

antibodies for 30 min at 4°C. Staining with purified polyclonal anti-human BMPRIA (R&D Systems) was followed by incubation with fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

For the intracellular stainings, and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with purified anti-human BMP2/4 mAb (100230), biotin-conjugated anti-human BMP6, purified anti-human BMPRIA (all from R&D Systems) or PE-conjugated anti-human Bcl-2 mAb (6C8) (BD Biosciences), followed when required by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-goat, anti-rabbit or anti-mouse IgG or streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories), all diluted in Perm/Wash buffer. To detect phosphorylated BR-Smads, cells were fixed with BD cellFIX (BD Biosciences) for 30 min at 4°C to enable a phosphorylation-state analysis. Then, cells were washed with PBS, permeabilized by 30 min incubation on ice with BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) and stained with anti-human p-Smad1/5/8 polyclonal antibody (Ser 463/Ser 465) (Santa Cruz Biotechnology) followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), all diluted in PBS. Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Complutense University of Madrid.

### Immunofluorescence analysis

For immunofluorescence analysis, freshly isolated CD4<sup>+</sup> T cells were attached to poly-L-lysine coated glass slides by 30 minutes of incubation at room temperature and stained with CD4 (RPA-T4) (BD Biosciences) and BMPRIA (R&D Systems) antibodies followed by Alexa Fluor 594 or Alexa Fluor 488-conjugated multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-mouse and donkey anti-goat IgG. For intracellular staining of BMPRIA, cells were fixed with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences) before CD4 staining and stained for BMPRIA using Perm/Wash buffer (BD Biosciences). Finally, cells were stained with Hoechst 33342 (Invitrogen, Life Technologies) for cell nucleus visualization and mounted with Prolong Gold (Invitrogen, Life Technologies). Slides were examined on a FluoView 1200 Confocal Microscope (Olympus) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Complutense University of Madrid.

### Proliferation assays

A specific kit from Roche Diagnostics, BrdU Labeling and Detection Kit III, was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Briefly, after 4 days of stimulation the cultures were pulsed for 12 h with 10 μM 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), the labeling medium was removed, and cells were dried (2 h at 60°C), fixed in ethanol in HCl (0.5 M) for 30 min at -20°C, treated with nucleases (30 min at 37°C), and then incubated with peroxidase-conjugated Fab fragments of mouse anti-BrdU (30 min at 37°C). The peroxidase reaction was developed with ABTS substrate, and the sample absorbance was measured using an ELISA reader (ELX800MB, Bio-Teck Instruments) at 405 nm with a reference wavelength at 492 nm. As an alternative, isolated naive CD4<sup>+</sup> T cells were labeled with 5 μM CFSE (Sigma-Spain) to determinate their proliferative response at the indicated time points by the CFSE dilution method. Determination by flow cytometry of the percentage of cells in each stage of the cell cycle was carried out using the fluorochrome Hoechst 33342 (Invitrogen, Life Technologies). Cells were harvested and fixed with BD CellFIX (BD Biosciences) for at least 30 minutes at 2–4°C and permeabilized in PBS 1% BSA 30% ethanol in the presence of Hoechst at a final

concentration of 0.1 mg/ml. After 45 minutes of incubation at room temperature, cells were analyzed in a LSR-II flow cytometer (BD Bioscience) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia. Aggregates were excluded based on the width and the area of Hoechst's signal and the percentage of cells in the stages G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y S/G<sub>2</sub>/M was calculated.

### Apoptosis assays

Naive CD4<sup>+</sup> T cells were cultured with monoclonal antibodies anti-CD3/anti-CD28 or in complete culture media alone, or supplemented with IL-7 [5 ng/ml], in the presence of DMSO or DMH1 at the indicated doses. The proportion of apoptotic cells was determined by staining with Annexin-V-FITC (BD Biosciences), according to the supplier's instructions. Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia) and gated according to forward scatter, side scatter, and their ability to exclude propidium iodide. Cell viability was calculated as percentage of Annexin-V-negative/propidium iodide-negative cells.

### Cytokine measurements

Culture supernatants of TCR-stimulated T cells were harvested at the indicated time points and levels of IL-2 were assayed by ELISA (BioLegend).

### Statistical analysis

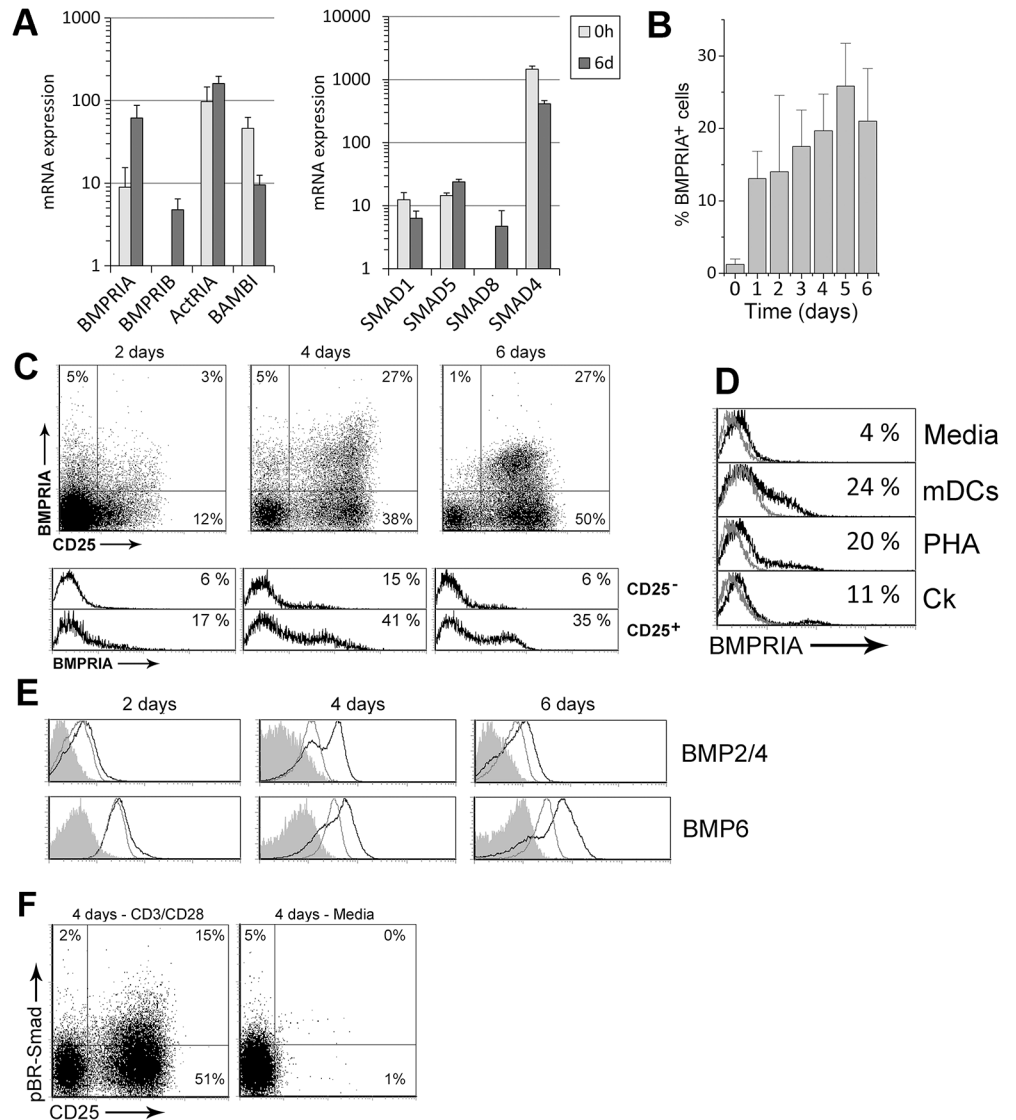
The Student *t* test was used for statistical analysis. Values of  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*) and  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) were considered to be statistically significant.

## Results

### Induction of BMP signaling during TCR-triggered activation of naive CD4<sup>+</sup> T cells

To investigate whether BMP signaling is activated in naive CD4<sup>+</sup> T cells by TCR stimulation, we first analyzed the expression of several components of the canonical BMP pathway. We detected on freshly isolated naive CD4<sup>+</sup> T cells the expression of the specific downstream effector molecules for the BMP signaling pathway, Smad-1, and -5, as well as the common Smad or Smad-4, that were also present after 6 days of activation with anti-CD3/CD28 mAbs (Fig 1A). In addition, transcription of the specific BMP receptors type I (BMPRIA, BMPRIB and ActRIA) and Smad-8 was induced in activated T cells while levels for the pseudoreceptor BAMBI were decreased compared with ex vivo (Fig 1A).

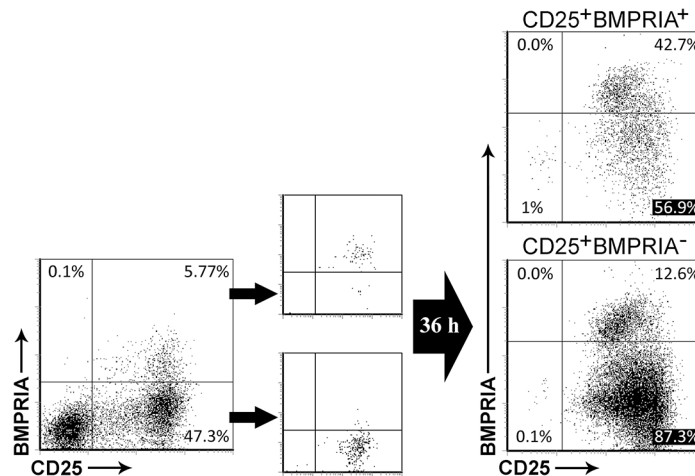
Among BMP receptors type I, BMPRIA is one of the most characterized. Its expression is found in several cell types including thymocytes [8, 11], peripheral CD4<sup>+</sup> T cells and the Jurkat TAg cell line [13]. When the expression of BMPRIA was studied by flow cytometry in naive CD4<sup>+</sup> T cells we found a rapid induction after only one day of culture with anti-CD3/CD28. BMPRIA expression was then increased throughout the culture reaching a maximum of 25% of positive cells at day 5 (Fig 1B). Furthermore, BMPRIA expression was mainly associated with that of the activation marker CD25, indicating that BMPRIA was preferentially expressed by those cells that responded to the stimulation (Fig 1C). We next investigated whether the induction of BMPRIA could be observed when other stimuli were used, finding that BMPRIA was induced in all cases. Besides treatment with PHA and co-culture with mature dendritic cells, BMPRIA surface expression was also slightly induced in naive CD4<sup>+</sup> T cells by a TCR-independent stimulation such as exposure to pro-inflammatory cytokines (Fig 1D).



**Fig 1. BMP signaling is activated by TCR stimulation in naive CD4<sup>+</sup> T cells.** Freshly isolated human peripheral blood naive CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with anti-CD3/CD28 mAb. (A) Transcripts for several components of the canonical BMP signaling pathway were determined by real-time PCR ex vivo (0h) or after 6 days of stimulation (6d). *GNB2L1* was used as endogenous control. Means  $\pm$  SD of at least three independent experiments run in duplicates are shown. Note the logarithmic scale on y-axis. (B) Percentage of BMPRIA<sup>+</sup> cells detected by flow cytometry throughout the culture. Bars represent the mean  $\pm$  SD of two to five independent experiments. (C) Expression of BMPRIA and CD25 in T cells (upper dot plots) and differential expression of BMPRIA in the CD25<sup>-</sup> and CD25<sup>+</sup> cell populations (lower histograms) during activation. A representative experiment out of four is shown. (D) Expression of BMPRIA in T cells cultured with different stimuli. Grey histograms represent isotype controls. Similar stainings were obtained in two to three independent experiments. mDCs: mature dendritic cells; PHA: Phytohaemagglutinin; Ck: cytokine cocktail (rhIL-2, rhIL-6, rhTNF- $\alpha$ ) (E) Determination of BMP2/4 and BMP6 production by flow cytometry in T cells cultured in media alone (grey histograms) or in the presence of anti-CD3/CD28 mAb (black histograms). Grey filled histograms represent isotype control stainings. A representative experiment out of three is shown. (F) Expression of CD25 and phosphorylated BR-Smad (pBR-Smads) during activation. For comparison, T cells were kept in culture media alone. Results are representative of three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0131453.g001

The production of BMP ligands in TCR-activated naive CD4<sup>+</sup> T cells was also determined by intracellular flow cytometry staining at different time points. Both BMP2/4 and BMP6



**Fig 2. BMPRIA expression during CD4<sup>+</sup> T cell activation.** After 4 days of culture, TCR-activated T cells were stained for CD25 and BMPRIA and the CD25<sup>+</sup>BMPRIA<sup>-</sup> and CD25<sup>+</sup>BMPRIA<sup>+</sup> cell populations were isolated by cell sorting. The sorted populations were then re-stimulated with anti-CD3/CD28 mAb and the expression of CD25 and BMPRIA was evaluated by flow cytometry after 36 hours of culture. A representative experiment out of two is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0131453.g002

production was induced by anti-CD3/CD28 stimulation when compared to unstimulated cells, following similar kinetics until 4 days of culture (Fig 1E), when approximately one third of the stimulated cells were positive for these ligands. However, while BMP2/4 expression tended to fade at day 6 of stimulation, BMP6 remained even higher compared to day 4 (Fig 1E).

As it could be expected, CD3/CD28 crosslinking efficiently induced the activation of the BR-Smads (Fig 1F). Phosphorylated BR-Smad (pBR-Smad) positive cells appeared preferentially in the CD25<sup>+</sup> compartment after TCR stimulation and were absent in T cells cultured in media alone. Collectively, the results shown above suggest that TCR stimulation of human naive CD4<sup>+</sup> T cells triggers the canonical BMP signaling in an autocrine fashion.

### BMPRIA expression pattern during CD4<sup>+</sup> T cell activation

To test the possibility that a non-previously described minor subpopulation of naive CD4<sup>+</sup> T cells expressing BMPRIA could be expanding during anti-CD3/CD28 stimulation, CD25<sup>+</sup> T cells were sorted after 4 days of activation according to BMPRIA expression. As shown in Fig 2, after 36 hours of re-stimulation with anti-CD3/CD28 more than half of the sorted CD25<sup>+</sup> BMPRIA<sup>+</sup> cells lost the expression of BMPRIA while maintaining that for CD25. On the other hand, more than 10% of BMPRIA<sup>+</sup> cells appeared after re-stimulation of the CD25<sup>+</sup>BMPRIA<sup>-</sup> cell subpopulation.

Endocytosis of BMP receptors once they bind their ligand is known to be a critical step for BMP signaling [27]. Moreover, BMP receptors undergo constitutive endocytosis in mammal cells [28]. We therefore analyzed the cytoplasmic expression of BMPRIA by flow cytometry and compared it with its surface expression. While very few naive CD4<sup>+</sup> T cells exhibited BMPRIA in their surface *ex vivo*, the majority of this population of T cells was positive for BMPRIA when intracellular staining was performed (Figure A in S1 Fig). These results were confirmed by immunofluorescence (Figure B in S1 Fig) and suggest that the percentage of cells which potentially could respond to BMP ligands seems to exceed what would be expected by only analyzing the surface expression of BMPRIA.

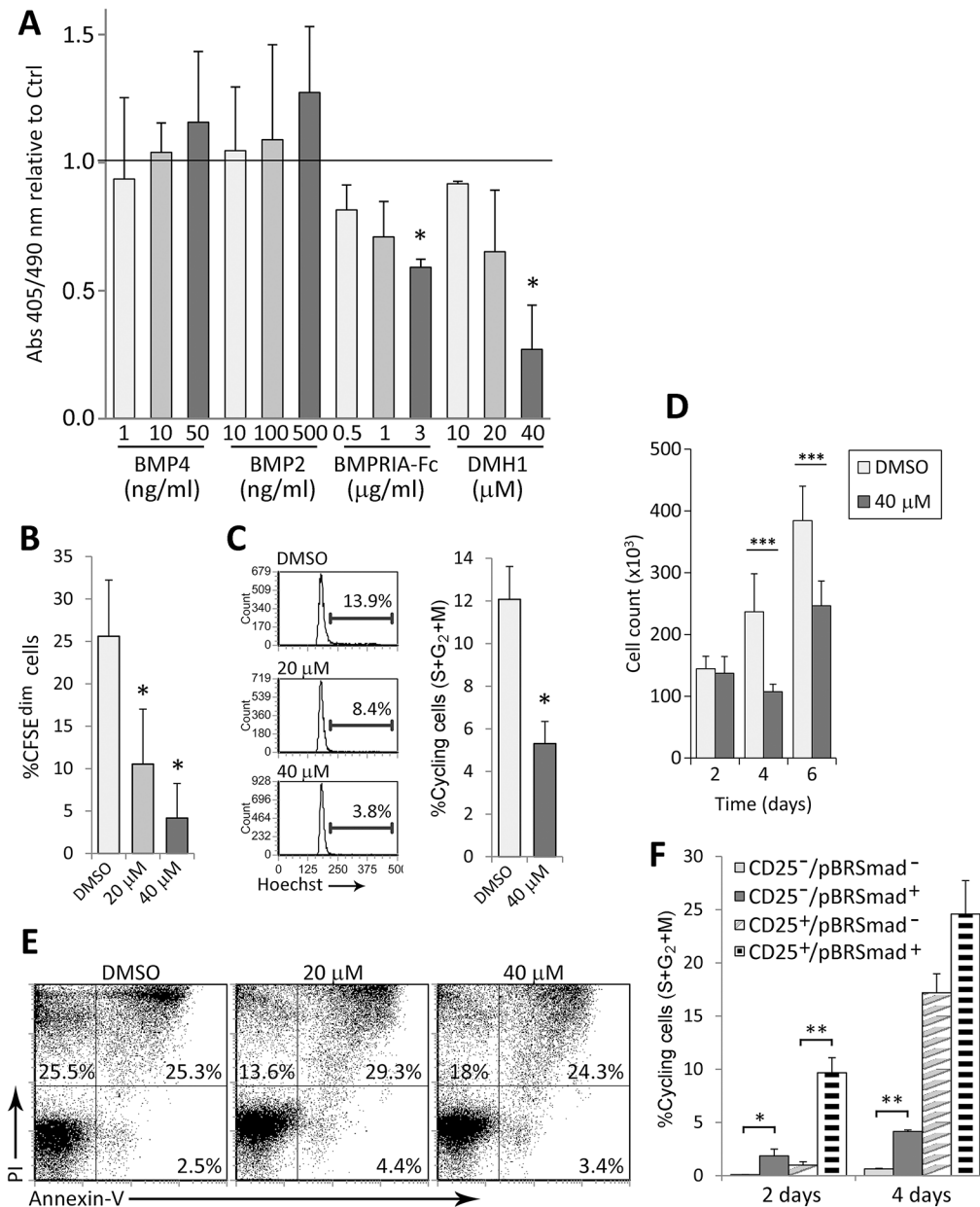
## Autocrine canonical BMP signaling regulates TCR-induced proliferation in naive CD4<sup>+</sup> T cells

As a first approach, we analyzed whether modifications of BMP signaling could affect the proliferation of T cells. BMP signaling was activated by addition of exogenous BMP2 and BMP4, the only two members of the BMP2/4 subgroup which has shown the highest affinity for BMPRIA [2]. In parallel, BMP signaling was inhibited by two means: blocking soluble BMPs by addition of the recombinant human BMPR-IA/ALK-3 Fc chimera, and inhibiting BR-Smad phosphorylation by BMP receptors type I with the inhibitor DMH1 [26]. As shown in Fig 3A, the addition of BMP2 and BMP4 slightly increased BrdU incorporation at day 4 of culture, although no statistical significance was reached. On the contrary, and supporting an autocrine role for BMP signaling pathway, both BMPRIA-Fc and DMH1 negatively affected the proliferative response of T cells, being this effect greater with the BMP inhibitor DMH1 (Fig 3A). The impairment of proliferation induced by BMP signaling blockade was confirmed by CFSE loss, showing that the presence of the BMP inhibitor DMH1 reduced the proliferative response induced by anti-CD3/CD28 stimulation by nearly an 80% with the highest dose (Fig 3B). This effect was dose-dependent and mainly caused by G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest, since the percentage of cycling cells was reduced by more than half in DMH1-treated cells (Fig 3C). Accordingly, the effects on cell cycle progression induced by DMH1 correlated well with the number of cells recovered after stimulation, being these numbers markedly lower in DMH1-treated cultures compared to control cultures (Fig 3D). It must be noted that the inhibition of proliferation induced by DMH1 treatment was not caused by exacerbated apoptosis, neither by toxic effects, since no remarkable differences were observed when cell viability was analyzed (Fig 3E).

