

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Estudio de los mecanismos de diseminación en leucemia
linfática crónica: papel de Eph/Ephrin**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Miguel Ángel Flores Villalobos

Director

Luis Miguel Alonso Colmenar

Madrid, 2018



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas

Estudio de los mecanismos de diseminación en
Leucemia Linfática Crónica:
Papel de Eph/Ephrin

Tesis Doctoral

Miguel Ángel Flores Villalobos

2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas

**Estudio de los mecanismos de diseminación
en Leucemia Linfática Crónica:
Papel de Eph/Ephrin**

Dr. Luis Miguel Alonso Colmenar, certifica que **Don Miguel Ángel Flores Villalobos**, Licenciado en Químico Bacteriólogo Parasitólogo y Master en Genética y Biología Celular, ha realizado el presente trabajo bajo su dirección, en el Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina

Vº Bº Director

El interesado

Fdo. Luis Miguel Alonso Colmenar

Fdo. Miguel Ángel Flores Villalobos

A los que se han ido, pero les debo lo que soy: Mis padres
A los que aún no llegan, pero ya son mi motivación: Mis hijos



Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

La gratitud es algo inherente en mí. Tengo la firme creencia de vivir en un mundo interdependiente, pues la colaboración es la que realmente nos permite dar un avance significativo en los proyectos. El día en que el ser humano no solo lo entienda, si no que también lo lleve a la práctica, el avance de la humanidad será extraordinario.

El Miguel arreglando el mundo.

La presente tesis doctora se realizó así, gracias a la colaboración y aportación de cada uno de ustedes, desde el aspecto científico hasta el aspecto más personal. Ustedes han de saber que aquí solo les dedico unas palabras, pero mi agradecimiento va más allá que el de unas cuantas líneas, que siempre quedaran cortas ante tanto por decir. Es por eso que hoy y siempre les estaré agradecido.

Quiero agradecer:

A mi alma mater, la Universidad Autónoma de Chihuahua (México) y especialmente a su ex-rector M.C. Jesús Enrique Seáñez Sáenz por su visión y apoyo al programa de capacitación y actualización docente, le agradezco a su investidura pero también como persona y compañero de la Facultad de Ciencias Químicas por el invaluable apoyo que me brindo para la realización de este proyecto. Gracias “Quique”

A mi facultad, Facultad de Ciencias Químicas y su ex-director Ing. Alfredo Urbina Valenzuela por creer en un proyecto para beneficio y crecimiento de la facultad, pero sobre todo por su confianza, asesoría y ejemplo de perseverancia que me hizo entender que las cosas llegan en el momento adecuado. Gracias “Inge”

Al actual director de mi Facultad Dr. Pedro Javier Martínez Ramos por su invaluable apoyo en esta última etapa de mi proceso doctoral, por confiar en mí y considerarme dentro de su proyecto, pero sobretodo por su comprensión y empatía hacia mi persona. Gracias Doctor.

A la Universidad Complutense de Madrid y a los Hospitales; General Universitario Morales Meseguer (Murcia) y Clínico San Carlos (Madrid), así como a su personal por su invaluable colaboración. Pero sobretodo a los pacientes y donantes que accedieron a participar en este proyecto, gracias por confiar en nuestro grupo de investigación.

A mis director de Tesis, Dr. Luis Miguel Alonso Colmenar por el invaluable apoyo dentro y fuera del laboratorio. Por confiar en mi para la ejecución de este proyecto y transmitir con esa pasión y paciencia tus conocimientos, por ser mi guía científica y enseñarme a ver mas allá de lo que se puede observar. Por haberme ayudado y estar siempre al pendiente de todo lo que necesitaba fuera del laboratorio. Gracias Luis.

Al Dr. Agustín Zapata por darme la oportunidad de trabajar en su grupo, por confiar en mi sin apenas conocerme, por abrirme las puertas al mundo científico, por ponerme en contacto con mi director de tesis para trabajar en este proyecto. Gracias Agustín.

A mis compañeros del CAI, Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia; Alfonso, Juanjo, Carlos, Carmen, Amalia y Genesis, gracias por aportar en mi día a día esa energía que hacían de cada mañana un día único y de cada comida al compartir la mesa un momento especial. Por tu dinamismo, entrega y disposición para ayudar siempre que se necesitaba, por tus consejos, por tu apoyo en microscopía y tu gran frase “Pero vamos a ver ...”, gracias Fonsi. Por tu asesoría, por tus palabras de aliento y siempre ubicarme en mi formación científica, por compartir tu conocimiento con tu extraordinaria frase “Aquí hay dos cosas.....” gracias Juanjo. Por tu gran apoyo laboral, por tenderme la mano con la infinidad de tubos, por llenar el CAI con tu buen y peculiar humor que te caracteriza, gracias Carlos. Por tus consejos y disposición en ayudarme siempre que te lo pedí, por tu peculiar y amada manera de ponernos a trabajar que cada tarde nos daba ese chute de energía con tu inigualable frase “ojito eh ojito”, gracias Carmen. Por tu entusiasmo y simpatía, por alegrar siempre el buenos días, por tu disposición para ayudarme, por tu voluntad por servir, pero sobre todo por esa peculiar sonrisa que brindas sin importar la hora que fuera, gracias Amalia. Por tu actitud de servicio y disposición, por tu voluntad de estar siempre al pendiente para ayudar en lo que necesitaba, gracias Genesis.

A mis compis del laboratorio, Paula, Esther y Sonia por su apoyo científico pero sobre todo personal. Por compartir tantas horas dentro del CAI, por abrir su corazón, agradecido por la amistad que me brindaron. Por ser mi guía dentro del laboratorio, por ser mi maestra, de quien he aprendido tanto profesionalmente, por estar siempre dispuesta a echar una mano, por compartir tu conocimiento, por todas las observaciones y aportaciones hechas que enriquecieron mi trabajo dentro del laboratorio, pero sobretodo por la extraordinaria persona que eres, por aportar a esas horas de laboratorio el lado humano de las cosas, por tu gran corazón y sensibilidad, por tu dinamismo y alegría, sabes que siempre me quedare corto en mi agradecimiento, mil gracias Paula. Por tu apoyo incondicional, por tu voluntad siempre dispuesta a ayudar, por tus consejos profesionales y sobre todo personales, por levantarme el animo cuando se necesitaba, por todos esas pausas entre experimentos con sus maravillosas

charlas, por tu ayuda fuera del labo y tus consejos, por permitirme entrar a tu vida y conocer a una extraordinaria mujer, gracias Esther. Por que en esta ultima etapa llegaste al CAI motivada, con esas ganas de hacer las cosas, inyectándonos esa chispa de energía que se requiere de las nuevas generaciones, gracias por estar siempre al pendiente para ayudar en lo que se necesitaba, por tanta charlas compartidas y por permitirme conocerte, gracias Sonia.

A todo el grupo de Medicina y Biología. Nines, Alberto, Rosa, Eva, Miriam, Jaris, Víctor, Laura, Ana, Lidia, David, Javier y Sara. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudar y colaborar, por el apoyo brindado hacia mi persona siempre que se los pedí, gracias por permitirme conocer a cada uno de ustedes y compartir momentos especiales, esas cenas de navidad, festejos de tesis, cañas de verano, etc. A cada uno de ustedes mis más sincero agradecimiento.

A mis Molongos, los más molones del todo el master. Martha, Patri, Estela, Hikaru y Sergio, gracias por su apoyo incondicional, por haberme ayudado durante todo el master, por compartir sus conocimientos, por realizar sus criticas en los trabajos, por saber trabajar en equipo, por que muchas de las cosas que aprendí durante ese año de estudio llegó del conocimiento de cada uno de ustedes. Pero sobretodo gracias por su invaluable amistad y como amigo es que quiero agradecerles. Gracias por tanta experiencia vivida a su lado, por los viajes y tantas charlas y momentos inolvidables. Gracias chicos, especialmente a Martha por siempre estar al pendiente de mi, por ser un ejemplo a seguir dentro de la ciencia, cuando sea grande quiero ser como tu y lo sabes. Y a Patri, por permitirme apoyarme en ti, por escucharme, aconsejarme y ofrecerme una mano siempre que la necesite.

A mis grandes amigos de España por hacer mi estancia más agradable Madrid, por que cuando vas a una nueva ciudad, a un país distinto al tuyo, a kilómetros de distancia de tu gente, siempre es grato encontrar personas como ustedes. Gracias por todo y saben que siempre estarán en mi corazón. Gracias a mis catalanas Anne, María, Martha por tanto momento de felicidad, risas y charlas interminables. A mi franchute favorito, al francés más catalán, mi Fred mil gracias por compartir toda tu energía, por tu apoyo infinito, por tanto momento divertido y ser un extraordinario amigo. A mi Fran gracias por tantos momentos agradables por permitirme entrar en tu vida y conocer a ese extraordinario hombre, gracias por compartir parte de tu vida en Madrid conmigo. A mi gente de Madrid. Víctor, Gloria, Alfonso, Leonardo, Jonathan, Mirella y Jorge. Gracias Víctor por brindarme tu amistad por esas cañas por Madrid y los aventones desde el CAI hasta el metro. Gloria, Mire y Jony gracias por tanto momento lindo lleno charlas y alegría pero sobretodo de apoyo emocional. A mi Fonseke

y mi cubano favorito, Alfonso y Leo, gracias por estar acompañándome en todo momento por su tiempo compartido conmigo, por las risas y abrazos pero sobre todo por su cariño y ser siempre mi apoyo incondicional en Madrid. Al gúero gracias por que en este ultimo año fuiste un apoyo necesario, por tu infinita paciencia para soportar a este compi de piso pre-tesico, por tu alegría y dinamismo que siempre me daba la chispa para llenar el día de energía, por todos los momentos, viajes, paseos y experiencias aprendidas, siempre agradecido.

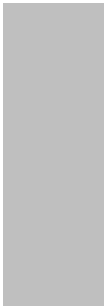
A mi gente de México, a todos mis compañeros del laboratorio; Angelita, Vicky, Carmen, Vero, Flor, por su impulso y apoyo para poder emprender este proyecto. A la señora Martha por ofrecerme hoy y desde hace muchos años su total apoyo.

A mis amigos del alma, mis hermanos elegidos. Jesús, Danelia, Lorena, Betty y Oscar gracias por estar siempre al pendiente de mi, por su cariño y apoyo por confiar en mi y motivarme a seguir creciendo. Me hicieron mucha falta aquí pero la distancia jamás podrá alejarme de ustedes ni hoy ni nunca, hay tanto que tengo que agradecer a ustedes, saben que son una parte fundamental en mi vida y siempre les estaré agradecido.

Dany gracias por ser mi confidente desde hace muchos años, por levantarme siempre que he caído, por ser mi apoyo de vida, por tu invaluable voluntad y disposición por estar siempre en el momento justo, por tu cariño y tu tiempo, gracias por ser mi ejemplo de vida y grandeza. Gracias mi "Tona"

Jesús "Meme", no existen palabras suficientes para poder agradecer tu imprescindible apoyo, gracias por confiar en mi e impulsarme a seguir creciendo, por ser mi ejemplo a seguir, por mostrarme que no importa cuanto tiempo tenga que pasar siempre hay que lograr el objetivo, por incitarme a emprender este proyecto, por alegrarte de mis triunfos y acompañarme en mis derrotas, gracias por saber y enseñarme a esperar, pero sobretodo gracias por ser mi apoyo de vida.

A toda mi Familia. A mis hermanos, debo nombrarlos a todos por que cada uno de ellos se merece mi más profundo agradecimiento, por que a pesar de la distancia en esta etapa siempre los sentí a mi lado, por apoyarme en todo lo que he emprendido, por estar a mi lado desde siempre, por cuidarme y guiarme. Elisa, Corina, Norma, Isidro, Evangelina, Lorena, Martha, Francisca y Angélica. Gracias por todo su amor. A mis sobrinos por todo su cariño y llenar de alegría cada momento . Pero sobre todo a mis Padres por haber sido mi ejemplo de vida, por sus enseñanzas, por formarme y mostrarme el amor al trabajo, por impulsarme siempre a seguir creciendo, por su apoyo en mi preparación, por haberme brindado más de lo que podían, por sentirse orgullosos de mi, pero sobre todo por su infinito amor que hicieron de mi la persona que hoy soy.