To study more deeply the relationship between BMP signaling and T cell proliferation, we performed the detection of intracellular pBR-Smads combined with the surface expression of CD25 and DNA staining with Hoechst. Supporting the positive role of the canonical BMP signaling in TCR-induced T cell proliferation, the expression of pBR-Smads correlated with cell cycle progression (Fig 3F). Specifically, a higher percentage of cycling cells was found within the pBR-Smad<sup>+</sup> compartment in both the CD25<sup>-</sup> and CD25<sup>+</sup> cell populations at day 2. In contrast, after 4 days of culture, when IL-2 levels are elevated, only the CD25<sup>-</sup> cell population showed statistically significant correlation between pBR-Smads expression and Hoechst staining (Fig 3F).

## IL-2 production is impaired by inhibition of autocrine BMP signaling during T cell activation

Secretion of IL-2 by T cells during activation is crucial for their own proliferation. We therefore determined the production of IL-2 in these cultures finding that DMH1 treatment had a negative impact on IL-2 levels after 4 days of culture. Specifically, canonical BMP signaling blockade affected IL-2 production in a dose-dependent manner reaching a maximum of 80% of inhibition when the highest dose of DMH1 was used (Fig 4A). In addition, *IL2* transcription as well as IL-2 protein secretion were impaired by DMH1 treatment as soon as 2 days after TCR stimulation (Fig 4B). On the contrary, no effects in the expression of CD25 were observed at this time point (data not shown). To better understand the role of IL-2 in the inhibition induced by DMH1, rhIL-2 was added at different doses together with DMH1 and the proliferative response was measured by CFSE loss. As expected, increasing concentrations of rhIL-2 partially counteracted the inhibiting effects of DMH1, being the highest dose of rhIL-2 able to fully restore the proliferative response of T cells (Fig 4C).

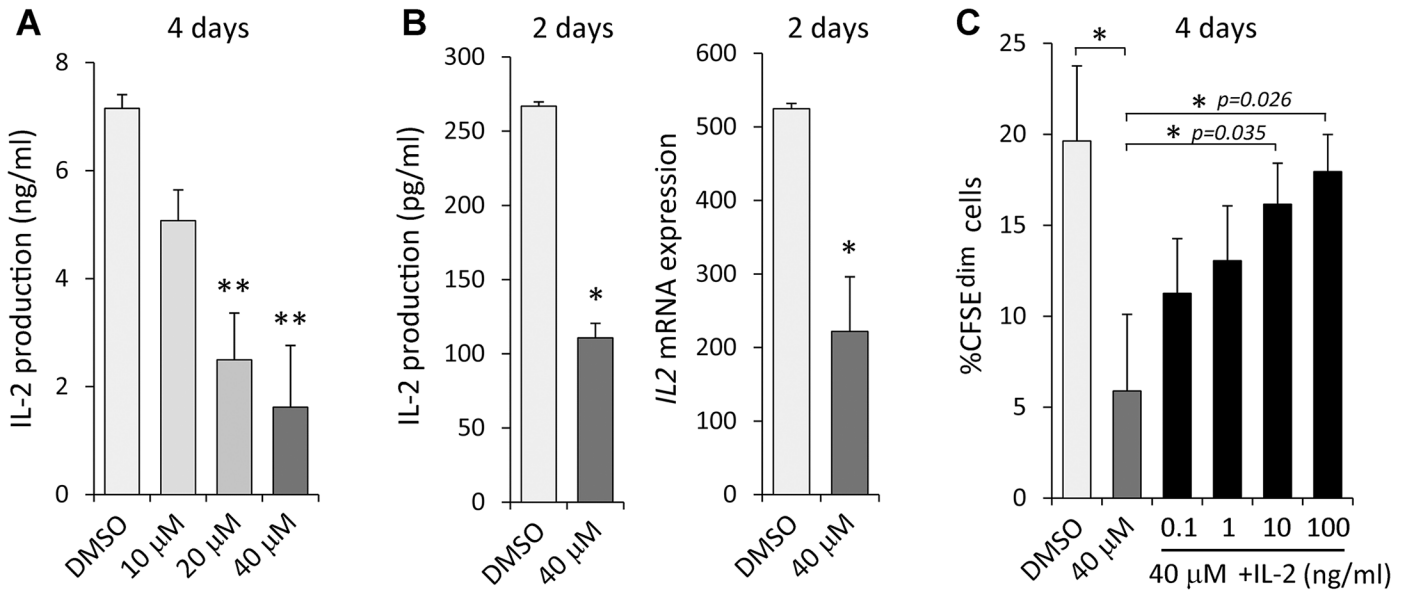


**Fig 3. Canonical BMP pathway inhibition impairs T cell proliferation.** (A) BrdU incorporation after 4 days of TCR stimulation with the indicated treatments. Results are represented as absorbance relative to control (horizontal bar). Means  $\pm$  SD of two independent experiments run in duplicates are shown (\*  $p \leq 0.05$ ; by *t* test). Control refers to no treatment for BMP2 and BMP4, unspecific immunoglobulins for BMPRIA-Fc and DMSO for DMH1. (B-D) After 4 days of TCR stimulation in the presence of DMSO or DMH1, the proliferation rate, measured by CFSE loss (B), Hoechst staining (C) and number of cells recovered (D), and the percentage of apoptotic/necrotic cells (E) were analyzed by flow cytometry. Bars represent means  $\pm$  SD of five independent experiments (\*  $p \leq 0.05$ ; by *t* test). Cell counts were performed in duplicates and the means  $\pm$  SD of at least 4 independent experiments are shown. Histograms in (C) and dot plots in (E) correspond to one representative experiment. (F) Cells were harvested at the indicated time points and stained for CD25, phosphorylated Smad-1/5/8 (pBR-Smad) and Hoechst. Cell populations were defined according to the expression of CD25 and pBR-Smad and the percentage of Hoechst positive cells was determined for each subset. Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; by *t* test).

doi:10.1371/journal.pone.0131453.g003

### BMP signaling is autocrinally triggered by IL-7 in naive CD4<sup>+</sup> T cells

Our results pointed out a tight relationship between autocrine BMP signaling and activation-induced T cell proliferation. Hence, we next wondered whether the BMP signaling pathway



**Fig 4. DMH1 effects on IL-2 expression.** TCR-induced IL-2 production by T cells in the presence of DMSO or DMH1 at day 4 (A) and 2 (B, left graph). (B, right graph) mRNA expression for *IL2* after 2 days of activation. *GNB2L1* was used as endogenous control. Means  $\pm$  SD of three to five independent experiments performed in duplicates are shown (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; by *t* test). (C) Proliferation rate measured by CFSE loss in T cells after 4 days of TCR stimulation with DMSO, DMH1 alone or DMH1 supplemented with the indicated doses of rhIL-2. Bars represent the means  $\pm$  SD of three independent experiments (\*  $p \leq 0.05$ ; by *t* test).

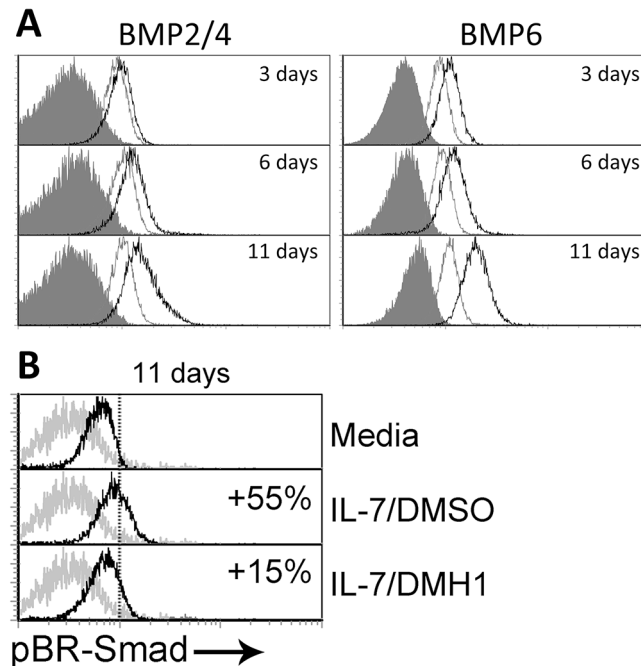
doi:10.1371/journal.pone.0131453.g004

could be acting in a different process also associated with proliferation. In this regard, IL-7 is a well known key factor regulating the homeostasis of naive and memory T cells and capable of inducing the so-called homeostatic proliferation of both subsets [20]. When naive T cells were cultured in the presence of IL-7, production of BMP ligands BMP2/4 and BMP6 was progressively induced throughout the culture (Fig 5A). Expression of these ligands showed a homogeneous pattern suggesting that the majority of the cells were responding to IL-7 stimulation in terms of BMP production. Accordingly, levels of pBR-Smads were increased by 55% compared to cells cultured in media alone at day 11, while addition of the DMH1 inhibitor mostly inhibited BR-Smad phosphorylation (Fig 5B).

### Canonical BMP signaling is necessary for IL-7-induced homeostatic proliferation

In order to analyze the implication of the BMP pathway in IL-7-induced T cell homeostasis, we first studied the progression of IL-7 cultures in terms of cell numbers. As shown in Fig 6A, while recovery of naive CD4<sup>+</sup> T cells cultured in media alone tended to rapidly decrease, cell numbers in cultures supplemented with IL-7 were even slightly increased. Nevertheless, in the presence of the BMP inhibitor DMH1, stimulation with IL-7 failed to maintain cell numbers throughout the culture, revealing a role for the BMP pathway in IL-7-induced homeostasis. Remarkably, the addition of DMH1 to these cultures did not affect the downregulation of the high affinity IL-7 receptor CD127 that normally occurs when IL-7 signaling is triggered, suggesting that activation of IL-7 signaling was not being impaired (Fig 6B).

The role of the autocrine canonical BMP signaling in the proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cell induced by IL-7 was studied in long term cultures. In line with the inhibitory effect of DMH1 treatment on TCR-induced proliferation, the presence of the BMP inhibitor also caused a marked reduction in the proliferative response induced by IL-7 along 20 days of culture (Fig 6C). Proliferation of



**Fig 5. Canonical BMP pathway and IL-7 signaling.** (A) Expression of BMP2/4 and BMP6 was determined by flow cytometry at the indicated time points in T cells cultured in media alone (grey histograms) or in the presence of IL-7 (5 ng/ml) (black histograms). Grey filled histograms represent isotype control stainings. A representative experiment out of four is shown. (B) Differential expression of phosphorylated Smad-1/5/8 (pBR-Smad) analyzed by flow cytometry in naive CD4<sup>+</sup> T cells after 11 days of culture in media alone or supplemented with IL-7 and DMSO or IL-7 and DMH1 (40  $\mu$ M). Percentages represent the increment relative to cultures in media alone. One representative of three independent experiments is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0131453.g005

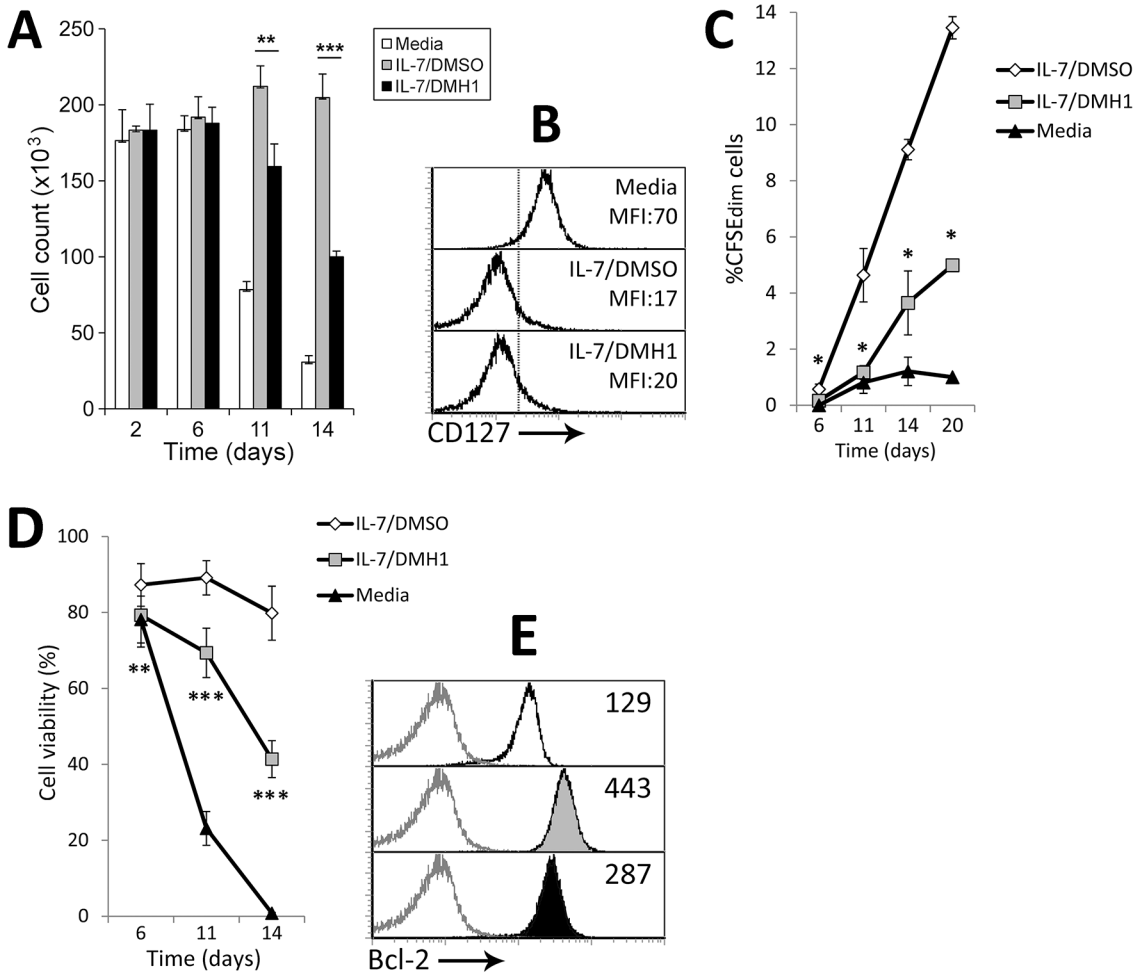
DMH1-treated cells was minimal until day 14 of stimulation, when treated cells began to proliferate always in a lesser extent compared to that observed in DMSO-treated cells (Fig 6C).

### Canonical BMP signaling inhibition impairs the survival of naive CD4<sup>+</sup> T cells induced by IL-7

Because IL-7 is known to be an essential cytokine for the survival of T cells, we studied whether DMH1 treatment could impact the viability of these cells cultured with IL-7. Blockade of canonical BMP signaling during IL-7 stimulation severely affected the survival of T cells along the culture period decreasing the percentage of viable cells from 80% in control DMSO-treated cultures to 40% in DMH1-treated cultures after 14 days of stimulation (Fig 6D). Mechanistically, we found that levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2, commonly induced by IL-7, were decreased in the presence of DMH1 from the beginning of these cultures (Fig 6E), indicating that autocrine BMP signaling would participate in the regulation of IL-7-induced T cell survival through modulation of Bcl-2.

### BMP signaling inhibition affects the modulation of homing receptors induced by IL-7

Given that IL-7 has been described to modulate the expression of several homing receptors in T cells [29], we analyzed whether autocrine BMP signaling could be mediating in this process. DMH1 treatment showed no effects in the regulation of the lymph node homing receptors L-selectin/CD62L and the integrins  $\alpha$ 4/CD49d,  $\alpha$ L/CD11a and  $\beta$ 2/CD18 (Fig 7A). Similar results



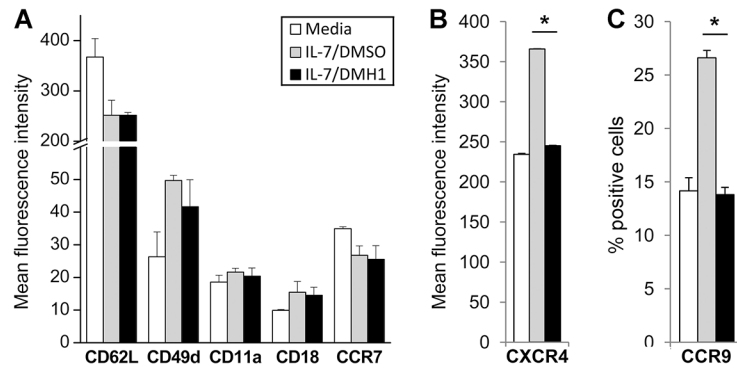
**Fig 6. Effects of BMP pathway blockade on IL-7-induced T cell homeostasis.** (A) Naive CD4<sup>+</sup> T cells cultured in media alone or supplemented with IL-7 and DMSO or IL-7 and DMH1 (40 μM) were harvested and counted at the indicated time points. Cell counts were performed in duplicates. Results represent the mean ± SD of four to twelve samples pooled from at least two independent experiments (\*\* p<0.01; \*\*\* p<0.005; by t test. IL-7/DMSO vs IL-7/DMH1). (B) Differential expression of CD127 analyzed by flow cytometry after 36 hours of culture under the indicated conditions. Similar stainings were obtained in two independent experiments. (C) Proliferation rate measured by CFSE loss along 20 days in T cells cultured in media alone or supplemented with IL-7 and DMSO or IL-7 and DMH1 (40 μM). Means ± SD of four independent experiments are shown (\* p<0.05; by t test. IL-7/DMSO vs IL-7/DMH1). (D) Cell viability calculated as percentage of PI<sup>-</sup>/Annexin-V<sup>-</sup> cells throughout the culture. Means ± SD of four independent experiments are shown (\*\* p<0.01; \*\*\* p<0.005; by t test. IL-7/DMSO vs IL-7/DMH1). (E) Bcl-2 levels determined by flow cytometry after 6 days of culture. White filled histograms represent media alone; grey-filled IL-7/DMSO; black-filled IL-7/DMH1. The mean fluorescence intensity is indicated in each histogram. Similar stainings were obtained in two independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0131453.g006

were obtained for the chemokine receptor CCR7, shown to be important for lymphocyte migration towards lymph nodes (Fig 7A). According to previous results, IL-7 induced the up-regulation of the chemokine receptor CXCR4. Nevertheless, CXCR4 induction was completely abrogated in the presence of DMH1 (Fig 7B). In the same line, IL-7 induction of the gut homing receptor CCR9 was also abolished by canonical BMP signaling inhibition (Fig 7B), showing a very specific impact of this inhibitor on the regulation of homing receptors provoked by IL-7.

## Discussion

The BMPs have emerged during the last decades as multifunctional proteins which regulate essential processes such as differentiation, proliferation and survival in a wide range of cell



**Fig 7. DMH1 effects on IL-7-induced homing receptor modulation.** T cells were cultured in media alone or supplemented with IL-7 and DMSO or IL-7 and DMH1 (40  $\mu$ M) and the expression of several homing receptors (A), CXCR4 (B) and CCR9 (C) was analyzed by flow cytometry after 36 hours of culture. Bars represent the mean  $\pm$  SD of two independent experiments (\*  $p < 0.05$ ; by *t* test. IL-7/DMSO vs IL-7/DMH1).

doi:10.1371/journal.pone.0131453.g007

types. In this study, we describe that BMP signaling mediates the regulation of the proliferation of human naive CD4<sup>+</sup> T cells induced during two crucial events for the biology of these cells: activation and homeostasis.