Índice

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. Leucemia linfocítica crónica.	9
2. Migración trans-endotelial (TEM)	11
3. Supervivencia y apoptosis	13
4. Receptores Eph y ligandos ephrin	13
5. TEM y el papel de Eph/ephrin	17
6. Esfingosina-1-fosfato (S1P) en la migración trans-endotelial (TEM)	19
7. Esfingosina-1-fosfato (S1P) y Quimiocinas	21
8. Esfingosina-1-fosfato (S1P) y Eph/ephrin	22
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. Muestras humanas.	29
1.1 Pacientes de LLC	29
1.2 Donantes Sanos	29
2. Procesamiento de muestras.	30
2.1 Aislamiento de Células B leucémicas (LLC) y linfocitos B sanos (LBP) para ensayos in vitro.	30
2.2 Procesamiento de adenopatías y ganglios linfáticos (GL).	31
3. Cultivos celulares	31
3.1 Cultivo de células endoteliales HUVEC y HDLEC	31
3.2 Co-cultivos de HUVEC o HDLEC con células LLC y/o LBP para ensayos de migración	32
3.3 Co-cultivos de HUVEC con células LLC, para ensayos de supervivencia.	32
3.4 Cultivos en suspensión sobre moléculas de adhesión celular (MAC) y matrices extracelulares (MEC) pegadas a placa.	33
3.5 Ensayos del estado de activación de integrinas y de unión al ligando.	33
4. Análisis de la expresión de Eph/Ephrin mediante Q-RT-PCR	34
4.1 Aislamiento de ARN	34
4.2 PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR)	34

5. Análisis mediante Citometría de flujo.	34
5.1 Tinción de células LLC, linfocitos B y células endoteliales HDLEC	34
5.2 Análisis de supervivencia mediante la tinción de Anexina-V-PE/7-AAD.	35
6. Ensayos de Migración	35
6.1 Ensayos de trans-migración endotelial (TEM).	35
6.2 Ensayo de migración a través de filtros	37
6.3 Ensayos de migración y TEM en respuesta a gradientes de quimioquinas (Quimiotaxis)	37
6.4 Ensayos de migración y TEM en condiciones de “Salida” desde el GL.	37
7. Ensayos de silenciamiento mediante pequeños ARN de interferencia (siRNA)	38
7.1 Silenciamiento de ephrinA4 en las células LLC	38
7.2 Silenciamiento de EphA2 en HUVEC	38
8. Cuantificación de ephrinA4 soluble en el plasma de los pacientes de LLC mediante ELISA	39
9. Purificación de ephrinA4 del plasma de los pacientes de LLC	40
10. Análisis genéticos de las células LLC	40
10.1 Análisis del estado mutacional de los genes IgHV	40
10.2 Análisis citogenético a través de la hibridación in situ mediante sondas fluorescentes (FISH)	41
11. Ensayos del estudio in vivo de ephrinA4 soluble en la infiltración de ganglios linfáticos (GL) de ratón	41
12. Tratamientos	41
12.1 Tratamiento de TNF- α	41
12.2 Tratamiento de proteínas recombinantes a endotelios HUVEC/HDLEC y LLC/LBP	42
a) hFc	42
b) EphA2-Fc, ephrinA4-Fc, EphB4-Fc y ephrinB2-Fc.	42
c) ICAM-1 y VCAM-1	42
13. Microscopía confocal.	44
13.1 Adquisición y análisis de imágenes.	44
13.2 Inmunofluorescencias en monocapas de co-cultivos HUVEC o HDLEC	44
13.3 Inmunofluorescencia en filtros de los ensayos TEM	44
13.4 Inmunofluorescencias en Ganglios Linfáticos	45
13.5 Co-localización mediante el <i>Clustering</i> de ephrinA4 con integrinas.	45
14. Análisis estadístico	46

RESULTADOS	47
1. Estudio de la viabilidad de las células LLC en procesos de trans-migración endotelial (TEM) y su asociación con la presencia de linfadenopatías (LA) mediada por expresión de ephrinA4 y su interacción con las integrinas $\alpha 4$ y αL.	49
1.1 Las células LLC pero no los linfocitos B sanos, pueden sufrir apoptosis a través de los contactos físicos con endotelios sanguíneos estimulados con TNF- α durante la migración trans-endotelial (TEM).	50
1.2 Células LLC de pacientes con adenopatía (LApos) presentan una mayor supervivencia durante la TEM mediada por las cadenas de integrinas $\alpha 4$ y αL .	57
1.3 La supervivencia dependiente de integrinas es contrarrestada por la señalización <i>reverse</i> de ephrinA4.	65
1.4 La ausencia de la señalización <i>reverse</i> de ephrinA4 mejora dramáticamente la supervivencia de las células LLC TM de los casos LApos	74
1.5 La fracción soluble de ephrinA4 unida al endotelio potencializa la supervivencia de las células LLC en los casos LApos mediante la inducción de la TEM a través de la ruta trans-celular.	80
1.6 EphrinA4 soluble se encontró unida a EphA2 en las vénulas de endotelio alto (HEV) en linfadenopatías de pacientes con LLC, incrementando la viabilidad de las células LLC transferidas a ratones tras infiltrar los ganglios linfáticos (GL).	84
2. Estudio de la diseminación de las células LLC a través de endotelios linfáticos.	90
2.1 Las células LLC muestran una mayor capacidad de migración a través de HDLEC comparadas con HUVEC.	90
2.2 Las células LLC no responden a procesos quimiotácticos de CCL19 y CXCL12 a través de endotelios linfáticos activados con TNF- α (HDLEC-TNF), pero parecen quedar retenidas adheridas al endotelio.	93
2.3 Las células LLC de pacientes LApos presentan una menor capacidad de trans-migración que los casos LANeg, mientras que ambas condiciones de LA parecen recibir señales de supervivencia después de la diapédesis a través de endotelios linfáticos (HDLEC-TNF- α).	97