Regarding T cell activation, we have found that T cells increase the expression of BMP signaling components in response to TCR stimulation. Surface expression of BMPRIA was quickly induced by CD3/CD28 crosslinking and was mainly associated to those cells that responded to the stimulation. Furthermore, we show for the first time that human CD4<sup>+</sup> T cells are capable of producing the ligands BMP2, BMP4 and BMP6 in response to TCR stimulation. Notably, expression of activated BR-Smads was induced upon TCR stimulation, which confirmed that canonical BMP signaling is autocrinally triggered during the activation of T cells. Co-culture with mature dendritic cells and TCR-independent stimulation also induced surface expression of BMPRIA. These results suggest that upregulation of BMP signaling could be an inherent mechanism induced by T cell activation independently of the stimulus. Supporting this data, a previous work showed low expression levels for several BMP receptors in human peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells, being this expression greater in the CD45RA<sup>-</sup> memory T cell compartment [13]. Interestingly, intracellular staining revealed that the moderate percentage of BMPRIA<sup>+</sup> resting CD4<sup>+</sup> T cells could be explained by preferential localization of this protein in intra-vesicular compartments rather than at the cell surface. This phenomenon has also been described in human peripheral blood NK cells [30] and is in line with the fact that BMP receptors undergo constitutive endocytosis even in the absence of ligand [28].

Evidences of a pro-activation role of BMPs in T cells can be found in the literature. For instance, mouse CD4<sup>+</sup> T cells primed in the presence of BMP2 or BMP4 showed higher proliferation when re-stimulated with antigen presenting cells [12]. Also in the mouse model, different members of the TGF- $\beta$  superfamily, including BMPs, are able to increase the production of IFN- $\gamma$  by CD8<sup>+</sup> T cells that takes place during antigen specific responses [14]. Our results show that the proliferative response of naive CD4<sup>+</sup> T cells is regulated at least in part by autocrine canonical BMP signaling. Both ligand neutralization and blockade of BMP receptor kinase activity had a dose-dependent negative effect in the proliferative ratio, mainly caused by G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest, and not by an increment in apoptosis. Furthermore, active BMP signaling was strongly associated with cell cycle progression as early as two days after TCR activation. This association was partially lost in the CD25<sup>+</sup> cell population after 4 days of stimulation, when the IL-2/IL-2R positive feedback is the principal mechanism driving T cell proliferation [31, 32]. This suggests that activation of BMP signaling would be advantageous during the early steps of activation

while would be overcome by IL-2 signaling at later steps. Supporting this idea, we show that BMP signaling blockade results in a strong inhibition of IL-2 expression at both mRNA and protein levels. Moreover, proliferation of DMH1-treated T cells is completely recovered when rhIL-2 is added to these cultures. Yoshioka et al [33] previously reported in mice that treatment with the inhibitor of BMP signaling dorsomorphin also affects the proliferation of T cells induced by TCR stimulation through impairment of IL-2 production. The authors and others have pointed out Runx1, a target gene for BMP signaling, as the transcription factor regulating IL-2 expression in these cells [34], although contradictory results have been published [35]. Also in support for the regulation of IL-2 expression by BMP signaling, it has been shown that BMP2 and BMP4 can increase the frequency and activity of Treg, a Th subset strongly dependent on IL-2 signaling [12]. Taken together, these evidences indicate a role of the canonical BMP signaling in the regulation of T cell proliferation in response to anti-CD3/CD28 stimulation via modulation of IL-2 expression.

The present study denote that autocrine BMP signaling is likewise involved in the proliferation of human CD4<sup>+</sup> naive T cells mediated by IL-7, a crucial factor for the homeostasis of these cells [20]. IL-7 stimulation induced BMP2, 4 and 6 production and the consequent activation of BR-Smads on T cells, which was abolished when DMH1 was present. Inhibition of BMP signaling negatively affected the IL-7-regulated homeostasis of T cells by two means: reducing cell survival, one of the hallmarks of IL-7 signaling on T cells, and impairing the so-called homeostatic proliferation. A direct role of BMPs regulating cell proliferation has been extensively described in several cell types including thymocytes [8, 9], B cells [36] and mature T cells [12, 13, 33]. Among the mechanisms mediating in this process, several authors have pointed out the cell cycle inhibitor p27kip1 as a target for BMP signaling [33, 37–41]. Furthermore, p27kip1 has been shown to play a crucial role in the homeostatic proliferation induced by IL-7 on T cells and T-cell acute lymphoblastic leukemia cells [42, 43]. These evidences may serve as a rational explanation for the lack of proliferation provoked by BMP signaling blockade, although further research will be necessary to prove them right.

On the other hand, autocrine BMP signaling is also involved in the regulation of IL-7-induced cell survival, since DMH1 treatment severely affects the cell viability induced by this cytokine. This effect was probably caused by a failure to upregulate Bcl-2, an anti-apoptotic protein normally induced by IL-7 [44] that is frequently targeted by BMP signaling [45–47]. In addition, either delayed induction or enhanced degradation of Bcl-2 would explain the observed reduction in Bcl-2 protein levels when BMP signaling was inhibited. Of note, addition of BMP4 slightly increased the survival provoked by IL-7 (data not shown), showing opposite effects to those observed when BMP signaling was blocked.

In addition, we have found that the upregulation of the chemokine receptors CXCR4 and CCR9 induced by IL-7 is specifically impaired in the presence of DMH1. Among the range of responses that characterized IL-7 stimulation on T cells, it has been described that this factor could mediate specific T cell migration through the modulation of a number of homing receptors [29]. Our results would suggest the involvement of the BMP pathway in the acquisition of certain migratory capacities in response to IL-7 [48, 49], although further experiments will be required to address this possibility.

The results shown in this study reveal an important role of the canonical BMP signaling in human naive CD4<sup>+</sup> T cell biology that could be valuable for clinical application. On one hand, the implication of BMP signaling in the earliest phases of T cell activation could provide a therapeutic target for lymphoproliferative and autoimmune syndromes, such as graft-versus-host disease and rheumatoid arthritis, in which control of T cell activation is essential. On the other hand, given the direct role that IL-7 signaling plays in augmenting reactivity to self-antigens

during lymphopenia because of excessive levels of IL-7 [50], manipulation of BMP signaling might be considered for prevention of autoimmune diseases in lymphopenic individuals.

## Supporting Information

**S1 Fig. Surface and intracellular immunostaining for BMPRIA in *ex vivo* and stimulated naive CD4<sup>+</sup> T cells.** (Figure A) Determination by flow cytometry of surface (upper dot plots) and intracellular (lower dot plots) BMPRIA expression in CFSE-stained T cells before and after stimulation via TCR. Percentage of CFSE<sup>dim</sup>BMPRIA<sup>+</sup> cells is shown. Results are representative of three independent experiments. (Figure B) Isolated CD4<sup>+</sup> T cells were attached to poly-L-lysine coated glass slides and stained for surface CD4 and surface (upper panels) and intracellular (lower panels) BMPRIA and imaged by confocal microscopy. Similar stainings were obtained in three independent experiments. (TIF)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VGM RS A. Vicente A. Varas. Performed the experiments: VGM LH JV LMF CH. Analyzed the data: VGM RS LH JV LMF CH A. Vicente A. Varas. Wrote the paper: VGM RS A. Vicente A. Varas.

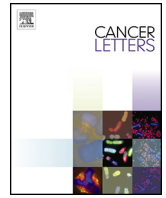
## References

1. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.* 2010; 147(1):35–51. Epub 2009/09/19. doi: [10.1093/jb/mvp148](https://doi.org/10.1093/jb/mvp148) mvp148 [pii]. PMID: [19762341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19762341/).
2. ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, et al. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem.* 1994; 269(25):16985–8. Epub 1994/06/24. PMID: [8006002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8006002/).
3. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16(3):251–63. Epub 2005/05/06. S1359-6101(05)00039-0 [pii] doi: [10.1016/j.cytogfr.2005.01.009](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.009) PMID: [15871923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15871923/).
4. Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, et al. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002; 277(7):5330–8. Epub 2001/11/21. doi: [10.1074/jbc.M102750200](https://doi.org/10.1074/jbc.M102750200) M102750200 [pii]. PMID: [11714695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11714695/).
5. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965; 150(3698):893–9. Epub 1965/11/12. PMID: [5319761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5319761/).
6. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev.* 1996; 6(4):432–8. Epub 1996/08/01. S0959-437X(96)80064-5 [pii]. PMID: [8791534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8791534/).
7. Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Borgermann JH, Graf D, Knaus P. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal.* 2010; 3(107):mr1. Epub 2010/02/04. doi: [10.1126/scisignal.3107mr1](https://doi.org/10.1126/scisignal.3107mr1) scisignal.3107mr1 [pii]. PMID: [20124549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20124549/).
8. Cejalvo T, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Diez B, Gutierrez-Frias C, Valencia J, et al. Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. *Immunology.* 2007; 121(1):94–104. Epub 2007/04/12. IMM2541 [pii] doi: [10.1111/j.1365-2567.2007.02541.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02541.x) PMID: [17425602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17425602/); PubMed Central PMCID: PMC2265915.
9. Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, et al. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol.* 2002; 169(10):5496–504. Epub 2002/11/08. PMID: [12421925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12421925/).
10. Hager-Theodorides AL, Ross SE, Sahni H, Mishina Y, Furmanski AL, Crompton T. Direct BMP2/4 signaling through BMP receptor IA regulates fetal thymocyte progenitor homeostasis and differentiation to CD4+CD8+ double-positive cell. *Cell Cycle.* 2014; 13(2):324–33. Epub 2013/11/19. doi: [10.4161/cc.27118](https://doi.org/10.4161/cc.27118) 27118 [pii]. PMID: [24240189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24240189/); PubMed Central PMCID: PMC3906248.
11. Varas A, Sacedon R, Hidalgo L, Martinez VG, Valencia J, Cejalvo T, et al. Interplay between BMP4 and IL-7 in human intrathymic precursor cells. *Cell Cycle.* 2009; 8(24):4119–26. Epub 2009/11/20. doi: [10.1499](https://doi.org/10.1499) [pii]. PMID: [19923894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19923894/).

12. Lu L, Ma J, Wang X, Wang J, Zhang F, Yu J, et al. Synergistic effect of TGF-beta superfamily members on the induction of Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol.* 2010; 40(1):142–52. Epub 2009/11/28. doi: [10.1002/eji.200939618](https://doi.org/10.1002/eji.200939618) PMID: [19943263](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19943263/); PubMed Central PMCID: PMC2837277.
13. Sivertsen EA, Huse K, Hystad ME, Kersten C, Smeland EB, Myklebust JH. Inhibitory effects and target genes of bone morphogenetic protein 6 in Jurkat TAg cells. *Eur J Immunol.* 2007; 37(10):2937–48. Epub 2007/09/28. doi: [10.1002/eji.200636759](https://doi.org/10.1002/eji.200636759) PMID: [17899540](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17899540/).
14. Takai S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Saio M, Takami T, Kozawa O. TGF-beta superfamily enhances the antigen-induced IFN-gamma production by effector/memory CD8+ T cells. *Int J Mol Med.* 2010; 25(1):105–11. Epub 2009/12/04. PMID: [19956908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19956908/).
15. Xu X, Zhang S, Li P, Lu J, Xuan Q, Ge Q. Maturation and emigration of single-positive thymocytes. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013:282870. Epub 2013/11/05. doi: [10.1155/2013/282870](https://doi.org/10.1155/2013/282870) PMID: [24187562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24187562/); PubMed Central PMCID: PMC3804360.
16. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:591–619. Epub 2009/01/10. doi: [10.1146/annurev.immunol.021908.132706](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132706) 10.1146/annurev.immunol.021908.132706 [pii]. PMID: [19132916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19132916/); PubMed Central PMCID: PMC2740335.
17. Palmer DB. The effect of age on thymic function. *Front Immunol.* 2013; 4:316. Epub 2013/10/11. doi: [10.3389/fimmu.2013.00316](https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00316) PMID: [24109481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24109481/); PubMed Central PMCID: PMC3791471.
18. Murray JM, Kaufmann GR, Hodgkin PD, Lewin SR, Kelleher AD, Davenport MP, et al. Naive T cells are maintained by thymic output in early ages but by proliferation without phenotypic change after age twenty. *Immunol Cell Biol.* 2003; 81(6):487–95. Epub 2003/11/26. 1191 [pii] doi: [10.1046/j.1440-1711.2003.01191.x](https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2003.01191.x) PMID: [14636246](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14636246/).
19. Borghans JA, de Boer RJ. Quantification of T-cell dynamics: from telomeres to DNA labeling. *Immunol Rev.* 2007; 216:35–47. Epub 2007/03/21. IMR497 [pii] doi: [10.1111/j.1600-065X.2007.00497.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00497.x) PMID: [17367333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17367333/).
20. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 2008; 29(6):848–62. Epub 2008/12/23. doi: [10.1016/j.immuni.2008.11.002](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.11.002) S1074-7613(08)00506-2 [pii]. PMID: [19100699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19100699/).
21. Catalfamo M, Di Mascio M, Hu Z, Srinivasula S, Thaker V, Adelsberger J, et al. HIV infection-associated immune activation affects CD4 by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(50):19851–6. Epub 2008/12/09. doi: [10.1073/pnas.0810032105](https://doi.org/10.1073/pnas.0810032105) 0810032105 [pii]. PMID: [19060209](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19060209/); PubMed Central PMCID: PMC2596741.
22. Mancebo E, Clemente J, Sanchez J, Ruiz-Contreras J, De Pablos P, Cortezon S, et al. Longitudinal analysis of immune function in the first 3 years of life in thymectomized neonates during cardiac surgery. *Clin Exp Immunol.* 2008; 154(3):375–83. Epub 2008/09/25. doi: [10.1111/j.1365-2249.2008.03771.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03771.x) CEI3771 [pii]. PMID: [18811694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18811694/); PubMed Central PMCID: PMC2633228.
23. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Roux A, Gorochov G, Katlama C, et al. Lymphopenia-driven homeostatic regulation of naive T cells in elderly and thymectomized young adults. *J Immunol.* 2012; 189(12):5541–8. Epub 2012/11/09. doi: [10.4049/jimmunol.1201235](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201235) jimmunol.1201235 [pii]. PMID: [23136199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23136199/).
24. Martinez VG, Hidalgo L, Valencia J, Hernandez-Lopez C, Entrena A, del Amo BG, et al. Autocrine activation of canonical BMP signaling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2014; 44(4):1031–8. Epub 2014/02/18. doi: [10.1002/eji.201343693](https://doi.org/10.1002/eji.201343693) PMID: [24532425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24532425/).
25. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babbitt JL, Deng DY, Hoyng SA, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol.* 2008; 4(1):33–41. Epub 2007/11/21. nchembio.2007.54 [pii] doi: [10.1038/nchembio.2007.54](https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.54) PMID: [18026094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18026094/); PubMed Central PMCID: PMC2727650.
26. Hao J, Ho JN, Lewis JA, Karim KA, Daniels RN, Gentry PR, et al. In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. *ACS Chem Biol.* 2010; 5(2):245–53. Epub 2009/12/22. doi: [10.1021/cb9002865](https://doi.org/10.1021/cb9002865) PMID: [20020776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20020776/); PubMed Central PMCID: PMC2825290.
27. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20(5–6):343–55. Epub 2009/11/10. doi: [10.1016/j.cytogfr.2009.10.007](https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.007) S1359-6101(09)00082-3 [pii]. PMID: [19897402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19897402/).
28. Hartung A, Bitton-Worms K, Rechtman MM, Wenzel V, Boergermann JH, Hassel S, et al. Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(20):7791–805. Epub 2006/08/23. MCB.00022-06 [pii] doi: [10.1128/MCB.00022-06](https://doi.org/10.1128/MCB.00022-06) PMID: [16923969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16923969/); PubMed Central PMCID: PMC1636853.
29. Cimbri R, Vassena L, Arthos J, Cicala C, Kehrl JH, Park C, et al. IL-7 induces expression and activation of integrin alpha4beta7 promoting naive T-cell homing to the intestinal mucosa. *Blood.* 2012; 120(13):2610–9. Epub 2012/08/17. blood-2012-06-434779 [pii] doi: [10.1182/blood-2012-06-434779](https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-434779) PMID: [22896005](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22896005/); PubMed Central PMCID: PMC3460683.

30. Robson NC, Hidalgo L, McAlpine T, Wei H, Martinez VG, Entrena A, et al. Optimal effector functions in human natural killer cells rely upon autocrine one morphogenetic protein signaling. *Cancer Res.* 2014; 74(18):5019–31. Epub 2014/07/20. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-13-2845](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2845) 0008-5472.CAN-13-2845 [pii]. PMID: [25038228](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25038228/); PubMed Central PMCID: PMC4167038.
31. Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol.* 1995; 7(3):333–42. Epub 1995/06/01. PMID: [7546397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7546397/).
32. Lin JX, Leonard WJ. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997; 8(4):313–32. Epub 1998/06/10. S135961019700021X [pii]. PMID: [9620644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9620644/).
33. Yoshioka Y, Ono M, Osaki M, Konishi I, Sakaguchi S. Differential effects of inhibition of bone morphogenetic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. *Eur J Immunol.* 2012; 42(3):749–59. Epub 2011/12/07. doi: [10.1002/eji.201141702](https://doi.org/10.1002/eji.201141702) PMID: [22144105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22144105/).
34. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature.* 2007; 446(7136):685–9. Epub 2007/03/23. nature05673 [pii] doi: [10.1038/nature05673](https://doi.org/10.1038/nature05673) PMID: [17377532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17377532/).
35. Wong WF, Kurokawa M, Satake M, Kohu K. Down-regulation of Runx1 expression by TCR signal involves an autoregulatory mechanism and contributes to IL-2 production. *J Biol Chem.* 2011; 286(13):11110–8. Epub 2011/02/05. doi: [10.1074/jbc.M110.166694](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.166694) M110.166694 [pii]. PMID: [21292764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21292764/); PubMed Central PMCID: PMC3064165.
36. Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol.* 2005; 6:9. Epub 2005/05/10. 1471-2172-6-9 [pii] doi: [10.1186/1471-2172-6-9](https://doi.org/10.1186/1471-2172-6-9) PMID: [15877825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15877825/); PubMed Central PMCID: PMC1134658.
37. Fu S, Lv HB, Liu Y, Zhao Y, He LS, Jin Y. Transfection of truncated bone morphogenetic protein receptor-II into oral squamous cell carcinoma cell line Tca8113 and inhibitory effect on proliferation and inductive effect on apoptosis. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40(6):490–6. Epub 2011/04/19. doi: [10.1111/j.1600-0714.2010.00988.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00988.x) PMID: [21496104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21496104/).
38. Guo M, Jiang Z, Zhang X, Lu D, Ha AD, Sun J, et al. miR-656 inhibits glioma tumorigenesis through repression of BMPR1A. *Carcinogenesis.* 2014; 35(8):1698–706. Epub 2014/02/01. doi: [10.1093/carcin/bgu030](https://doi.org/10.1093/carcin/bgu030) bgu030 [pii]. PMID: [24480809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24480809/).
39. Icli B, Wara AK, Moslehi J, Sun X, Plovie E, Cahill M, et al. MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling. *Circ Res.* 2013; 113(11):1231–41. Epub 2013/09/21. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.113.301780](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301780) CIRCRESAHA.113.301780 [pii]. PMID: [24047927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24047927/); PubMed Central PMCID: PMC4068743.
40. Lee MY, Lim HW, Lee SH, Han HJ. Smad, PI3K/Akt, and Wnt-dependent signaling pathways are involved in BMP-4-induced ESC self-renewal. *Stem Cells.* 2009; 27(8):1858–68. Epub 2009/06/23. doi: [10.1002/stem.124](https://doi.org/10.1002/stem.124) PMID: [19544418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19544418/).
41. Zhou J, Lee PL, Tsai CS, Lee CI, Yang TL, Chuang HS, et al. Force-specific activation of Smad1/5 regulates vascular endothelial cell cycle progression in response to disturbed flow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(20):7770–5. Epub 2012/05/03. doi: [10.1073/pnas.1205476109](https://doi.org/10.1073/pnas.1205476109) 1205476109 [pii]. PMID: [22550179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22550179/); PubMed Central PMCID: PMC3356658.
42. Barata JT, Cardoso AA, Nadler LM, Boussiotis VA. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). *Blood.* 2001; 98(5):1524–31. Epub 2001/08/25. PMID: [11520803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11520803/).
43. Li WQ, Jiang Q, Aleem E, Kaldis P, Khaled AR, Durum SK. IL-7 promotes T cell proliferation through destabilization of p27Kip1. *J Exp Med.* 2006; 203(3):573–82. Epub 2006/02/24. jem.20051520 [pii] doi: [10.1084/jem.20051520](https://doi.org/10.1084/jem.20051520) PMID: [16492801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16492801/); PubMed Central PMCID: PMC2118250.
44. Kim HR, Hwang KA, Park SH, Kang I. IL-7 and IL-15: biology and roles in T-Cell immunity in health and disease. *Crit Rev Immunol.* 2008; 28(4):325–39. Epub 2009/01/27. 688dfcf94a7500a-c,0989e04368d165f5 [pii]. PMID: [19166383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19166383/).
45. Barneda-Zahonero B, Minano-Molina A, Badiola N, Fado R, Xifro X, Saura CA, et al. Bone morphogenetic protein-6 promotes cerebellar granule neurons survival by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Mol Biol Cell.* 2009; 20(24):5051–63. Epub 2009/10/23. doi: [10.1091/mbc.E09-05-0424](https://doi.org/10.1091/mbc.E09-05-0424) E09-05-0424 [pii]. PMID: [19846661](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19846661/); PubMed Central PMCID: PMC2793283.
46. Guan J, Li H, Lv T, Chen D, Yuan Y, Qu S. Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) mediates ischemic preconditioning-induced ischemic tolerance via attenuating apoptosis in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 441(3):560–6. Epub 2013/11/05. doi: [10.1016/j.bbrc.2013.10.121](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.121) S0006-291X(13)01812-3 [pii]. PMID: [24184479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24184479/).
47. Martinez VG, Hernandez-Lopez C, Valencia J, Hidalgo L, Entrena A, Zapata AG, et al. The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunol Cell*