2.4 Los endotelios linfáticos expresan un gran número de receptores y ligandos de la familia Eph/ephrin, destacando la expresión de los receptores EphA2 y EphB4.	98
2.5 La ausencia de la interacción EphA2/ephrinA4 y la señal reverse a través de ephrinB2 provee de señales de supervivencia a las células LLC durante la TEM a través de endotelios linfáticos (HDLEC-TNF- α).	100
3. Estudio de la salida de las células LLC desde los GL hacia los vasos sanguíneos (HUVEC) y linfáticos (HDLEC).	105
3.1 Las células LLC presentan una menor expresión de S1PR1 comparadas con los LBP pero mantienen la capacidad para responder a S1P.	106
3.2 Las células LLC de pacientes LApos presentan una menor capacidad de TEM (basal-apical) en comparación con los casos LANeg, que responden a la señal de S1P a través de HDLEC pero no por HUVEC, adquiriendo en ambas condiciones clínicas señales de supervivencia tras la TEM.	106
3.3 La interacción S1PR1-CCR7 y S1PR1-CXCR4 bloquea la salida de las células de LLC en ensayos in vitro a través de endotelios linfáticos y sanguíneos.	108
3.4 Las señales <i>forward</i> y <i>reverse</i> de las Eph/ephrin en la interacción S1PR1-CCR7 y S1PR1-CXCR4 promueven una mayor TEM (Basal-Apical) en la salida de las células LLC a través de endotelios sanguíneos y linfáticos.	112
DISCUSIÓN	119
1. Papel de ephrinA4 en la supervivencia de las células LLC durante la TEM y su relación con la presencia de linfadenopatías en pacientes de LLC.	122
2. Estudio de la TEM de las células LLC a través de endotelio linfático (HDLEC).	127
3. Estudio del papel de S1PR1 y su interacción con Eph/ephrin.	130
4. Estudio de la interacción de S1PR1 con los receptores de quimiocinas CCR7 y CXCR4 y el papel de las señales Eph/ephrin.	131

CONCLUSIONES	137
BIBLIOGRAFÍA	141
RESUMEN	155
SUMMARY	175
ANEXOS	191
Anexo I. Datos clínicos de los pacientes	193
Anexo II. Tampones y medios de cultivo	197
Anexo III. Anticuerpos	200
Anexo IV. Proteínas recombinantes y quimiocinas	207
Anexo V. Cebadores	210
Anexo VI. Publicaciones	217



Abreviaturas

ABREVIATURAS

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado las siguientes abreviaturas:

7-AAD	7-AminoActinomicina D
APC	Aloficocianina (<i>Alophicocianina</i>)
ARN	Ácido Ribo Nucleico
ARNm	ARN mensajero
-b	Biotina
BSA	Albúmina bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAM	Moléculas de adhesión celular (<i>Cell Adhesion Molecules</i>)
CCR	Receptor de quimiocinas CC (<i>CC chemokine Receptor</i>)
CD	Grupo de diferenciación (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CL-I	Colágeno-I
CXCR	Receptor de quimiocinas CXC (<i>CXC chemokine Receptor</i>)
d	Deleción
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético (<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
Eph	<i>Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma</i>
Ephrin	<i>Eph receptor interacting protein</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FBS	Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)
FITC	Fluorescein isothiocyanate, isotiocianato de fluoresceína
FN	Fibronectina
GL	Ganglio Linfático
h-Fc	Fragmento Constante de Inmunoglobulinas humanas
HDLEC	Células endoteliales linfáticas de dermis de humano (<i>Human Dermal Lymphatic Endothelial Cell</i>)
HEV	Vénulas de endotelio alto (<i>High Endothelial Venules</i>)

HUVEC	Células endoteliales de vena procedentes de cordón Umbilical humano (H uman U mbilical V ein E ndothelial C ells)
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1 (I nter- C ell A hesion M olecule-1)
IgHV	Región variable del gen la cadena pesada de inmunoglobulinas (I mmunoglobulin H heavy chain V ariable)
LBP	Linfocitos B Periféricos
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LM	Laminina
M	Mutado (M utated)
MACS	M agnetic- A ctivated C ell S orting
MEC	M atriz E xtra C elular
MO	M édula O sea
Pb	P ares de b ases
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos (P hosphate B uffered S aline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (P olymerase C hain R eaction)
PE	Ficoeritrina (P hicoerithrin)
PE-Cy5	Ficoeritrina cianina 5 (P hicoerithrin C yanine 5)
PI	Pocillo Inferior
PS	Pocillo Superior
Rh	Recombinante humana
ROI	Regiones de interés (R egion O f I nterest)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción reversa en cadena de la polimerasa (R everse T ranscription P olymerase C hain R eaction)
SAV	Estreptoavidina (S treptavidin)
siRNA	ARN pequeños de interferencia (small interfering R ibonucleic A cid)
SLPC	Síndromes Linfoproliferativos Crónicos
SP	Sangre Periférica

S1P	Esfingosin 1 fosfato (<i>Sphingosin 1 Phosphate</i>)
S1PR1	Receptor 1 de esfingosin 1 fosfato (<i>Sphingosin 1 Phosphate Receptor 1</i>)
TAE	Tris-acetato EDTA
TEM	Migración trans-endotelial (<i>Trans Endothelial Migration</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α (<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>)
Tri12	Trisomía 12
UM	No mutado (<i>Unmutated</i>)
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1 (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>)
VN	Vitronectina



Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Leucemia linfocítica crónica.

La Leucemia linfocítica crónica (LLC) es un síndrome linfoproliferativo crónico (SLPC) de linfocitos B que expresan el antígeno CD5, propio de linfocitos T. Comúnmente suele diagnosticarse en personas de edad avanzada, principalmente entre los 67 y los 72 años, y más frecuentemente en hombres que en mujeres (1,7:1) (Hallek 2015).

Las células LLC se acumulan en la Médula Ósea (MO) y sangre periférica (SP) y, en los casos más agresivos, en bazo y Ganglios linfáticos (GL). La LLC presenta una evolución clínica muy heterogénea, pudiendo encontrar individuos que conviven con la enfermedad durante años sin requerir tratamiento, a casos clínicos muy agresivos que requieren de tratamientos tempranos. Distintos parámetros clínicos sirven para clasificar el estadio de la enfermedad utilizándose, fundamentalmente, los definidos por Rai (Rai y cols. 1975) y Binet (Binet y cols. 1981) (Tabla 1 y 2). Sin embargo, estos criterios de clasificación no son suficientes para pronosticar el curso clínico de la enfermedad por lo que actualmente se están investigando nuevos marcadores moleculares tales como expresión de CD38 (Damle y cols. 1999) y ZAP70 (Crespo y cols. 2003, Wiestner y cols. 2003), el estado mutacional de los genes que codifican para la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas (IgHV) (Damle y cols. 1999, Hamblin y cols. 1999) y la presencia de ciertas alteraciones citogenéticas, principalmente, deleciones (d13q, d11q y d17p) y trisomía 12 (Tri12) (Dohner y cols. 1999).

Actualmente, la LLC es considerada una enfermedad incurable por lo que se hace necesario un mejor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de su patobiología.

Un aspecto crítico de esta enfermedad es la colonización de GL por las células leucémicas (LLC) puesto que allí pueden establecerse nuevos microambientes o nichos tumorales que presumiblemente contribuyen a la progresión clínica de la enfermedad,

su agravamiento y donde es posible que las células leucémicas se escapen de la terapia farmacológica (O'brien y Kay , Munk Pedersen y Reed 2004). Esta infiltración de tejidos linfoides es responsable del desarrollo de alteraciones inmunológicas que, junto a las hematológicas derivadas de la disfunción de la MO, llevan a la aparición de inmunodeficiencias, procesos autoinmunes, anemia y/o trombocitopenia que tienen lugar en los casos más graves de la enfermedad (Hamblin 2002, D'arena y cols. 2003, Keating y cols. 2003, Ghia y cols. 2008).

Tabla 1. . Sistema de estadios clínicos de Rai para la LLC.

Rai (Estadio)	Linfocitosis*	Linfoadenopatía	Esplenomegalia/ Hepatomegalia	Anemia*	Trombocitopenia*	Clasificación de grupos de riesgo
0	Si	No	No	No	No	Bajo
I	Si	Si	No	No	No	Intermedio
II	Si	Si/No	Si	No	No	Intermedio
III	Si	Si/No	Si/No	Si	No	Alto
IV	Si	Si/No	Si/No	Si/No	Si	Alto

* Linfocitosis: > 15.000 mm³, Anemia: Hb < 11 g/dL, Trombocitopenia: < 100.000 mm³

Tabla 2. Sistema de clasificación Binet para la LLC.

Binet	Linfocitosis*	Áreas linfoides afectadas†	Anemia* o Trombocitopenia*	Correspondencia con clasificación Rai
A	Si	Menos de 3	No	Estadio 0, I y II
B	Si	3 o más	No	Estadio I y II
C	Si	Independiente	Si	Estadio III y IV

† Incluyen ganglios linfáticos cervicales, inguinales y axilares ya sea unilaterales o bilaterales, hígado y bazo. * Linfocitosis: > 15.000 mm³, Anemia: Hb < 11g/dL, Trombocitopenia: < 100.000 mm³

En los tejidos linfoides infiltrados, las células LLC se organizan en estructuras denominadas pseudofolículos, que corresponden a focos de proliferación y supervivencia (Ghia y Caligaris-Cappio 2000, Hamblin 2002, D'arena y cols. 2003, Keating y cols. 2003, Munk Pedersen y Reed 2004, Ghia y cols. 2008), y de forma masiva obliterando completamente el GL originando linfoadenopatías (GL agrandados, > 1cm). Actualmente, numerosos estudios están permitiendo avanzar en el

conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que median en la formación y/o mantenimiento de estos microambientes incluyendo aquéllos relacionados con el tráfico, entrada y salida, de las células LLC en los tejidos linfoides. En este sentido, distintos estudios apuntan hacia un posible papel de quimiocinas y sus receptores así como de moléculas de adhesión esenciales en la entrada y retención de linfocitos en la condición sana (Bono y cols. 2007, Kehrl y cols. 2009, Burger y Gribben 2014) así como moléculas implicadas en la salida tales como Esfingosina 1 fosfato (S1P, *Sphingosin 1 phosphate*) y sus receptores (Kabashima y cols. 2006, Baeyens y cols. 2015) (Figura 1).

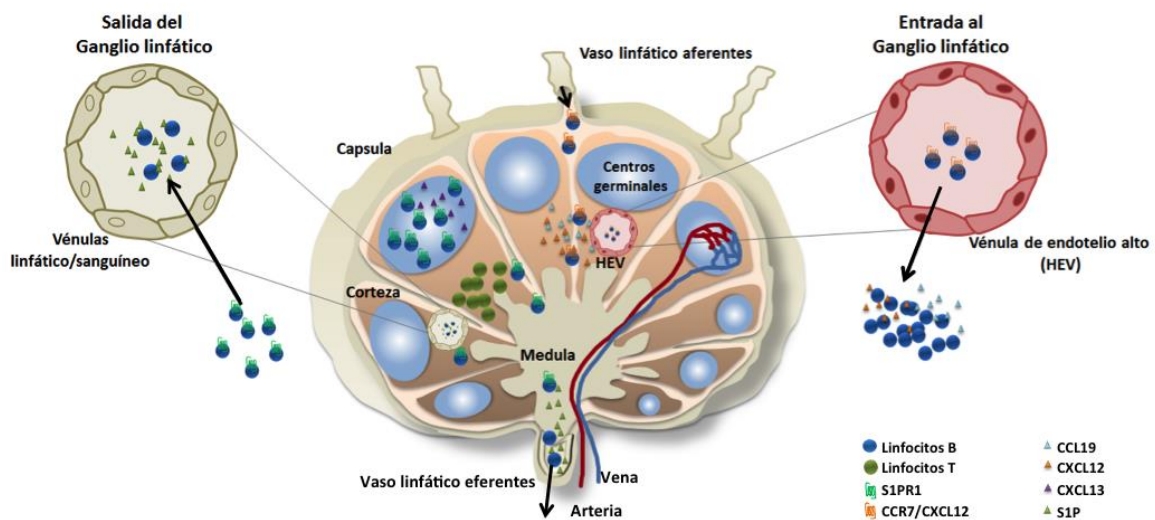


Figura 1. Proceso de entrada y salida de linfocitos en ganglios linfáticos (GL).

Los linfocitos entran al GL (derecha) a través de las vénulas de endotelio alto (HEV), migrando desde la parte apical (luminal) de la célula endotelial hacia la parte basal, mayormente, en respuesta a las quimiocinas CCL19 y CXCL12. El proceso de salida, (izquierda) está regulado, principalmente, por esfingosina 1 fosfato (S1P) presente en altas concentraciones en sangre y linfa. Este proceso de salida está determinado por la alta expresión del receptor 1 de esfingosina 1 fosfato (S1PR1) en los linfocitos y puede tener lugar tanto a través de vasos linfáticos como sanguíneos.