- Biol. 2011; 89(5):610–8. Epub 2010/11/26. doi: [10.1038/icb.2010.135](https://doi.org/10.1038/icb.2010.135) icb2010135 [pii]. PMID: [21102536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21102536/).
48. Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Forster R, Lipp M, Littman DR, et al. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med*. 2002; 196(1):65–75. Epub 2002/07/03. PMID: [12093871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12093871/); PubMed Central PMCID: PMC2194009.
  49. Stenstad H, Ericsson A, Johansson-Lindbom B, Svensson M, Marsal J, Mack M, et al. Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4+ T cells display CCR9-dependent and-independent homing to the small intestine. *Blood*. 2006; 107(9):3447–54. Epub 2006/01/05. 2005-07-2860 [pii] doi: [10.1182/blood-2005-07-2860](https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2860) PMID: [16391017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16391017/).
  50. Lundstrom W, Fewkes NM, Mackall CL. IL-7 in human health and disease. *Semin Immunol*. 2012; 24(3):218–24. Epub 2012/03/14. doi: [10.1016/j.smim.2012.02.005](https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.02.005) S1044-5323(12)00020-6 [pii]. PMID: [22410365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22410365/); PubMed Central PMCID: PMC3358500.



## Original Articles

# Mesenchymal stem cells derived from low risk acute lymphoblastic leukemia patients promote NK cell antitumor activity



Ana Entrena <sup>a</sup>, Alberto Varas <sup>a</sup>, Miriam Vázquez <sup>a</sup>, Gustavo J. Melen <sup>b</sup>, Lidia M. Fernández-Sevilla <sup>a</sup>, Javier García-Castro <sup>c</sup>, Manuel Ramírez <sup>b</sup>, Agustín G. Zapata <sup>d</sup>, Ángeles Vicente <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, School of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Oncohematology, Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Cellular Biotechnology Unit, Institute for Health Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 January 2015

Received in revised form 30 March 2015

Accepted 10 April 2015

## Keywords:

Mesenchymal stem cells

Acute lymphoblastic leukemia

NK cells

Tumor microenvironment

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are key components of the bone marrow microenvironment which contribute to the maintenance of the hematopoietic stem cell niche and exert immunoregulatory functions in innate and adaptive immunity. We analyze the immunobiology of MSCs derived from acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients and their impact on NK cell function. In contrast to the inhibitory effects on the immune response exerted by MSCs from healthy donors (Healthy-MSCs), we demonstrate that MSCs derived from low/intermediate risk ALL patients at diagnosis (ALL-MSCs) promote an efficient NK cell response including cytokine production, phenotypic activation and most importantly, cytotoxicity. Longitudinal studies indicate that these immunostimulatory effects of ALL-MSCs are progressively attenuated. Healthy-MSCs adopt ALL-MSC-like immunomodulatory features when exposed to leukemia cells, acquiring the ability to stimulate NK cell antitumor function. The mechanisms underlying to these functional changes of ALL-MSCs include reduced production of soluble inhibitory factors, differential expression of costimulatory and coinhibitory molecules, increased expression of specific TLRs and Notch pathway activation. Collectively our findings indicate that, in response to leukemia cells, ALL-MSCs could mediate a host beneficial immunomodulatory effect by stimulating the antitumor innate immune response.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Different studies have emphasized the relevance of bone marrow microenvironment components in the development and maintenance of hematological malignant disease as facilitators of tumor development [1–5]. One of the key components of the marrow microenvironment are mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs isolated from healthy donors can suppress immune responses affecting a broad range of cells, including T and B lymphocytes, natural killer (NK) cells and dendritic cells (DCs) [6,7]. Therefore, the traditional

view is that the suppression of immune responses by MSCs could facilitate tissue remodeling, repair and control of autoimmune disorders, but would be detrimental for other disease processes such as cancer. However, in this scenario it is necessary to include recent studies suggesting that MSCs possess the dual ability to suppress and also activate the immune system depending on the stimulus. These results suggest that MSCs, like macrophages, can be polarized following specific TLR priming in MSC1, or cells that mostly produce pro-inflammatory mediators, and MSC2 that express mostly immunosuppressive factors [8].

Distinct studies have reported differences in the phenotype, proliferation and differentiation ability, cytokine production or immunomodulatory activity between MSCs isolated from patients with different hematopoietic disorders and healthy donors [5,9–12]. In most cases, these alterations have been suggested to somehow contribute to the pathogenesis of the disease and/or occurrence of relapse; however the progress in this area has been hampered by the inability to propagate human disease in murine xenograft models [13] except a recently published study for myelodysplastic syndromes [5]. Regarding immunomodulatory functions of patient MSCs, the results are very scarce and mainly related

**Abbreviations:** ALL, acute lymphoblastic leukemia; ALL-MSCs, MSCs derived from low/intermediate risk ALL patients at diagnosis; ALL-MSCs+15, MSCs derived from low/intermediate risk ALL patients at 15 days after initiation of therapy; ALL-MSCs+35, MSCs derived from low/intermediate risk ALL patients at 35 days after initiation of therapy; DC, dendritic cells; Healthy-MSCs, MSCs from healthy donors; MSCs, mesenchymal stem cells; NK, natural killer cells; OOT-MSCs, MSCs derived from ALL patients without signs of disease and out of therapy; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 71 66; fax: +34 91 394 13 96.

E-mail address: [avicente@ucm.es](mailto:avicente@ucm.es) (Á. Vicente).

to T-cell regulation. MSCs derived from myeloma or chronic myeloid leukemia patients inhibit T-cell proliferation with significantly less efficiency than control MSCs [14,15]. More recently Wang et al. [16] have described that MSCs from low-risk and high-risk myelodysplastic syndrome patients exhibit different *in vitro* immunomodulatory capacities on DC development. In addition, the treatment of established tumors with primed-MSc attenuated tumor growth and metastasis producing a more robust immune response [17].

NK cells belong to the innate immune system and are potent cytotoxic and cytokine-producing effector cells in response to viruses or malignant cells. Recent advances in the understanding of the molecular mechanisms governing NK cell maturation and activation have allowed to initiate innovative antitumor protocols based on allotransplantation of NK cells, mainly in different types of hematological tumors [18]. In this context, the influence of tumor microenvironment, including MSCs, in the function of both tissue resident and donor allogeneic NK cells is a relevant issue to consider in these antitumor therapies.

Previously, we have described the biological and functional features of MSCs from pediatric patients affected by ALL [12]. In the current study, we define the immunomodulatory behavior of MSCs derived from newly diagnosed low/intermediate-risk ALL patients on NK cells, the major effector cells of the antitumoral innate response. Our results indicate that ALL-MSCs are able to adapt their immunomodulatory properties in a cancer context increasing NK cell cytotoxic activity by different mechanisms, which involve both soluble factors and cell-to-cell contacts, and thus contribute to the clinical characteristics of the disease.

## Materials and methods

### Patients and samples

The study was approved by the Ethic Committee of Clinical Research at Hospital Universitario Niño Jesús and written informed consent was obtained from parents/tutors. Patients were children diagnosed of ALL and treated with the PETHEMA protocol (stands for Spanish Protocol for Malignant Hemopathies) [19,20]. Under this protocol, age, blast counts, chromosomal translocations, ploidy and levels of residual disease at specific timepoints are factors that classified patients into risk groups. Bone marrow samples were drawn at diagnosis (ALL-MSCs), and at 15 (ALL-MSCs+15) and 35 days (ALL-MSCs+35) after initiation of therapy. Aspirates were also obtained from three children with B-cell precursor ALL who recovered without signs of disease and were out of therapy (OOT-MSCs) and from eight children with no hematological diseases (Healthy-MSCs). Table 1 details patient characteristics at diagnosis.

### Mesenchymal stem cells

MSCs were isolated by the classical adhesion method and cultured as previously described [21]. Once the cultures reached 80–90% confluence, the cells were recovered, counted and replated at a density of  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> and maintained and expanded in MesenPRO-RS™ medium (Gibco, CA, USA). The harvested cells were analyzed by flow cytometry for the expression of typical MSC and hematopoietic cell markers (CD29, CD44, CD90, CD14, CD19 and CD34; Supplementary Fig. S1). All experiments were performed with cells harvested between the 4th and the 7th passages.

### NK cell isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from buffy coats of healthy donors (Centro de Transfusión, Madrid, Spain) by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque, Sigma, Spain). Isolation of CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK cells was performed in a two-step procedure with a NK cell isolation kit (Miltenyi Biotech, Bergisch, Germany) following the manufacturer's instructions.

**Table 1**

Clinical data for ALL patients. Patients were children diagnosed of ALL and treated with the PETHEMA protocol (stands for Spanish Protocol for Malignant Hemopathies [19,20]. Under this protocol, children with low-risk ALL were 1–9 years old, had low cell counts, no t(9;22) or translocations involving the MLL gene, and had undetectable levels of residual disease during therapy. Children with high-risk ALL had features of poor prognosis [t(9;22), MLL+, hypodiploidy, cell counts above 100,000/ $\mu$ L, mrd levels above cutoff values]. Children who did not fit either of the previous 2 groups were classified as intermediate risk.

Patient	Sex	Age	All-immunophenotype	Risk	Out of treatment
1	F	2	Pro-B ALL	I	No 2nd year-complete remission
2	M	6	Common precursor B-ALL	L	Yes 3rd year-complete remission
3	F	5	Pre-B ALL	I	Yes. 4th year-complete remission
4	M	2	Pro-B ALL	I	Posttransplant. Haploidentical. Intra-treatment relapse
5	M	10	Common precursor B-ALL	L	Yes 3rd year-complete remission
6	M	10	Common precursor B-ALL	L	Yes 3rd year-complete remission
7	M	5	Common precursor B-ALL	I	No 2nd year-complete remission
8	F	4	Common precursor B-ALL	I	Yes 2nd year-complete remission
9	M	2	Pre-B ALL	L	Yes In treatment-complete remission
10	M	2	Common precursor B-ALL	I	Posttransplant. Allogeneic. Relapse. Allogeneic transplant.
11	M	6	Common precursor B-ALL	L	Yes
12	F	1	Pro-B ALL	H t(4;11)	No Intra-treatment relapse and death
13	M	14	Common precursor B-ALL	H t(9;22)	No Intra-treatment relapse
14	F	9	B-ALL	I	1-year end of treatment follow up the sample 4th year-complete remission
15	M	10	B-ALL	L	1-year end of treatment follow up the sample 4th year-complete remission
16	F	6	B-ALL	I	1-year end of treatment follow up the sample 4th year-complete remission

### Co-culture assays

ALL-MSC and Healthy-MSC samples were seeded by duplicate in 24-well plates at a density of  $1 \times 10^4$  cells per well in MesenPRO-RS™ medium and allowed to adhere overnight before adding allogenic NK cells at the indicated MSC:NK ratios. Cocultures were maintained in culture media supplemented with IL-12 (10 ng/mL; ProSpec, East Brunswick, NJ, USA) and IL-15 (100 ng/mL; ProSpec). Where indicated, Healthy-MSCs were treated with the inhibitor of PGE2 synthesis, NS-398 (5  $\mu$ M; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and/or anti-TGF- $\beta$ 1 (10  $\mu$ g/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) during cocultures with NK cells.

In cocultures between Healthy-MSCs and the B-precursor leukemic cell line NALM-6, MSCs ( $1 \times 10^4$  cells/well) were allowed to adhere either at the bottom of 12-well plates or to the lower side of transwell membranes (0.4  $\mu$ m pore size). After 3 hours, in all cases leukemic cells were added to the upper compartment of the transwell membranes and cultured for three days.

### Cytotoxic assays

Cytotoxicity was measured using the Cytotoxicity Detection Kit LDH (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain), following the manufacturer's instructions. In brief, purified NK cells derived from different donors were cultured in IL-12 and IL-15 either alone or in the presence of ALL-MSCs or Healthy-MSCs as above mentioned. NK cells were separately collected from the non-adherent layer and used as effectors in the cytotoxicity assays against K562 cell line. The cytotoxicity capacity of NK cells was assessed by plating cells for 4 hours at different effector/target ratios.

### Flow cytometry

The following mAbs conjugated to different fluorochromes were used for flow cytometric analysis: CD14, CD16, CD19, CD25, CD29, CD34, CD40, CD44, CD56, CD69, CD86, CD90, CD94, HLA-DR, HLA-E, NKG2A, NKG2D/CD314, NKp30/CD337, NKp44/CD336, NKp46/CD335, KIR2DL+2L3/CD158b, KIR3DL1/CD158e, PD-L1/CD274 and PD-L2/CD273 from R&D Systems, BD Biosciences (San José, CA, USA), Immunostep (Salamanca, Spain) and BioLegend (San Diego, CA, USA). Immunofluorescence stainings were performed as described previously [22]. Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San José, CA, USA) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, UCM.

### Apoptosis assays

After 12 hours of coculture, the proportion of apoptotic MSCs and NK cells were determined by staining with Annexin-V-FITC (BD Biosciences) and propidium iodide, according to the supplier's instructions. Apoptotic cells were defined as annexin-V-positive propidium iodide-negative cells.

### Cytokine measurements

The concentrations of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL10 in the coculture supernatants were determined by ELISA (BioLegend) according to the manufacturer's instructions.

Healthy-MSCs and ALL-MSCs at different times in the course of disease were seeded in 24-well plates at a subconfluent density of  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. After 6 days, culture supernatants were obtained and PGE2 and TFG- $\beta$  concentrations were determined by using an ELISA kit (R&D Systems) and a Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set system (BD Biosciences) respectively, according to the manufacturer's instructions.

### Quantitative RT-PCR

Real-time PCR was performed with specific TaqMan assays: Granzyme (Hs00989184\_m1), Perforin (Hs00169473\_m1), PI9 (Hs00244603\_m1), TLR3 (Hs00152833\_m1), TLR4 (Hs00152939\_m1), Jagged 1 (Hs01070032\_m1), and Jagged 2 (Hs00171432\_m1), all obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) as described previously [23]. GNB2L1 was used as endogenous control. Amplifications, detections, and analyses were performed in a 7900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, UCM). The Delta CT method was used for normalization to GNB2L1 mRNA.

### Statistical analysis

The Student *t* test was used for statistical analysis. Values of  $P \leq 0.05$  (\*), and  $P \leq 0.01$  (\*\*) were considered to be statistically significant.

## Results

### ALL-MSCs increase functional capabilities of NK cells

We performed cytotoxic assays in which NK cells derived from different donors were used as effectors after culture with IL-12 and

IL-15 either in the presence of Healthy- or ALL-MSCs. As expected, NK cells cultured alone could efficiently lyse K562 target cells but a strongly reduced killing capability was detected in all samples analyzed when effector cells were cultured previously in the presence of Healthy-MSCs (Fig. 1A). On the contrary, NK cells cocultured with ALL-MSCs derived from eleven out of thirteen different ALL patients studied (nos. 1–11) displayed an increased cytolytic activity compared not only to NK cells cultured with Healthy-MSCs but also to those cultured alone (Fig. 1A). Similar results were obtained when primary leukemia cells were used as targets for NK cell mediated cytotoxicity (Fig. 1B). The effect of ALL-MSCs to increase the lytic potential of NK cells was dose dependent as shown in Fig. 1C. On the other hand, ALL-MSCs derived from patients numbers 12 and 13 differed in that behavior showing an immunosuppressive capacity of NK cell-mediated cytotoxicity, similar to that exhibited by Healthy-MSCs. Relevantly, both ALL-MSCs samples corresponded to patients with high risk ALL (Fig. 1D).

The impact of ALL-MSCs on NK cell cytokine secretion was also evaluated. Whereas the levels of the pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were higher in supernatants recovered from NK cells cocultured with ALL-MSCs respect to those cultured alone, with Healthy-MSCs or high risk ALL-MSCs, the production of IL-10 was comparatively reduced (Fig. 1E).

These results support the idea that MSCs derived from bone marrow of patients with low/intermediate risk ALL are able to adapt their immunomodulatory features promoting the NK cell cytotoxic activity and, notably, these properties persist in the absence of leukemia cells.

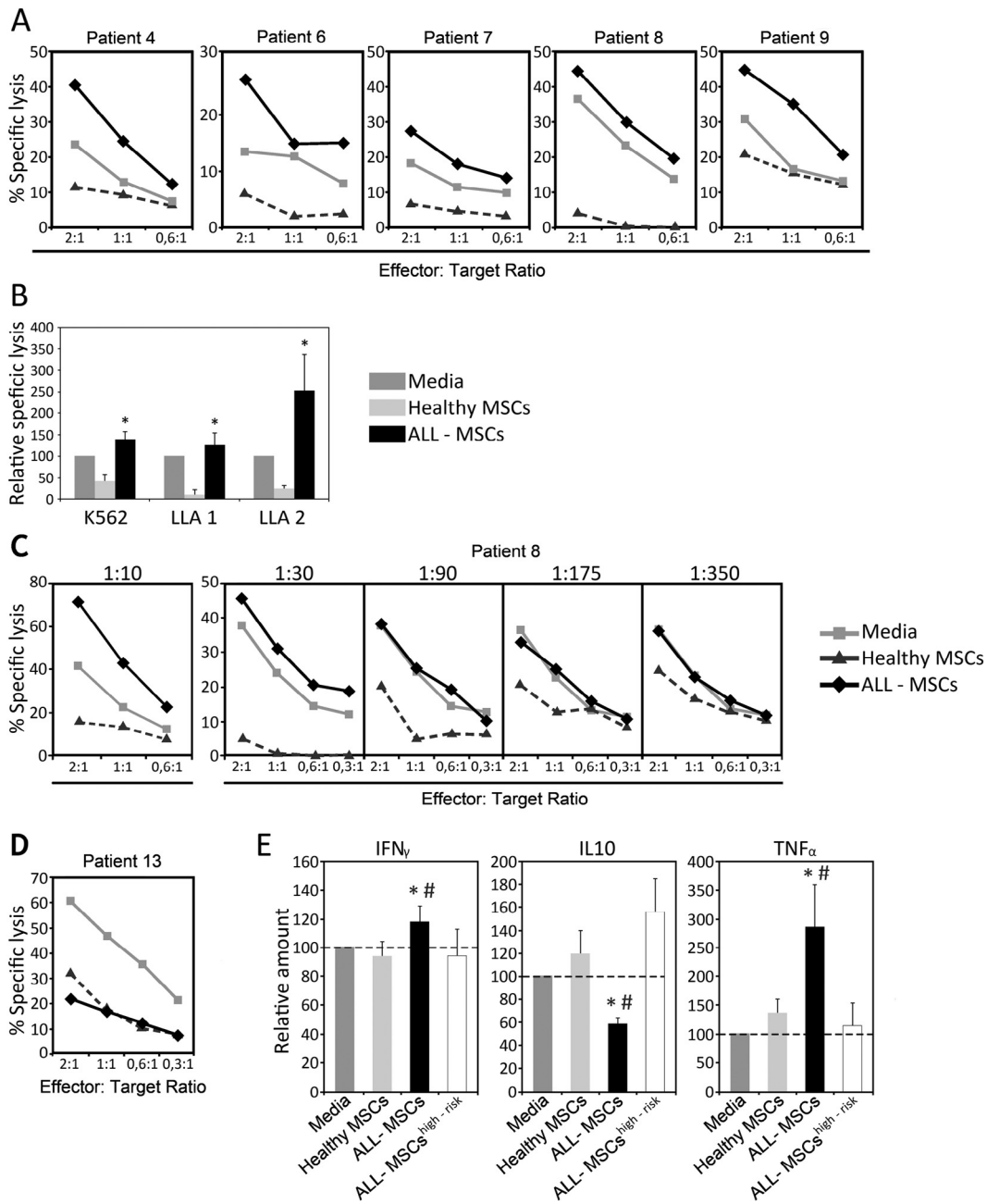
### Expression of activation markers on NK cells is not inhibited by the presence of ALL-MSCs

In parallel to the functional changes described above, whereas Healthy-MSCs significantly inhibited the cytokine-induced expression of activation markers, such as CD69 and CD25, and specific activating NK cell receptors, such as NKp30 and NKp46, no significant differences were found when comparing the phenotypic profile of NK cells cultured in the presence of ALL-MSCs and stimulated NK cells cultured alone (Fig. 2A and B). Similar results were obtained when the expression of granzyme and perforin was analyzed (Fig. 2C). High risk ALL-MSCs (patients nos. 12 and 13) exhibited again immunosuppressive properties inhibiting the acquisition of NK cell activation markers, similarly to Healthy-MSCs (Fig. 2B).

NK cell viability was also analyzed and no significant differences were found after coculture with Healthy-MSCs or any of the ALL-MSCs tested (Fig. 2D).

### MSCs from treated patients progressively recover the immunosuppressive capacities of Healthy-MSCs

We further evaluated whether the differential immunomodulatory behavior on NK cell function observed between Healthy- and ALL-MSCs obtained at diagnosis was maintained along the course of disease. Although variability existed among individuals, in most cases NK cells cocultured with ALL-MSCs+15 or ALL-MSCs+35 from treated patients progressively exhibited a functional capability, measured in terms of cytotoxicity and cytokine production, more similar to NK cells cocultured with Healthy-MSCs (Fig. 3A and B). However, in about 20% of patients, MSCs isolated during chemotherapy treatment showed immunostimulatory abilities higher than those exhibited by diagnosis ALL-MSCs (Fig. 3A; Patient 7). On the contrary, all analyzed OOT-MSC samples showed similar immunosuppressive capacities to Healthy-MSC samples (Fig. 3C and D).

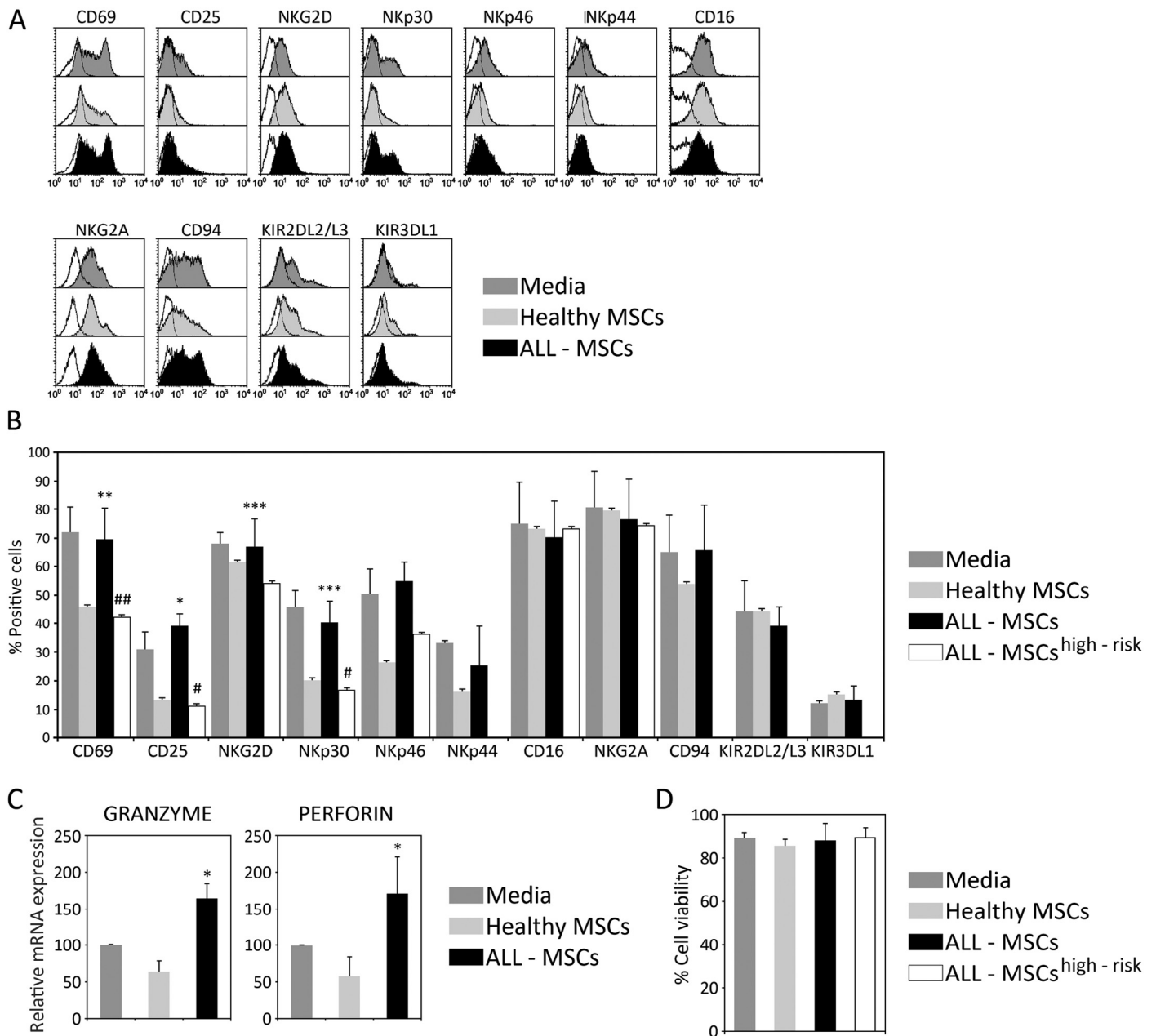


**Fig. 1.** Contrary to Healthy-MSCs, ALL-MSCs do not inhibit but induce NK cell effector functions. Purified NK cells were cocultured in 24-well plates in media supplemented with IL-12 (10 ng/mL) and IL-15 (100 ng/mL) in the absence or presence of Healthy-MSCs or ALL-MSCs. (A) Data show the cytotoxic activity of NK cell population cultured for 12 hours either alone (media) or in the presence of Healthy-MSCs or ALL-MSCs (MSC:NK ratio, 1:30) before standard cytotoxicity assay against K562 target cells at different effector-to-target ratios in duplicate wells. Data are representative of eleven different low/int risk ALL-patients and eight healthy donors. (B) Under the same conditions described above, primary leukemia cells from two different patients were used as targets for NK cell cytotoxicity (effector:target ratio, 2:1). Results are expressed as mean  $\pm$  SD of the percentage of lysis mediated by NK cells cultured with Healthy-MSCs or ALL-MSCs with respect to NK cells cultured alone (100%). NK cells from three different healthy donors were used as effectors, and two different Healthy-MSCs and ALL-MSCs were used in the cocultures. (C) Cytotoxicity activity of NK cells tested after coculture with different doses of either ALL- or Healthy-MSCs. NK cell cytotoxic activity stimulation with ALL-MSCs occurred in a dose-dependent manner. Data are representative of four different ALL-MSC patients and four Healthy-MSC donors. (D) Cytotoxic activity of NK cells tested after coculture in the presence or absence of high-risk of relapse ALL-MSCs or Healthy-MSCs. Data are representative of two high risk ALL-MSCs patients and five Healthy-MSCs donors. (E) Cytokine secretion profile of NK cells cultured for 36 hours alone-Media or in combination with Healthy-MSCs, ALL-MSCs or high risk ALL-MSCs was measured by ELISA. Results are expressed as percentage of NK cytokine production cultured with Healthy-MSCs, ALL-MSCs or high risk ALL-MSCs with respect to NK cells cultured alone (100%). Data represent the mean  $\pm$  SD of eight to thirteen independent experiments. Each experiment was performed with Healthy-MSCs and ALL-MSCs from different donors. (\* $p \leq 0.05$ , versus Healthy-MSCs; # $p \leq 0.05$ , versus NK cells -Media-).

*Similar susceptibility of ALL-MSCs and healthy-MSCs to NK cell-mediated lysis*

We analyzed whether the differences observed in our functional studies could be explained by an increased susceptibility

of ALL-MSCs to NK cell-mediated lysis. Fig. 4A shows that MSC yield was similar in both culture types and in all MSC:NK cell ratios tested. Similar levels of the granzyme B inhibitor PI-9 were found in Healthy- and ALL-MSCs as shown by quantitative PCR (Fig. 4B).



**Fig. 2.** Phenotype and viability of NK cells after coculture with either Healthy-MSCs or ALL-MSCs. (A) Expression of different NK cell surface markers after culture of NK cells with or without either Healthy-MSCs or ALL-MSCs for 36 hours. Solid histograms represent the expression of the indicated antigens on NK cells. Open histograms represent the background fluorescence using isotype-matched irrelevant mAbs. A representative phenotypic analysis of eight independent experiments with a total of eight ALL-MSCs samples and seven Healthy-MSCs samples is shown. (B) Bars represent the mean  $\pm$  SD of the percentage of positive cells for NK cell antigens from the eight independent experiments mentioned above. (C) mRNA levels for granzyme and perforin were determined by quantitative RT-PCR. Results represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. (D) The viability of NK cells cultured alone, with Healthy-MSCs or ALL-MSCs from low/intermediate and high risk patients was determined by staining with Annexin V and Propidium iodide. Data represent the mean  $\pm$  SD from two to eight independent experiments. (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$  versus Healthy-MSCs; # $p \leq 0.05$ , ## $p \leq 0.01$  versus NK cells).

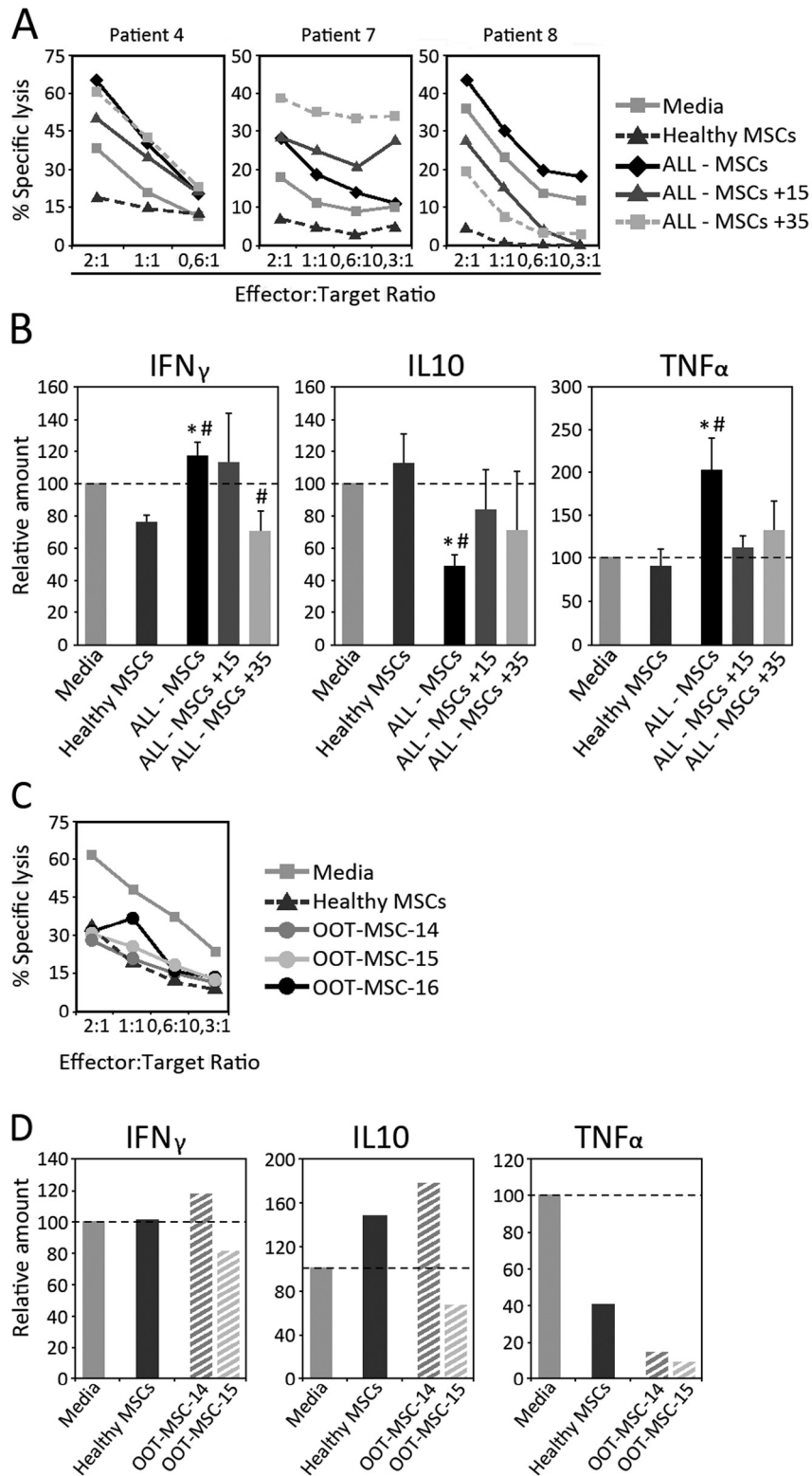
#### MSCs respond to the presence of leukemia cells by modifying their immunological properties

Next we investigate the relevance of leukemia cells in the acquisition of the immunostimulatory features shown by ALL-MSCs. Healthy-MSCs were cocultured in different conditions with NALM-6, a human B cell precursor leukemia cell line, and then the immunomodulatory effects of MSCs on NK function were analyzed. As previously shown, Healthy-MSCs inhibited the cytokine-induced NK cell cytotoxic activity; however, when Healthy-MSCs were previously cocultured with NALM6 leukemia cell line, the NK

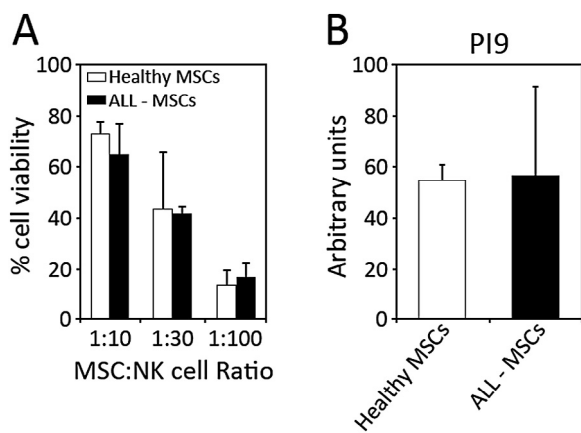
cells exhibited a lytic activity similar to that shown by NK cells cultured alone (Fig. 5). Similar, although less evident, were the results obtained when MSC-leukemia cell contact was impeded using a transwell chamber system (Fig. 5).

*Changes in cytokine secretion and cell-to-cell interactions are consistent with ALL-MSC-mediated immune stimulatory effects on NK cells*

TGF- $\beta$  and PGE2 represent two of the most important soluble mediators of MSC immunosuppressive effects [24]. Then, we



**Fig. 3.** The immunostimulatory properties of MSCs derived from ALL patients are modified in the course of disease. MSCs isolated from the bone marrow of healthy donors (n = 8) and ALL patients at different times in the course of disease (n = 11 patients and n = 3 children out of therapy) were cultured for 12 hours with isolated NK cells. (A) Cytotoxic activity of NK cells cultured alone-media or in the presence of either Healthy-MSCs or ALL-MSCs at different times in the course of disease (ALL-MSCs+15, ALL-MSCs+35). Results show the different immunomodulatory behavior of MSC isolated at different times during the disease from different ALL patients. Three different ALL-patients from a total of eleven were shown. In each experiment, same NK cell donor was used in all cultures. (B) Cytokine secretion profile of NK cells after coculture for 36 hours with Healthy-MSC and ALL-MSC at different times in the course of the disease. Note that the cytokine production is affected in the same way as the cytotoxic activity. Cytokine secretion was measured by ELISA and represents the percentage of cytokine production after culture with Healthy-MSCs or ALL-MSCs at different times in the course of the disease, with respect NK cell culture alone (100%). Results represent the mean  $\pm$  SD of MSC samples derived from six patients at different times during disease. (C) Cytotoxic activity and (D) cytokine production of NK cells after coculture with MSC samples from 2–3 children out of therapy (OOT-MSCs). Remarkably, the cytolytic effect exercised by NK, and its cytokine production, after coculture with the different samples from OOT-MSCs was equivalent to those observed with Healthy-MSCs. The cytokine production was expressed as the percentage of values from NK cells cultured alone. (\* $p \leq 0.05$  versus Healthy-MSCs; # $p \leq 0.05$  versus NK cells).



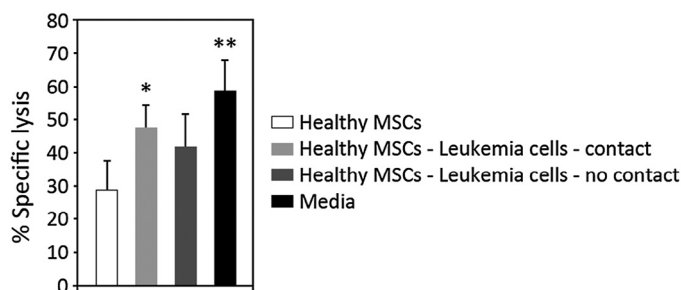
**Fig. 4.** Similar susceptibility of Healthy-MSCs and ALL-MSCs to NK cell attack. Healthy-MSC and ALL-MSC were cultured with cytokine-activated NK cells for 12 hours. (A) Percentage of Annexin<sup>+</sup> IP<sup>+</sup> MSCs after coculture with NK cells at different MSC:NK cell ratios. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of seven independent experiments with a total of five ALL-MSCs samples and three Healthy-MSC samples. (B) Gene expression in Healthy-MSCs and ALL-MSCs after coculture with NK cells (ratio 1:30). Transcriptional levels of serpin PI9 genes were normalized to the endogenous control GNB2L1. Data are expressed as mean  $\pm$  SD of duplicates of three independent experiments.

comparatively analyzed the levels of both soluble factors on supernatants from Healthy- and ALL-MSCs after six days in culture. In agreement with their immunostimulatory abilities, ALL-MSCs produced significantly reduced levels of TGF- $\beta$  and PGE2 compared to those found in Healthy-MSC cultures (Fig. 6A). Similar results were obtained by qPCR (data not shown). Intermediate levels of these factors were produced by MSCs isolated from patients after initiation of therapy (Fig. 6A). However, only the blockade of TGF- $\beta$  activity significantly inhibited the immunosuppressive capacity of Healthy-MSCs without reaching the immunostimulatory effects of ALL-MSCs (Fig. 6B), suggesting the involvement of additional mechanisms.