2. Migración trans-endotelial (TEM)

Clásicamente, se ha considerado que la extravasación de las células LLC en GL podría tener lugar a través de las HEV de modo similar al proceso descrito para linfocitos (Figura 2) si bien este extremo aún no ha sido del todo demostrado. Por otra parte, la existencia de algunos trabajos indicando un posible efecto de la migración

trans-endotelial (TEM) en la supervivencia de diferentes tipos celulares como granulocitos (Mcgettrick y cols. 2006), linfocitos T (Borthwick y cols. 2003) o precursores de monocitos CD34⁺CD14⁺(Ferrero y cols. 2003), sugería que el contacto físico de las células LLC con los endotelios durante la extravasación podría tener un papel en la supervivencia de estas células contribuyendo a la infiltración de los GL.

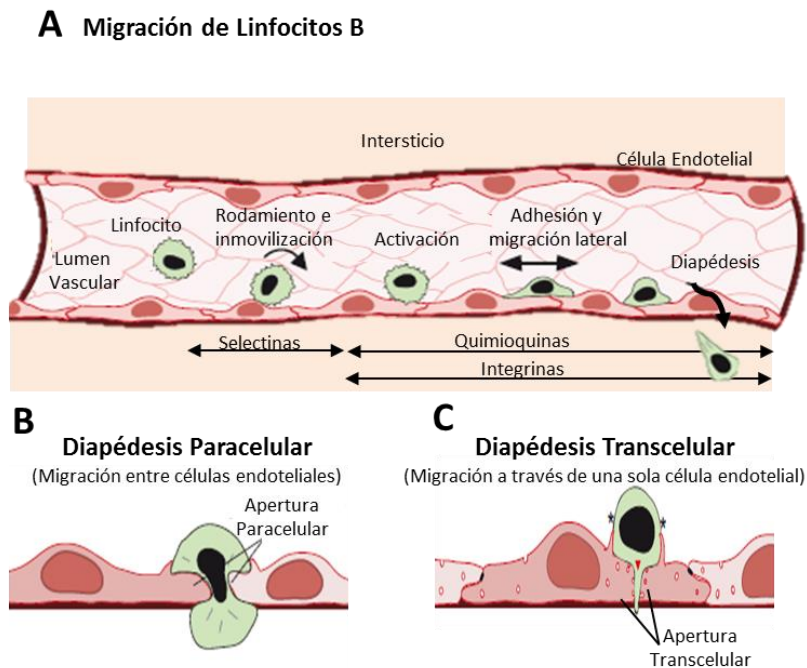


Figura 2. Proceso de extravasación de los linfocitos B.

A) Etapas del proceso de migración de los linfocitos a través de endotelio vascular. La diapédesis se puede dar de dos maneras; B) A través de aperturas entre las uniones de célula-célula llamada “Paracelular” o bien, C) la llamada “Transcelular” que se da mediante aperturas en la membrana de una sola célula mediada principalmente por vesículas y/o caveolina. Adaptado de: Christopher V. Carman, Journal of Cell Science 2009

La capacidad de TEM de las células LLC está ampliamente relacionada con la expresión de la integrina $\alpha 4$ (CD49d) que en conjunto con αL (CD11a) contribuyen al mejoramiento de la TEM en pacientes con adenopatías (Till y cols. 2002, Miyasaka y Tanaka 2004, Till y cols. 2005, Hartmann y cols. 2009, Zucchetto y cols. 2009). Estudios *in vitro* han reportado que los contactos físicos con el endotelio a través de las cadenas de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ rescatan a las células LLC de la apoptosis espontánea (Maffei y cols. 2012), de manera interesante $\alpha 4$ también puede además, mediar la supervivencia de las células LLC dependiente de los contactos célula-célula dentro del microambiente (Trinidad y cols. 2009, Maffei y cols. 2012). Esta característica ha sido asociada con

grupos de peor pronóstico, como los pacientes con ausencia de mutaciones en el gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgHV no mutado, UM) o aquellos con expresión de CD38. En conjunto estas evidencias sugieren ampliamente que la extravasación dependiente de integrinas puede estar fuertemente vinculada a una mayor supervivencia, la cual necesita ser comprobada.

3. Supervivencia y apoptosis

En los tejidos linfáticos infiltrados las células LLC reciben señales extrínsecas de supervivencia y proliferación que provienen de diferentes tipos celulares del microambiente tales como células *nurslike* (NLC), células mesenquimales de estroma (MSC), células T CD4⁺, células asesinas naturales (NK), células foliculares dendríticas (FDC) y células endoteliales, que las protegen de la apoptosis espontánea (Burger 2011, Ten Hacken y Burger 2016).

Ensayos *in vitro* de co-cultivos han demostrado que las células endoteliales a través de factores solubles o contactos físicos protegen a las células LLC de la apoptosis espontánea. Niveles elevados de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-XL han sido encontradas en co-cultivos con células endoteliales incrementando la expresión de CD38 y CD49d y la activación de NF-kappaB (Buggins y cols. 2010). Por otra parte, en otros estudios se observó que la unión de las células LLC a monocapas de células endoteliales protegía de la apoptosis espontánea a través de los contactos célula-célula (Badoux y cols. 2011), sugiriendo que podrían tener efectos similares *in vivo* dentro de los tejidos infiltrados, sin embargo esto no está del todo demostrado (Long y cols. 1995, Moreno y cols. 2001, Ghia y cols. 2008, Buggins y cols. 2010, Badoux y cols. 2011, Burger 2012, Maffei y cols. 2012).

4. Receptores Eph y ligandos ephrin

Los receptores Eph (*Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma*), son la familia más numerosa de los receptores de membrana con actividad *Tirosin-Kinasa*; se unen a sus ligandos ephrin (*Eph receptor interacting protein*) que en un principio

fueron denominados LERK (*Ligands for Eph-Related Kinases*) (Beckmann y cols. 1994). Actualmente en humanos se conocen dos subfamilias que son clasificadas basándose en la homología de la secuencia del dominio de unión y en la afinidad del ligando al que se unen; Eph A (EphA1 –A8 y EphA10) que se unen preferentemente a ligandos de clase A (*ephrin* A1-A6) anclados a la membrana plasmática vía GPI, mientras que los receptores Eph B (EphB1-B4 y EphB6) se unen a ligandos tipo B con un dominio transmembranal (*ephrin* B1 – B3) (Gale y cols. 1996, 1997, Kania y Klein 2016) (Figura 3)