We also analyzed the expression of molecules relevant for the immune function. Healthy-MSCs did not express co-stimulatory molecules like CD40 or CD86, but in contrast ALL-MSCs, particularly those obtained at diagnosis, showed high levels of expression of both molecules (Fig. 6C and D). On the contrary, the constitutive expression of the PD-1 ligands, PD-L1 and PD-L2, known to play a key role in inhibiting the immune response, appeared notably downregulated in ALL-MSCs (Fig. 6C and D). No changes in MHC class I or II molecules were observed when comparing Healthy-MSCs and ALL-MSCs (Fig. 6C and D). High risk ALL-MSCs showed a phenotypic profile similar to that of Healthy-MSCs (Fig. 6C).

Previous studies have reported that the differential stimulation of MSCs via TLR-3 or TLR-4 results in an immunosuppressive or immunostimulatory signature respectively, and these effects were suggested to be mediated at least in part by the Notch ligand

**Fig. 6.** Mechanisms which mediate the immunomodulatory properties of ALL-MSCs. (A) Supernatants of Healthy-MSCs and ALL-MSCs at different times in the course of the disease were collected after six days of culture and PGE2 and TGF- $\beta$  production determined by ELISA and CBA system, respectively. Data are the mean  $\pm$  SD of seven to ten ALL-MSCs and six Healthy-MSCs samples. (B) Purified NK cells were stimulated with IL-12 and IL-15 and cocultured with ALL-MSCs or Healthy-MSCs (MSC:NK cell ratio, 1:30) treated with the PGE2 inhibitor NS-398 and/or anti-TGF- $\beta$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments using four Healthy-MSCs and three ALL-MSC samples. The percentage of lysis mediated by NK cells cultured in the different conditions with respect to NK cells cultured alone (100%) is shown. (C) Healthy-MSCs, ALL-MSCs at different times during the disease and high risk ALL-MSCs were cultured for six days and analyzed by flow cytometry for the expression of different immunomodulatory molecules. Percentage of positive cells is indicated in the histograms. (D) Bars represent the mean  $\pm$  SD of the percentage of positive cells for immunomodulatory molecules from five different MSC samples in each group. (E) Quantitative RT-PCR analysis of the expression of the Toll-like receptors TLR3, TLR4 and Notch ligand Jagged-1, Jagged-2, in Healthy-MSCs and ALL-MSCs at different times during the disease. Gene expression was normalized to GNB2L1, used as endogenous control. Data are the mean  $\pm$  SD of seven to ten ALL-MSCs and six Healthy-MSCs samples. (F) Cytokine-activated NK cells were cultured during 36 hours alone (media) or in the presence of either Healthy-MSCs or ALL-MSCs treated with or without the  $\gamma$ -secretase inhibitor IX DAPT (50  $\mu$ M) and assayed in a 4-hour standard cytotoxicity assay against the K562 target cells at different effector-to-target ratios in duplicate wells. Data are representative of two independent experiments with a total of four ALL-MSC samples and two Healthy-MSC samples. (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  versus Healthy-MSCs; # $p \leq 0.05$  versus ALL-MSCs; (F) \*\* $p \leq 0.01$  versus DAPT treatment).

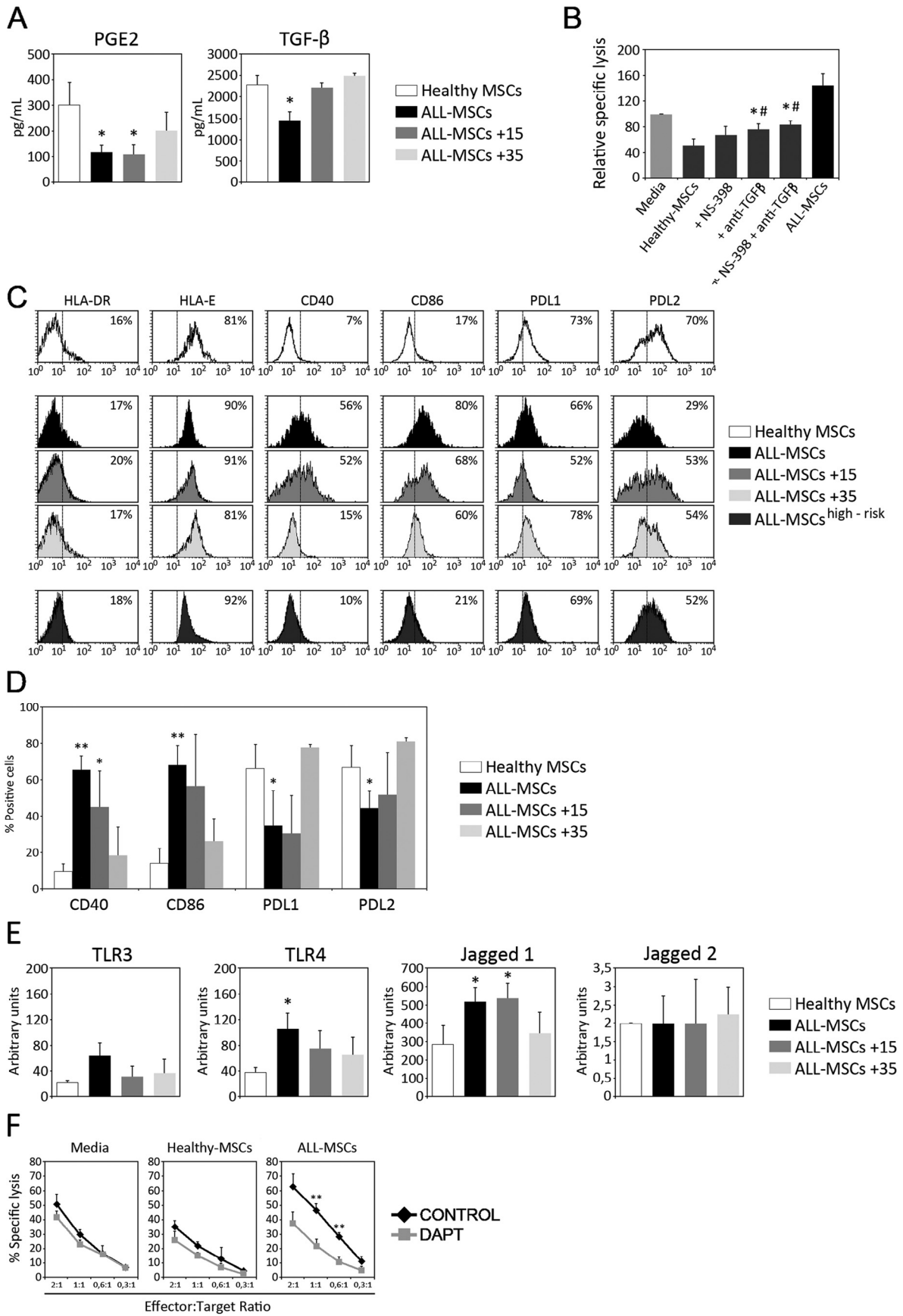


**Fig. 5.** Influence of the leukemia cells on the immunomodulatory properties of MSCs. Healthy-MSCs were cocultured with the leukemia cell line NALM6 (MSC:leukemia cell ratio, 1:30) in two different culture conditions: MSCs in contact with NALM6 cells (cell-to-cell contact) or separated by a transwell membrane (soluble factors). After three days of coculture, Healthy-MSCs were replated and cultured with NK cells from three healthy donors. Cytotoxic activity after 36 hours of coculture is shown (effector:target ratio, 2:1). Data are the mean  $\pm$  SD of three different Healthy-MSC samples. (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  versus Healthy MSCs; no significant differences were found when comparing Healthy-MSCs-Leukemia cells-contact/no contact versus Media and Healthy-MSCs-Leukemia cells-contact versus Healthy-MSCs-Leukemia cells-no contact).

Jagged-1 [8]. We therefore analyzed, in Healthy- and ALL-MSCs, the expression of TLR3 and TLR4 as well as that of Jagged-1 involved downstream of TLR signaling [8,25]. TLR4 expression was significantly higher in ALL-MSCs at diagnosis and concomitantly the expression of Jagged 1 also appeared increased compared to Healthy-MSCs (Fig. 6E). In addition, when cytokine-activated NK cells were treated with the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT in the presence of Healthy-MSCs or ALL-MSCs, it was evident that the blockade of Notch signaling could reverse the effects induced by ALL-MSCs (Fig. 6F) suggesting that the Notch pathway could be mediating, at least partially, the immunostimulatory effects of ALL-MSC on NK cells.

## Discussion

In the present report we proposed to carry out a detailed analysis of the immunological characteristics of MSCs derived from pediatric patients suffering ALL, with special emphasis on their differential capacity for stimulating NK cell responses in comparison to Healthy-MSCs. Although most studies have emphasized an immunosuppressive effect of MSCs, we found that all samples of ALL-MSCs derived from bone marrow of patients with low/intermediate risk leukemia at diagnosis enhanced the NK cell antitumor cytolytic activity and their pro-inflammatory cytokine production. Notably, these properties persisted in the absence of ALL cells. On the contrary, ALL-MSCs derived from patients with high-risk leukemia were able to inhibit NK cell function similarly as did MSCs from healthy donors. Therefore, our current findings open the possibility that a differential immunomodulatory behavior of MSCs from low/intermediate risk or high risk leukemia patients might be relevant for the control and progression of disease, contributing to its



clinical characteristics. In correlation, we have recently described that the phenotype of bone marrow NK cells from low/intermediate and high risk as well as relapsed ALL patients is significantly different, exhibiting the NK cells derived from patients with worse prognosis, a reduced expression of activation markers as well as natural cytotoxicity receptors and increased levels of the inhibitory receptors [22]. Recently, Wang et al. [16] have also described a differential immunoregulatory role of bone marrow-derived MSCs from patients with low-risk and high-risk myelodysplastic syndromes on DC development. In agreement with our current results, MSCs derived from patients with a better prognosis induced an increased DC functionality [16]. Other studies have used MSCs derived from patients with either chronic myeloid leukemia, multiple myeloma or myelodysplastic syndromes to analyze their effects on T cell function. Remarkably, in those cocultures, T cell activation was significantly higher than that exhibited by T cells cocultured with Healthy-MSCs [14,15,26,27]. In contrast, Conforti and colleagues have reported that MSCs isolated from ALL patients exert anti-inflammatory effects similar to those of Healthy-MSCs [28]. All together, these results suggest that bone marrow MSCs derived from patients with hematological malignancies exhibiting better prognosis could modify their immunological face to promote an effective immune response.

An important issue on the observed behavior of ALL-MSCs is to know whether their differential properties are primary or acquired by MSCs after contacting with leukemia cells. In this sense, our results indicate that Healthy-MSCs adopt the immunomodulatory features of ALL-MSCs when exposed to NALM6 leukemia cells, acquiring the ability to stimulate the NK cell antitumoral function, presumably to facilitate the elimination of leukemic cells. On the contrary, when MSCs were cocultured with TOM-1, a B-ALL cell line with high-risk cytogenetics (bcr/abl positive), their effects on NK cell function were immunosuppressive and similar to those exhibited by Healthy-MSCs without previous contact with leukemia cells (our unpublished results). These results are in agreement with earlier reports which showed changes in the phenotype and mainly in the cytokine production by bone marrow stromal cells from hematological patients and healthy donors induced by myeloma tumor cell lines or myelodysplastic cells [5,9,29,30]. As suggested by Liotta and colleagues in the context of an infectious process [25], MSC samples obtained from low/intermediate risk patients at diagnosis could be then responding to tumor derived signals that represent a potential harm to the host, by modulating an efficient immune response. In this sense, ALL-MSCs isolated from children during therapy progressively show immunomodulatory features more similar to those of MSCs from healthy donors, which probably reflects the renewal of MSCs in a leukemia-free bone marrow after months of chemotherapy. Additional studies are thus necessary to define the mechanism by which ALL may alter the immunoregulatory phenotype of MSCs.

As it has been described for different immune cells, MSCs could develop an immunosuppressor, MSC2, or immunostimulator, MSC1, phenotype, depending on the microenvironment-derived signals. Waterman and colleagues have therefore proposed that MSCs exhibit immunosuppressor characteristics until a pro-inflammatory role is required. At that moment, specific TLRs, cytokines and/or cell-to-cell interactions induce changes in the MSC phenotype which acquire immunostimulatory capabilities [8]. Our results indicate that those redundant mechanisms underlying the MSC-mediated inhibitory effects are reduced or abolished in ALL-MSCs. The changes include a significant decrease in the production of PGE2 and TGF- $\beta$ , soluble factors that have been suggested to play a role in healthy MSC-mediated suppression of NK cell function [7]. Similar results have been described for MSCs derived from patients with myelodysplastic syndromes [16,26]. In relation to cell-cell contact-mediated mechanisms, we also observed a reduced expression of PD-L1 or PD-L2

on ALL-MSCs. Since the activation of the PD-1/PD-L1 signaling axis leads to inactivation of NK cell in multiple myeloma [31], it is not unlikely that the down-regulation of PD-L expression observed on ALL-MSCs has a positive impact on NK cell function, as demonstrated in other cell coculture systems [32].

TLR4 priming promotes MSC survival and triggers the induction of pro-inflammatory cytokines and chemokines, therefore providing a mechanism to block the immunosuppressive activity of MSCs and to restore an efficient immune response in different pathological conditions [17,25,33,34]. Interestingly, Waterman and colleagues demonstrated antitumoral effects of TLR4-primed MSCs using a human ovarian cancer xenograft immune-competent model [17,35]. In correlation, our results indicate that ALL-MSCs show an augmented TLR4 expression whereas other TLRs do not show a modified expression respect to Healthy-MSCs. To our knowledge no information exists about possible TLR signaling changes in MSCs derived from other hematological or non-hematological malignancies.

Finally, our results also indicate a similar kinetics of expression between TLR4 and the most representative Notch1 ligand in MSCs, Jagged-1, during the course of ALL. A cross-talk between TLR4 and Notch1 pathways has been described in different cell types, and in most studied systems Notch1 signaling appears to modulate the production of proinflammatory cytokines in response to LPS stimulation [36]. Supporting these data, we demonstrate that the inhibition of the Notch1 pathway results in a neutralization of the immunostimulatory effects of ALL-MSCs, suggesting that, at least partially, Jagged 1 is involved in the capacity of ALL-MSCs at diagnosis to stimulate the NK cell antitumor activity.

Altogether, our current results demonstrate a differential behavior of MSCs from ALL patients, urging to review the generally accepted concept that MSCs mostly have a deleterious role in the tumor context. Instead, MSCs could initially protect the host in low/intermediate risk leukemia, promoting the immune response and therefore restraining tumor progression, whereas in high risk leukemia they would remain as immunosuppressive cells.

## Funding

This work was supported by grants SAF2012-33180 (Ministerio de Economía y Competitividad), Spanish Association Against Cancer 2010 AECC-2010 (AECC), S2010/BMD-2420 (Comunidad de Madrid) and RD12/0019/0007 (Instituto de Salud Carlos III). A.E. is supported by a pre-doctoral fellowship (AP2010-0795) from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

## Conflict of interest

No potential conflicts of interest were disclosed by the authors.

## Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.canlet.2015.04.012](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.012).

## References

- [1] C.R. Walkley, G.H. Olsen, S. Dworkin, S.A. Fabb, J. Swann, G.A. McArthur, et al., A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency, *Cell* 129 (2007) 1097–1110.
- [2] M.H. Raaijmakers, S. Mukherjee, S. Guo, S. Zhang, T. Kobayashi, J.A. Schoonmaker, et al., Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia, *Nature* 464 (2010) 852–857.
- [3] D.T. Scadden, Rethinking stroma: lessons from the blood, *Cell Stem Cell* 10 (2012) 648–649.
- [4] K. Schepers, E.M. Pietras, D. Reynaud, J. Flach, M. Binnewies, T. Garg, et al., Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche, *Cell Stem Cell* 13 (2013) 285–299.

- [5] H. Medyouf, M. Mossner, J.C. Jann, F. Nolte, S. Raffel, C. Herrmann, et al., Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit, *Cell Stem Cell* 14 (2014) 824–837.
- [6] A. Uccelli, L. Moretta, V. Pistoia, Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 2566–2573.
- [7] G.M. Spaggiari, A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M.C. Mingari, L. Moretta, Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2, *Blood* 111 (2008) 1327–1333.
- [8] R.S. Waterman, S.L. Tomchuck, S.L. Henkle, A.M. Betancourt, A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype, *PLoS ONE* 5 (2010) e10088.
- [9] B. Zdzisinska, A. Bojarska-Junak, A. Dmoszynska, M. Kandefer-Szerszen, Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 56 (2008) 207–221.
- [10] L. Garderet, C. Mazurier, A. Chapel, I. Ernou, L. Boutin, X. Holy, et al., Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma, *Leuk. Lymphoma* 48 (2007) 2032–2041.
- [11] E. Flores-Figueroa, J.J. Montesinos, P. Flores-Guzman, G. Gutierrez-Espindola, R.M. Arana-Trejo, S. Castillo-Medina, et al., Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells, *Leuk. Res.* 32 (2008) 1407–1416.
- [12] A. Vicente Lopez, M.N. Vazquez Garcia, G.J. Melen, A. Entrena Martinez, I. Cubillo Moreno, J. Garcia-Castro, et al., Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: correlations with the course of disease, *PLoS ONE* 9 (2014) e84496.
- [13] M.H. Raaijmakers, Disease progression in myelodysplastic syndromes: do mesenchymal cells pave the way? *Cell Stem Cell* 14 (2014) 695–697.
- [14] B. Arnulf, S. Lecourt, J. Soulier, B. Ternaux, M.N. Lacassagne, A. Crinquette, et al., Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma, *Leukemia* 21 (2007) 158–163.
- [15] Z. Xishan, A. Guangyu, S. Yuguang, Z. Hongmei, The research on the immunomodulatory defect of mesenchymal stem cell from chronic myeloid leukemia patients, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30 (2011) 47.
- [16] Z. Wang, X. Tang, W. Xu, Z. Cao, L. Sun, W. Li, et al., The different immunoregulatory functions on dendritic cells between mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with low-risk or high-risk myelodysplastic syndromes, *PLoS ONE* 8 (2013) e57470.
- [17] R.S. Waterman, S.L. Henkle, A.M. Betancourt, Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis, *PLoS ONE* 7 (2012) e45590.
- [18] E. Vivier, S. Ugolini, D. Blaise, C. Chabannon, L. Brossay, Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer, *Nat. Rev. Immunol.* 12 (2012) 239–252.
- [19] J.J. Ortega, J.M. Ribera, A. Oriol, P. Bastida, M.E. Gonzalez, C. Calvo, et al., Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate risk acute lymphoblastic leukemia. Final results of the prospective randomized PTHEMA ALL-89 TRIAL, *Haematologica* 86 (2001) 586–595.
- [20] C. Martinez-Laperche, A.M. Gomez-Garcia, A. Lassaletta, C. Moscardo, J.L. Vivanco, J. Molina, et al., Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse, *Am. J. Hematol.* 88 (2013) 359–364.
- [21] M.A. Vicente Lopez, M.N. Vazquez Garcia, A. Entrena, S. Olmedillas Lopez, M. Garcia-Arranz, D. Garcia-Olmo, et al., Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency, *Stem Cells Dev.* 20 (2010) 1011–1019.
- [22] N.C. Robson, L. Hidalgo, T. McAlpine, H. Wei, V.G. Martinez, A. Entrena, et al., Optimal effector functions in human natural killer cells rely upon autocrine bone morphogenetic protein signaling, *Cancer Res.* 74 (2014) 5019–5031.
- [23] J. Valencia, C. Hernandez-Lopez, V.G. Martinez, L. Hidalgo, A.G. Zapata, A. Vicente, et al., Transient beta-catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34+CD1a- progenitors, *J. Leukoc. Biol.* 87 (2010) 405–414.
- [24] J. Stagg, J. Galipeau, Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation, *Curr. Mol. Med.* 13 (2013) 856–867.
- [25] F. Liotta, R. Angeli, L. Cosmi, L. Fili, C. Manuelli, F. Frosali, et al., Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling, *Stem Cells* 26 (2008) 279–289.
- [26] Z.G. Zhao, W. Xu, H.P. Yu, B.L. Fang, S.H. Wu, F. Li, et al., Functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes, *Cancer Lett.* 317 (2012) 136–143.
- [27] T. Andre, N. Meuleman, B. Stamatopoulos, C. De Bruyn, K. Pieters, D. Bron, et al., Evidences of early senescence in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells, *PLoS ONE* 8 (2013) e59756.
- [28] A. Conforti, S. Biagini, F. Del Bufalo, P. Sirteto, A. Angioni, N. Starc, et al., Biological, functional and genetic characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from pediatric patients affected by acute lymphoblastic leukemia, *PLoS ONE* 8 (2013) e76989.
- [29] G. Bisping, R. Leo, D. Wenning, B. Dankbar, T. Padro, M. Kropff, et al., Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma, *Blood* 101 (2003) 2775–2783.
- [30] H.M. Lokhorst, T. Lamme, M. de Smet, S. Klein, R.A. de Weger, R. van Oers, et al., Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures, *Blood* 84 (1994) 2269–2277.
- [31] D.M. Benson Jr., C.E. Bakan, A. Mishra, C.C. Hofmeister, Y. Efebera, B. Becknell, et al., The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody, *Blood* 116 (2010) 2286–2294.
- [32] V.G. Martinez, L. Hidalgo, J. Valencia, C. Hernandez-Lopez, A. Entrena, B.G. del Amo, et al., Autocrine activation of canonical BMP signaling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells, *Eur. J. Immunol.* 44 (2014) 1031–1038.
- [33] S.L. Tomchuck, K.J. Zwezdaryk, S.B. Coffelt, R.S. Waterman, E.S. Danka, A.B. Scandurro, Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses, *Stem Cells* 26 (2008) 99–107.
- [34] M. Giuliani, A. Bennaceur-Griscelli, A. Nanbakhsh, N. Oudrhiri, S. Chouaib, B. Azzarone, et al., TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing, *Stem Cells* 32 (2013) 290–300.
- [35] A.M. Betancourt, New cell-based therapy paradigm: induction of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells into pro-inflammatory MSC1 and anti-inflammatory MSC2 phenotypes, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol* 130 (2012) 163–197.
- [36] P.N. Tsao, S.C. Wei, M.T. Huang, M.C. Lee, H.C. Chou, C.Y. Chen, et al., Lipopolysaccharide-induced Notch signaling activation through JNK-dependent pathway regulates inflammatory response, *J. Biomed. Sci.* 18 (2011) 56.

## SHORT COMMUNICATION

# A discrete population of IFN $\lambda$ -expressing BDCA3<sup>hi</sup> dendritic cells is present in human thymus

Víctor G Martínez<sup>1</sup>, Noelia M Canseco<sup>1</sup>, Laura Hidalgo, Jaris Valencia, Ana Entrena, Lidia M Fernández-Sevilla, Carmen Hernández-López, Rosa Sacedón, Angeles Vicente<sup>1</sup> and Alberto Varas<sup>1</sup>

Human thymus contains two major subpopulations of dendritic cells (DCs), conventional DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs), which are mainly involved in central tolerance and also in protecting the thymus against infections. In blood and peripheral organs cDCs include the subpopulation of BDCA3<sup>hi</sup> DCs, considered as equivalents to mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs. In this study we describe in human thymus the presence of a discrete population of BDCA3<sup>hi</sup> DCs that, like their peripheral counterparts, express CD13, low-intermediate levels of CD11c, CLEC9A, high levels of XCR1, IRF8 and TLR3, and mostly lack the expression of CD11b, CD14 and TLR7. Thymic BDCA3<sup>hi</sup> DCs display immature features with a low expression of costimulatory molecules and HLA-DR, and a low allostimulatory capacity. Also, BDCA3<sup>hi</sup> DCs exhibit a strong response to TLR3 stimulation, producing high levels of interferon (IFN)- $\lambda$ 1 and CXCL10, which indicates that, similarly to thymic pDCs, BDCA3<sup>hi</sup> DCs can have an important role in thymus protection against viral infections.

*Immunology and Cell Biology* advance online publication, 10 March 2015; doi:10.1038/icb.2015.22

Thymic dendritic cells (DCs) are highly specialized antigen-presenting cells with specific functions including induction of central tolerance through negative selection of self-reactive thymocytes and promotion of regulatory T (Treg) cell differentiation.<sup>1,2</sup> Plasmacytoid DCs (pDCs) and conventional DCs (cDCs) are the two major DC subpopulations described in human thymus.<sup>3–5</sup> Thymic pDCs are found in both the thymic cortex and the medulla and are phenotypically defined as HLA-DR<sup>int</sup> CD123<sup>hi</sup> CD45RA<sup>+</sup> cells lacking expression of CD13 and CD11c. They are considered as immature DCs owing to their low expression of costimulatory molecules that are strongly upregulated after activation.<sup>3–5</sup> A population of thymic mature activated pDCs has been recently described *ex vivo* and their involvement in Treg cell development has been demonstrated.<sup>6</sup> Like peripheral blood pDCs, thymic pDCs secrete interferon (IFN)- $\alpha$  in response to viruses indicating that these cells also have a role in protecting the thymus against viral infections.<sup>3,7</sup> Unlike pDCs, thymic cDCs are defined as HLA-DR<sup>+</sup> CD13<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> cells expressing CD45RO rather than CD45RA and are found mainly within the thymic medulla and at the corticomedullary border. They can be subdivided in two main subsets, immature and mature cDCs, based on the differential expression of HLA-DR and DC-LAMP,<sup>3</sup> CD11b<sup>5</sup> and CD14,<sup>4</sup> along with their expression of costimulatory molecules. Functionally, it is assumed that cDCs have an important role in the elimination of self-reactive thymocytes<sup>1,2</sup> and also thymic immature cDCs have been demonstrated to strongly induce the proliferation and differentiation of suppressive Treg cells after activation with Hassall's corpuscle-derived thymic stromal lymphopoietin (TSLP).<sup>8</sup>

In the periphery, cDCs can be separated into BDCA1<sup>+</sup> and BDCA3<sup>hi</sup> DCs,<sup>9–11</sup> and a recent comparative genomic analysis have indicated that human blood BDCA3<sup>hi</sup> DCs have a transcriptional signature that resembles that of mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs, suggesting that BDCA3<sup>hi</sup> DCs might be functionally related to this lineage.<sup>12</sup> The finding of the equivalence between CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> and human BDCA3<sup>hi</sup> DCs was supported by the identification of markers that are expressed on both DC subsets including CLEC9A/DNGR-1, XCR1, Necl2/CADM1 and TLR3, as well as the lack of expression of other markers such as CD11b and TLR7.<sup>13–15</sup> Although now controversial, the functional hallmarks of BDCA3<sup>hi</sup> DCs seem to be IL12p70 secretion, cross-presentation ability and mainly IFN- $\lambda$  production.<sup>15,16</sup> Apart from blood, BDCA3<sup>hi</sup> DCs have been also found in several peripheral organs, such as lung, liver and skin,<sup>9</sup> and lymphoid tissues including spleen, lymph nodes, tonsils and bone marrow.<sup>11,14,17</sup> However no study has yet analyzed the existence of BDCA3<sup>hi</sup> DCs in human thymus, although Vandenabeele *et al.*<sup>5</sup> indicated that the thymic CD11b<sup>-</sup> DC subpopulation had similarities to murine CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs, the major DC subpopulation appearing in mouse thymus.<sup>1</sup> In the current study we describe in the human thymus a population of BDCA3<sup>hi</sup> DCs showing remarkable similarities with BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> DCs present in human peripheral organs. We also show that thymic BDCA3<sup>hi</sup> DCs highly produce IFN- $\lambda$  in response to TLR3 stimulation suggesting that they can share with thymic pDCs the role of protecting the thymus gland against microbial infections.

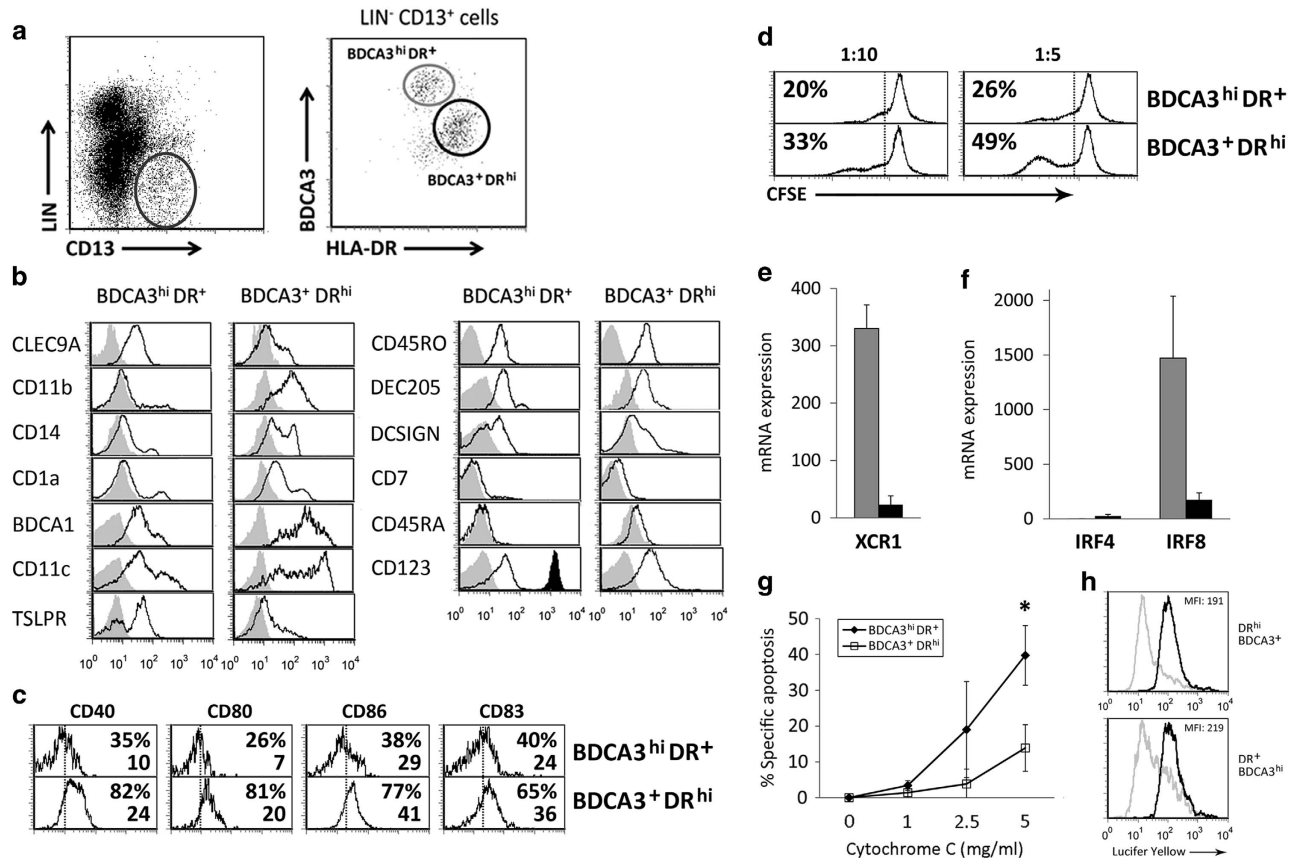
Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Dr A Varas, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid 28040, Spain.

E-mail: avaras@ucm.es

Received 16 September 2014; revised 19 January 2015; accepted 1 February 2015



**Figure 1** Phenotypic and functional analysis of BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> human thymic DC subsets. (a) Thymocyte suspensions were enriched in non-T cells and among the Lin<sup>-</sup> (CD34, CD3, CD56, CD19) CD13<sup>+</sup> cells two different DC subpopulations were found according to their BDCA3 and HLA-DR expression. (b) Differential expression of several cell markers in BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> DC subsets. Light-gray filled histograms represent background fluorescence. For comparison, the black-filled histogram shows the high expression of CD123 exhibited by thymic pDCs. Similar staining patterns were obtained in two to eight different experiments. (c) BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> DCs were analyzed for the expression of costimulatory molecules (CD40, CD80 and CD86) and CD83. Dotted lines represent the fluorescence background. Percentages of positive cells and mean fluorescence intensities are indicated in each histogram. (d) cDC subsets were isolated from human thymus and co-cultured with CFSE-stained naive CD4<sup>+</sup> T cells at different DC:T cell ratios. After 6 days of culture cell proliferation was assessed by flow cytometry. Data are representative of two to three independent experiments. (e,f) BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> DCs were isolated and mRNA levels for XCR1 (e), IRF4 and IRF8 (f) were determined by quantitative RT-PCR. Results represent the mean ( $\pm$ s.d.) of four samples pooled from two independent experiments. GNB2L1 was used as endogenous control. (g) Thymocyte suspensions were cultured with horse heart cytochrome C or vehicle for 24 h and the percentage of specific apoptosis was calculated as described in methods. The mean ( $\pm$ s.d.) of three samples is shown (\* $P$  < 0.05, by  $t$ -test). (h) Internalization of Lucifer Yellow was analyzed after 4 h of incubation at 37 °C (black histograms) or 4 °C (gray histograms). One representative out of three independent experiments is shown.

## RESULTS AND DISCUSSION

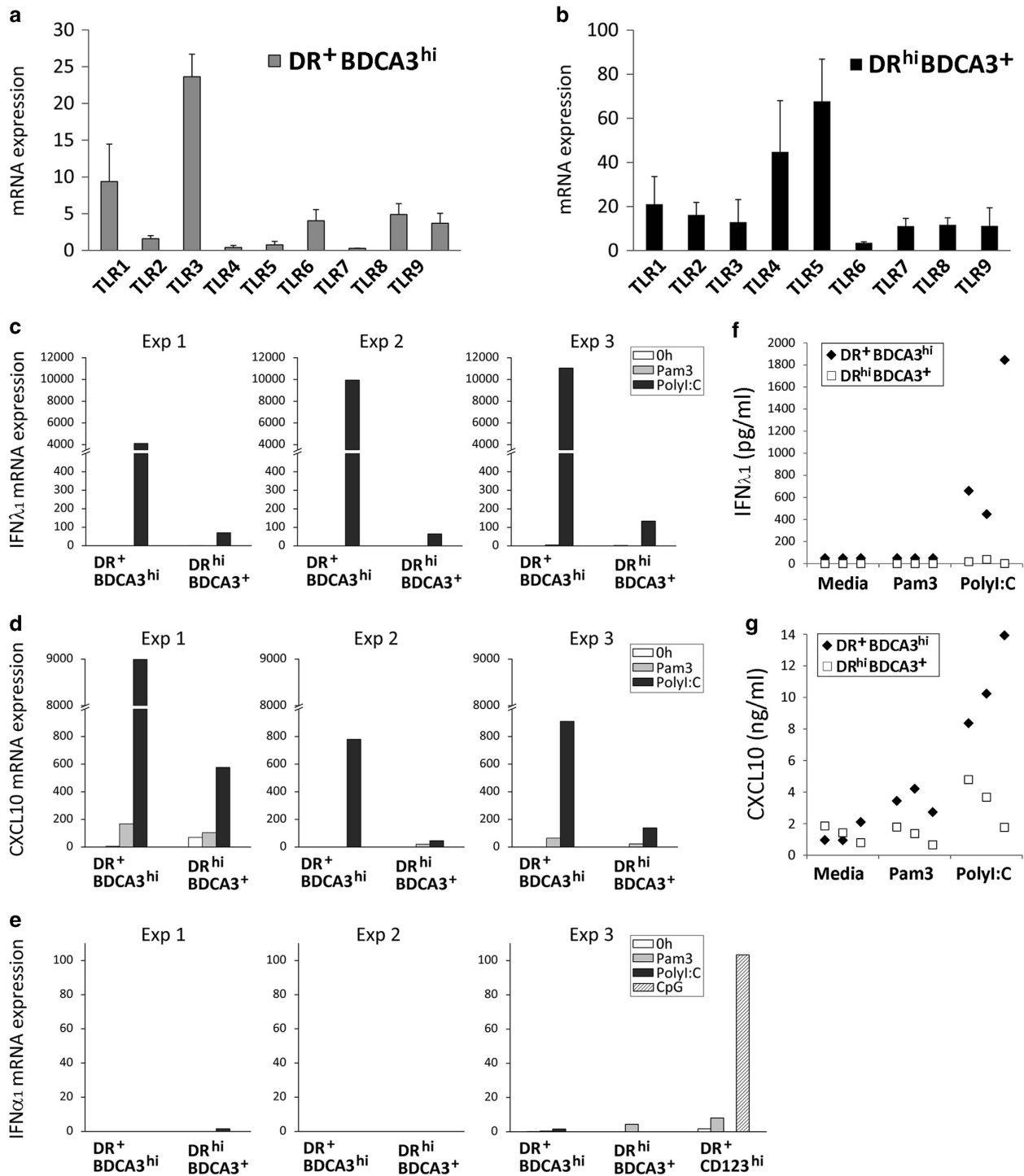
### Human thymus contains a population of BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> XCR1<sup>+</sup> dendritic cells

The analysis of BDCA3 expression in the CD13<sup>+</sup> thymic DC population allowed to distinguish two main subpopulations of cDCs, defined as BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs and BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs (Figure 1a). Although variability exists among individuals, in most of the thymus samples analyzed the BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DC subpopulation tended to be less abundant ( $0.019 \pm 0.015\%$  of total thymic cells; range 0.0003–0.055%;  $n = 22$ ) than that of BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs ( $0.031 \pm 0.024\%$  of total thymic cells; range 0.0006–0.084%;  $n = 22$ ).

The phenotypic analysis showed that both cDC subsets exhibited distinct antigenic profiles. The C-type lectin CLEC9A has been demonstrated to be selectively expressed by BDCA3<sup>hi</sup> DCs from blood and peripheral lymphoid and non-lymphoid tissues<sup>9,11,14,17</sup> and, in concordance with these results, we found that the expression of CLEC9A was mainly confined to the thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DC subset (Figure 1b). Also in line with previous reports,<sup>9,14</sup> BDCA3<sup>hi</sup>

HLA-DR<sup>+</sup> DCs mostly lacked expression of CD11b, CD14 and CD1a and expressed low to intermediate levels of BDCA1 and CD11c (Figure 1b). In contrast, the subpopulation of BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs were mostly positive for CD11b, CD14 and CD1a and expressed high levels of BDCA1 and CD11c (Figure 1b). Both thymic DC subpopulations exhibited a similar expression of CD45RO, DEC205 and DC-SIGN and did not express CD7, CD45RA or high levels of CD123 (Figure 1b).

The expression of costimulatory molecules was also analyzed showing that BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs expressed lower levels of CD40, CD80, CD86, as well as CD83 than BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs (Figure 1c). Accordingly, the BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DC subpopulation exhibited a lower capacity to stimulate T cell proliferative responses (Figure 1d). These results, along with the fact that BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs expressed lower levels of HLA-DR, seemed to indicate that this DC subset includes less mature DCs. Bendriss-Vermare *et al.*<sup>3</sup> and Schmitt *et al.*<sup>4</sup> described in the human thymus populations of immature DCs, defined as HLA-DR<sup>int</sup> CD11c<sup>+</sup> DCs and CD11c<sup>+</sup>



**Figure 2** BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> DCs highly express IFN- $\lambda$  and CXCL10 in response to TLR3 stimulation. (a) BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and (b) BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> DCs were isolated and mRNA levels for TLR1-9 were determined by quantitative RT-PCR. Results represent the mean ( $\pm$ s.d.) of four samples pooled from two independent experiments. GNB2L1 was used as endogenous control. (c–e) BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> DCs isolated from human thymus were stimulated with TLR1 (Pam3) or TLR3 (Poly I:C) agonists. After 12 h of culture, mRNA expression levels for IFN- $\lambda$ 1 (c), CXCL10 (d) and IFN- $\alpha$ 1 (e) were determined by quantitative RT-PCR and compared with that observed *ex vivo* (0 h). (e) For comparison, pDC IFN- $\alpha$ 1 expression before and after 12 h of culture with the indicated stimulus is represented. The mean ( $\pm$ s.d.) of duplicates in three independent experiments is shown. GNB2L1 was used as endogenous control. (f,g) Supernatants of stimulated DCs were assayed for protein levels of IFN- $\lambda$ 1 (f) and CXCL10 (g). Data from three independent experiments are shown.