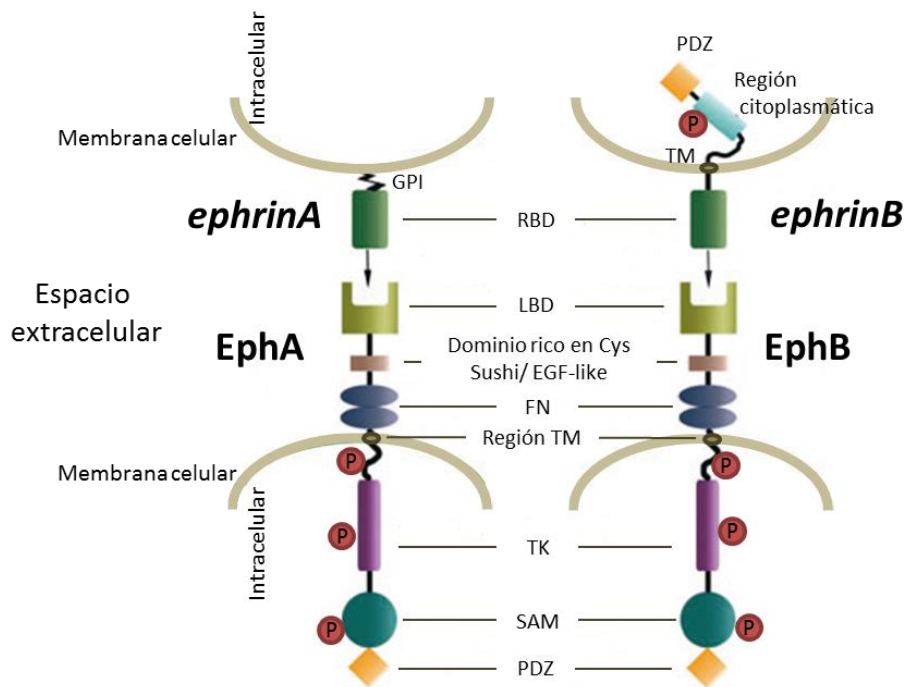


Figura 3. Estructura de Eph y ephrin.

Esquema representativo de los receptores tirosin cinasa y sus ligandos ephrin localizados en la membrana celular en el lado extracelular. La estructura de los receptores Eph esta compuesta por un dominio de unión del ligando (LBD) que se une al dominio de unión del receptor (RBD) de ephrin, seguido de un dominio rico en cisteína (Cys) que abarca los dominios Sushi y el motivo similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF-like) y dos dominios de fibronectina (FN). El lado intracelular está compuesto de una región transmembrana (TM), dominio tirosin kinasa (TK), un motivo SAM y el dominio PDZ. Los ligandos ephrin se dividen en clase A y B: La clase A están anclados a la membrana, unidos vía glicosilfosfatidilinositol (GPI), mientras que la clase B tiene un dominio transmembrana (TM), una pequeña región citoplasmática y un dominio PDZ. La interacción de Eph-ephrin da como resultado la fosforilación de los residuos de tirosina (P) encontrados en el dominio juxtamembranal entre los dominios TK y TM, así como también en los dominios TK y SAM. Adaptado de Hong-Qing Xi y Xiao-Song Wu. *J. Cell Mol. Med.* 2012

Las interacciones entre Eph y ephrin se dan de manera promiscua dentro de cada subclase con mayor o menor afinidad entre unas y otras, pero también se han descrito interacciones entre las dos diferentes clases (A y B) (Kullander y cols. 2001, Kullander y cols. 2003). La unión Eph/ephrin ejerce su acción mediante mecanismos de atracción/repulsión celular que dependen del contacto directo entre células vecinas donde cada una transduce señales independientes en cada interacción celular (Kullander y Klein 2002, Pasquale 2008).

La fosforilación juxtamembranal en los receptores es requerida para la función TK, la cual es crucial para muchas Eph induciendo la señalización y respuesta biológica. La fosforilación además ocurre en el dominio intracelular de las moléculas ephrin-B. Por tanto los receptores Eph como los ligandos ephrin pueden señalizar hacia el interior de la célula que la expresa donde la señalización por parte del receptor Eph se denomina “señal adelante” (*forward*) y la señal que produce el ligando ephrin se conoce como “señal inversa” (*reverse*) (Steube y cols. 1999). Esta interacción Eph/ephrin implica frecuentemente una señalización bidireccional y un papel autónomo o no de la célula que la expresa (Davy y Soriano 2005, Pasquale) *Hong-Qing Xi 2012* (Figura 4).

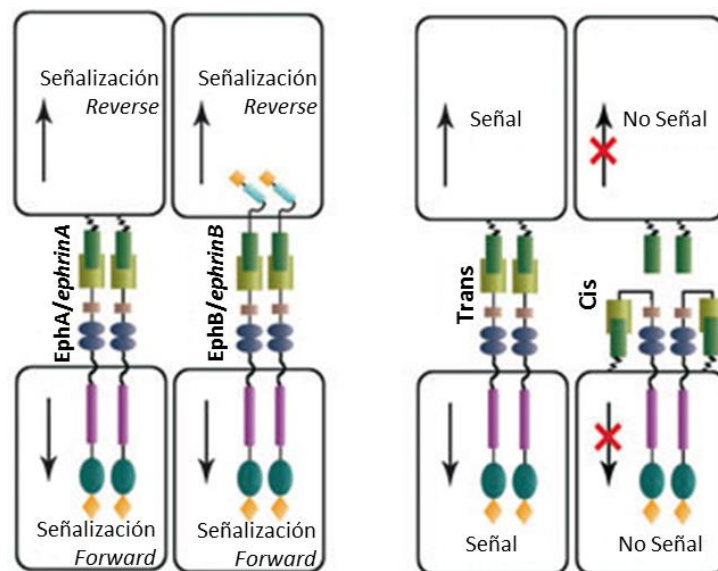


Figura 4. Señalización *Forward* y *Reverse* de Eph y ephrin.