CD14<sup>-</sup> DCs, respectively, and expressing low levels of costimulatory molecules and low allostimulatory capacity. It is likely that BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs could be included in those subpopulations. Also, it has been demonstrated that the subpopulation of immature CD11c<sup>+</sup> DCs

when stimulated with TSLP, a cytokine produced by the Hassall's corpuscles, upregulate HLA-DR, DC-LAMP and the costimulatory molecules CD80 and CD86, acquiring a phenotype similar to that described for mature thymic DCs.<sup>6,8</sup> In agreement with these results,

BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs constitute the thymic DC subset containing the highest proportion of TSLP receptor-positive cells (Figure 1b). However, the subset of CD11b<sup>-</sup> human thymic DCs was reported to comprise mature DCs.<sup>5</sup> This discrepancy with our results could be explained by the fact that the CD11b<sup>-</sup> DC subpopulation includes a highly variable proportion of DCs expressing high levels of BDCA3.

The chemokine receptor XCR1 has been described as a specific marker for BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> human peripheral DCs, as well as homologous DC populations in other mammalian species.<sup>13,18</sup> When the expression of XCR1-encoding mRNAs was analyzed in sorted thymic DC populations, it was evident that BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs expressed high levels of XCR1 in comparison with the very low expression observed in BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs (Figure 1e). Similarly, IRF8 has been also demonstrated to be selectively expressed in BDCA3<sup>hi</sup> DC populations,<sup>11,14,19</sup> and we found that thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs showed a high expression of IRF8 and low or undetectable expression levels of IRF4<sup>14</sup> (Figure 1f).

The cross-presentation ability was tested using the cytosolic translocation assay described previously<sup>20,21</sup> and based on the fact that cross-presenting DCs transfer exogenous proteins into their cytosol. Thymic DCs were then incubated with horse cytochrome c, which can induce caspase-dependent apoptosis upon translocation to the cytosol, and as shown in Figure 1g the proportion of cells becoming apoptotic after incubation with cytochrome c was higher in the BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DC subset. Both thymic DC subpopulations captured soluble proteins similarly, as shown by the efficient internalization of Lucifer yellow (Figure 1h), which indicates that BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs deliver internalized cargo to their cytosol more efficiently than BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs.

The results shown above indicate that thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs exhibit remarkable similarities with BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> DCs present in human peripheral blood and lymphoid and non-lymphoid organs, and because the BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> DCs are considered as equivalents of mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs,<sup>11,14</sup> it is not unlikely to think that human thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs could be homologous to the CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC subset appearing in the murine thymus. These CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs are assumed to be a resident DC subpopulation which arise from thymic progenitors,<sup>22</sup> therefore, we next examined whether BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs could be generated from human intrathymic precursor cells. The culture of CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> thymic precursors in multicytokine-supported cultures allowed their differentiation into BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs, as previously described,<sup>23</sup> and also into BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs. This latter subpopulation expressed CLEC9A, lacked CD11b and showed a lower expression of CD1a and BDCA1, as their *in vivo* counterparts (Supplementary Figure S1).

### TLR3 stimulation of thymic BDCA3<sup>hi</sup> DCs highly upregulates IFN- $\lambda$ and CXCL10

To gain some insight into the function of thymic BDCA3<sup>hi</sup> DCs their TLR expression profile was also examined. In agreement with previous reports,<sup>10,11,14</sup> BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs exhibited a more restricted TLR gene expression pattern showing high levels of TLR3 and very low or undetectable levels of TLR2, 4, 5 and 7 (Figure 2a). Low levels of TLR8 and TLR9 were also detected (Figure 2a), being TLR9 expression controversial because blood BDCA3<sup>hi</sup> DCs appear to respond to CpG in spite of an apparent lack of TLR9 mRNA expression.<sup>10,11</sup> Unlike BDCA3<sup>hi</sup> DCs, TLR4 and TLR5 were the most highly expressed TLRs in the BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DC subset (Figure 2b).

Functionally, BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> DCs are beginning to be considered key players in the induction of antiviral and antitumor

immunity. It has been shown that, upon TLR3 stimulation, BDCA3<sup>hi</sup> DCs, as well as mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs, are the major producers of IFN- $\lambda$ ,<sup>16,24,25</sup> a cytokine that has antiviral and antitumor activity and modulates adaptive immunity.<sup>26,27</sup> In addition, BDCA3<sup>hi</sup> DCs stimulated with Poly I:C produce high levels of the chemokine CXCL10,<sup>9-11</sup> which has an important role in the generation of antiviral immunity.<sup>28,29</sup> A prominent production of IFN- $\alpha$ , having an important role in immune reactions to viral infection,<sup>30</sup> has been also recently described for BDCA3<sup>hi</sup> DCs after dsRNA recognition.<sup>31</sup> We therefore analyzed the expression of IFN- $\lambda$ , CXCL10 and IFN- $\alpha$  in thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs after stimulation with the TLR3 ligand Poly I:C. Figure 2c shows that IFN- $\lambda$ 1 expression was highly induced in BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs stimulated with Poly I:C but not Pam3, the ligand for TLR1 which was also considerably expressed in this DC subset. In comparison, the expression of IFN- $\lambda$ 1 was minimally upregulated in TLR-activated BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs. Likewise, the highest expression of CXCL10 could be detected in the BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DC subset after TLR3 activation (Figure 2d). Minimal or undetectable levels of IFN- $\alpha$  were found in both thymic DC subpopulations stimulated via TLR3 or TLR1 (Figure 2e). These results were corroborated at the protein level (Figures 2f and g). It should be noted that a role for RLHs in this process could not be discarded as it has been reported that the ectopic expression of components of RIG-I signal transduction pathway induces the activation of IFN- $\lambda$ 1 promoter.<sup>32</sup>

These data showing a strong response of thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs to Poly I:C, along with the expression of IFN- $\lambda$  and CXCL10, suggest that this DC subpopulation could have an important role in the antiviral defense also in the thymus. Although traditionally considered as an immune-privileged site, it is now clear that the thymus is a target of infection by microbes including viruses (such as HIV, influenza virus, human cytomegalovirus and so on) and also bacteria, fungi and parasites which directly or indirectly can reach the thymus.<sup>33</sup> BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs could then function in the steady-state thymus as immune sentinels while concomitantly could also develop functions related to T cell differentiation, as the induction of the generation of FOXP3<sup>+</sup> Treg cells.<sup>6,8,34</sup> After thymic infection, BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs would become activated and produce prominent amounts of IFN- $\lambda$  and CXCL10 to control viral replication and spread. The elevation of CXCL10 levels could further contribute to the recruitment of CXCR3<sup>+</sup> Ag-specific T cells into the thymus to initiate the adaptive phase of the immune response.<sup>35</sup> Similarly, thymic pDCs are able to induce Treg cell differentiation in steady-state situations<sup>6,36</sup> and produce high amounts of IFN- $\alpha$  after influenza virus stimulation<sup>3</sup> or HIV infection in order to suppress virus replication.<sup>7,37</sup> Future work will be focused on the possible cooperation between these thymic DC subsets with antiviral functions and their possible cross-talk with other components of the innate immunity, such as NK cells that co-localize with pDCs in the human thymus and express after activation notable levels of XCL1 (our unpublished data), which is able to attract XCR1<sup>+</sup> DCs.

## METHODS

### Isolation of human thymic DCs

Human thymus samples from patients aged 1 month to 4 years undergoing corrective cardiac surgery were obtained and used according to the guidelines of the Medical Ethics Commission of Madrid-Montepíncipe and 12 de Octubre hospitals. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki principles. Thymuses were dissected free of surrounding connective tissue and then gently disrupted with a potter homogenizer until completely disaggregated. Thymocyte suspensions were enriched in non-T cells by using

the sheep red blood cell rosetting technique and the resulting cell suspensions were used for phenotypic analyzes and for isolation of Lin<sup>-</sup> BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> and Lin<sup>-</sup> BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs (purity ≥ 97%) using a FACSAria III cell sorter (BD Biosciences, San José, CA, USA) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Universidad Complutense de Madrid). When indicated Lin<sup>-</sup> CD123<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs were sorted from the non-T cell enriched suspensions.

### DC Culture

Isolated thymic DC subsets (10<sup>6</sup> cells per ml) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum and stimulated for 12 h in the presence of Poly I:C (12.5 μg ml<sup>-1</sup>) and Pam3CSK4 (1 μg ml<sup>-1</sup>, both from Invivogen, San Diego, CA, USA).

Freshly isolated DCs were used at different numbers as stimulators for resting allogeneic naive CD4<sup>+</sup> T cells (2 × 10<sup>5</sup>) isolated by magnetic sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch, Germany) from buffy coats (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid). Lymphocytes were labeled with 5 μM CFSE (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) to determine their proliferative response by the CFSE dilution method after 6 days of culture.

For DC differentiation experiments, intrathymic CD1a<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> precursor cells were isolated as previously described<sup>38</sup> and cultured for 6–10 days with a cytokine cocktail containing rhIL-6 (5 ng ml<sup>-1</sup>), rhSCF (200 ng ml<sup>-1</sup>), rhIL-1β (280 pg ml<sup>-1</sup>), rhIL-7 (1000 IU ml<sup>-1</sup>), rhGM-CSF (75 ng ml<sup>-1</sup>) and rhFLT3 ligand (100 ng ml<sup>-1</sup>) from Life Technologies (Grand Island, NY, USA), Prospec (East Brunswick, NJ, USA) and NIBSC (Hertfordshire, UK).

### Flow cytometry

Phenotypic characterization of thymic DC subsets was performed by flow cytometry using the following fluorochrome-conjugated mAbs from BD Biosciences, BioLegend (San Diego, CA, USA), Caltag (Buckingham, UK), Immunostep (Salamanca, Spain) and Miltenyi Biotec: CD1a (HI149), BDCA1/CD1c (L161), CD7 (CD7-6B7), CD11b (DCIS1/18), CD11c (Bly6), CD14 (M5E2), CD19 (HIB19), CD40 (5C3), CD45RA (HI100), CD45RO (UCHLI), CD80 (BB1), CD83 (HB15e), CD86 (IT2.2), CD123 (9F5), BDCA3/CD141 (M80), DEC205/CD205 (MG38), DC-SIGN/CD209 (9E9A8), TSLPR (1B4) and HLA-DR (L243 and GRB1). Biotin-conjugated anti-CLEC9A (kindly provided by Dr D Sancho, CNIC, Madrid) was followed by fluorochrome-conjugated Streptavidine (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Three- and four-color immunofluorescence stainings were performed and conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid).

### Cytosolic translocation assays

For the cytochrome c killing assay, non-T cell enriched thymocyte suspensions were cultured with different concentrations of horse heart cytochrome c (Sigma-Aldrich) or vehicle (H<sub>2</sub>O) for 24 h and, after extensive washing, apoptosis was measured in Lin<sup>-</sup> BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> and Lin<sup>-</sup> BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DC subsets. Apoptotic cells were defined as PI<sup>-</sup>/Annexin<sup>+</sup> and the percentage of specific apoptosis (%SA) was calculated as follows:

$$\%SA = \frac{(\%Apoptotic\ Cyt\ C - treated\ cells) - (\%Apoptotic\ vehicle - treated\ cells)}{\%Apoptotic\ vehicle - treated\ cells} \times 100$$

To test the ability to internalize Lucifer yellow, thymocyte suspensions were cultured for 24 h in complete medium and then pulsed with Lucifer Yellow (1 mg ml<sup>-1</sup>) for 4 h at 37 °C or 4 °C. Cells were extensively washed and the percentage of Lucifer Yellow<sup>+</sup> cells was analyzed by flow cytometry in DC subsets.

### Real-time quantitative RT-PCR

RNA isolation and total cDNA synthesis were performed as previously described.<sup>38</sup> Real-time PCR reactions for CXCL10, IFN-α1, IFN-λ1, IRF4, IRF8 and TLR1-9 were performed in duplicates with pre-developed TaqMan assay reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to manufacturer's instructions. GNB2L1 was used as endogenous control. Amplifications, detections and analyzes were performed in a 7.900HT Fast

Real-time PCR System (Life Technologies) (Centro de Genómica, Universidad Complutense de Madrid). The Delta CT method was used for normalization to GNB2L1 mRNA.

### Cytokine measurements

DC culture supernatants were collected after 12 h of stimulation and levels for IFNλ1 and CXCL10 were assayed by ELISA (eBioscience, Hatfield, UK) and Cytometric Bead Array Flex Set system (BD Biosciences), respectively.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants SAF2012-33180 (Ministerio de Economía y Competitividad), S2010/BMD-2420 (Comunidad de Madrid) and RD12/0019/0007 (Instituto de Salud Carlos III). LH and AE are supported by pre-doctoral fellowships (AP2009-4324 and AP2010-0795, respectively) from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. We thank the Pediatric Cardiology Units from Hospital Madrid-Montepíncipe and Hospital 12 de Octubre for thymus samples.

- 1 Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 2005; **17**: 304–312.
- 2 Hadeiba H, Butcher EC. Thymus-homing dendritic cells in central tolerance. *Eur J Immunol* 2013; **43**: 1425–1429.
- 3 Bendriss-Vermare N, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Mouliau N *et al*. Human thymus contains IFN-α-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 2001; **107**: 835–844.
- 4 Schmitt N, Cumont MC, Nugeyre MT, Hurtrel B, Barre-Sinoussi F, Scott-Algara D *et al*. *Ex vivo* characterization of human thymic dendritic cell subsets. *Immunobiology* 2007; **212**: 167–177.
- 5 Vandenabeele S, Hochrein H, Mavaddat N, Winkel K, Shortman K. Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* 2001; **97**: 1733–1741.
- 6 Martin-Gayo E, Sierra-Filardi E, Corbi AL, Toribio ML. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 2010; **115**: 5366–5375.
- 7 Gurney KB, Colantonio AD, Blom B, Spits H, Uittenbogaart CH. Endogenous IFN-α production by plasmacytoid dendritic cells exerts an antiviral effect on thymic HIV-1 infection. *J Immunol* 2004; **173**: 7269–7276.
- 8 Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W *et al*. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005; **436**: 1181–1185.
- 9 Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P *et al*. Human tissues contain CD141<sup>hi</sup> cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103<sup>+</sup> nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 2012; **37**: 60–73.
- 10 Hemont C, Neel A, Heslan M, Braudeau C, Josien R. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol* 2013; **93**: 599–609.
- 11 Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE *et al*. Human CD141<sup>+</sup> (BDCA-3)<sup>+</sup> dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 2010; **207**: 1247–1260.
- 12 Robbins SH, Walzer D, Dembele D, Thibault C, Defays A, Bessou G *et al*. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* 2008; **9**: R17.
- 13 Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre CA, Ventre E *et al*. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8α<sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med* 2010; **207**: 1283–1292.
- 14 Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen JL *et al*. Characterization of human DNGR-1<sup>+</sup> BDCA3<sup>+</sup> leukocytes as putative equivalents of mouse CD8α<sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med* 2010; **207**: 1261–1271.
- 15 van der Aa E, van Montfort N, Woltman AM. BDCA3+CLEC9A<sup>+</sup> human dendritic cell function and development. *Semin Cell Dev Biol* (e-pub ahead of print; doi:10.1016/j.semcdb.2014.05.016).
- 16 Lauterbach H, Bathke B, Gilles S, Traidl-Hoffmann C, Lubber CA, Fejer G *et al*. Mouse CD8α<sup>+</sup> DCs and human BDCA3<sup>+</sup> DCs are major producers of IFN-λ in response to poly I:C. *J Exp Med* 2010; **207**: 2703–2717.
- 17 Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu MH, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012; **209**: 653–660.
- 18 Dutertre CA, Jourdain JP, Rancez M, Amraoui S, Fossom E, Bogen B *et al*. TLR3-responsive, XCR1<sup>+</sup>, CD141(BDCA-3)/CD8α<sup>+</sup>-equivalent dendritic cells uncovered in healthy and simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Immunol* 2014; **192**: 4697–4708.

- 19 Aliberti J, Schulz O, Pennington DJ, Tsujimura H, Reis e Sousa C, Ozato K *et al*. Essential role for ICSBP in the *in vivo* development of murine CD8alpha + dendritic cells. *Blood* 2003; **101**: 305–310.
- 20 Lin ML, Zhan Y, Proietto AI, Prato S, Wu L, Heath WR *et al*. Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 3029–3034.
- 21 Segura E, Durand M, Amigorena S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J Exp Med* 2013; **210**: 1035–1047.
- 22 Li J, Park J, Foss D, Goldschneider I. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J Exp Med* 2009; **206**: 607–622.
- 23 de Yébenes VG, Carrasco YR, Ramiro AR, Toribio ML. Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by expression of the granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor. *Blood* 2002; **99**: 2948–2956.
- 24 Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N *et al*. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013; **57**: 1705–1715.
- 25 Zhang S, Kodys K, Li K, Szabo G. Human type 2 myeloid dendritic cells produce interferon-lambda and amplify interferon-alpha in response to hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2013; **144**: 414–425 e7.
- 26 Lasfar A, Abushahba W, Balan M, Cohen-Solal KA. Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy. *Clin Dev Immunol* 2011; **2011**: 349575.
- 27 Lopusna K, Rezuchova I, Betakova T, Skovranova L, Tomaskova J, Lukacikova L *et al*. Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta Virol* 2013; **57**: 171–179.
- 28 Larrubia JR, Benito-Martinez S, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra-Cid T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2008; **14**: 7149–7159.
- 29 Yuan J, Liu Z, Lim T, Zhang H, He J, Walker E *et al*. CXCL10 inhibits viral replication through recruitment of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Circ Res* 2009; **104**: 628–638.
- 30 Wang BX, Fish EN. The yin and yang of viruses and interferons. *Trends Immunol* 2012; **33**: 190–197.
- 31 Meixlsperger S, Leung CS, Ramer PC, Pack M, Vanoaica LD, Breton G *et al*. CD141+ dendritic cells produce prominent amounts of IFN-alpha after dsRNA recognition and can be targeted via DEC-205 in humanized mice. *Blood* 2013; **121**: 5034–5044.
- 32 Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol* 2007; **179**: 3434–3442.
- 33 Nunes-Alves C, Nobrega C, Behar SM, Correia-Neves M. Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection. *Trends Immunol* 2013; **34**: 502–510.
- 34 Lei Y, Ripen AM, Ishimaru N, Ohigashi I, Nagasawa T, Jeker LT *et al*. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med* 2011; **208**: 383–394.
- 35 Nobrega C, Nunes-Alves C, Cerqueira-Rodrigues B, Roque S, Barreira-Silva P, Behar SM *et al*. T cells home to the thymus and control infection. *J Immunol* 2013; **190**: 1646–1658.
- 36 Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E *et al*. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol* 2010; **184**: 2999–3007.
- 37 Keir ME, Stoddart CA, Linquist-Stepps V, Moreno ME, McCune JM. IFN-alpha secretion by type 2 predendritic cells up-regulates MHC class I in the HIV-1-infected thymus. *J Immunol* 2002; **168**: 325–331.
- 38 Valencia J, Hernandez-Lopez C, Martinez VG, Hidalgo L, Zapata AG, Vicente A *et al*. Transient beta-catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34+CD1a- progenitors. *J Leukoc Biol* 2010; **87**: 405–414.

The Supplementary Information that accompanies this paper is available on the Immunology and Cell Biology website (<http://www.nature.com/icb>)