La unión de Eph/ephrin para iniciar la señal debe dar lugar a la formación de tetrámeros, ambas clases de receptores Eph y ligandos ephrin pueden activar una señalización bidireccional (izquierda). Señalización *forward* hacia los receptores y señalización *reverse* hacia los ligandos. Los Eph y ephrin expresados en diferentes células interactúan en trans, e inducen señalización bidireccional, mientras que la interacción Eph/ephrin co-expresada en la misma célula da lugar a interacciones en Cis impidiendo la señal (derecha). Adaptado de *Hong-Qing Xi y Xiao-Song Wu. J. Cell Mol. Med. 2012*

La señalización a través de Eph/ephrin participa en múltiples procesos entre los que se encuentran la regulación de la adhesión celular vía integrinas o cadherinas mediante su conexión con distintos componentes del citoesqueleto modificando la forma y el movimiento celular, además de estar implicadas en otros procesos como las respuestas quimiotácticas, la supervivencia y la proliferación celular (Pasquale , Xi y cols. 2012, Kania y Klein 2016) (Figura 5).

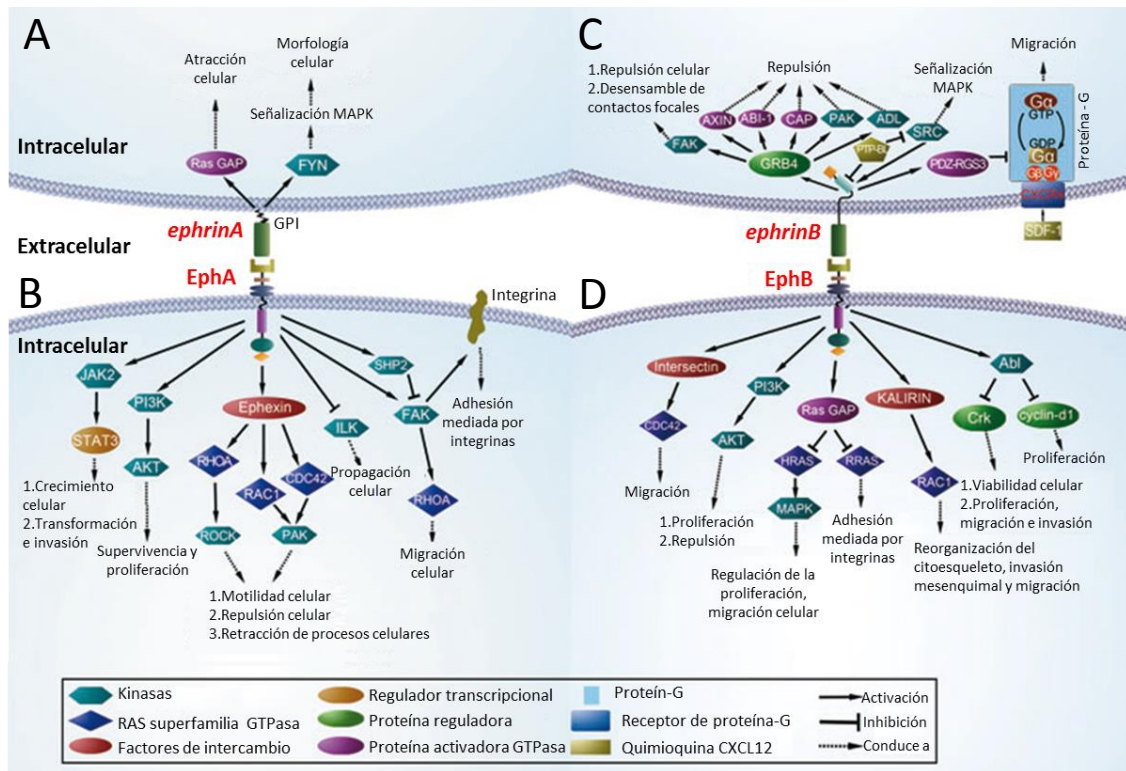


Figura 5. Señalización bidireccional de Eph y ephrin.

Tras la unión del receptor Eph con el ligando ephrin se inicia una señalización en ambas direcciones, en las que distintos miembros de la familia pueden inducir los siguientes mecanismos: A) ephrinA5 es capaz de reclutar y activar FYN miembro de la familia de Src, quien a su vez activa MAPK induciendo cambios en la arquitectura y adhesión celular. B) EphA4 activa la transducción de señales y STAT3. EphA activa directamente GTPasas de la familia Rho (RHOA, RAC1 y CDC42) a través del factor de intercambio Ephexin. Esta vía además implica a EphA2 señalizando a través PI3K en células endoteliales, inhibición de Akt e inactivación de FAK a través de SHP2 fosfatasa y activación de RHO a través de FAK. EphA1 inhibe ILK. C) ephrinB a través de GRB4 que contiene un dominio SH2 puede generar a una red de señalización que modifica la morfología celular. ephrinB1 impide los contactos focales a través de GRB4. La fosfatasa PTP-BL desfosforila ephrinB e inactiva Src. PDZ-RGS3 se une a ephrinB y cataliza la hidrólisis de GDP en la subunidad G-alfa del heterotetramero GPCR que es además inhibido por SDF1 mediando la quimiotaxis a través de CXCR4. D) EphB la señal *forward* a través de este tipo de receptores activa RAC1 y CDC42 a través de los factores de intercambio KALIRIN e Intersectin respectivamente. Además puede activarse Ras GAP que inhibe H-RAS y R-RAS. EphB2 regula posicionamiento vía PI3K. EphB4 suprime la tumorigenesis celular en cáncer de mama a través de la vía Abl-Crk. EphB2 regula la proliferación celular a través de la vía Abl-cyclin D1. Adaptado de *Hong-Qing Xi y Xiao-Song Wu. J. Cell Mol. Med. 2012*

Se ha descrito que Eph y ephrin juegan un papel crítico en cáncer donde presenta una dualidad en las interacciones celulares. Por un lado alteraciones en la expresión o la agrupación y activación de estas moléculas son consideradas supresores tumorales principalmente por su restricción invasiva o progresión tumoral, pero también se ha señalado que participan facilitando la neo-angiogénesis, la invasión tumoral y las metástasis (Batlle y cols. 2005, Noren y Pasquale 2007, Moreno y Montserrat 2008, Dunne y cols. 2016, Lv y cols. 2016), por lo que podrían actuar como marcadores de pronóstico entre otros, en cáncer de colon, pulmón, mama, próstata o melanoma (Huusko y cols. 2004, Castano y cols. 2008, Merlos-Suarez y Batlle 2008, Zogopoulos y cols. 2008, Pasquale, Li y cols. 2015, Miao y cols. 2015, Husa y cols. 2016, Peng y cols. 2016, Xu y cols. 2016). Sobre esta base en los últimos años se han desarrollado nuevos fármacos antitumorales basados en el bloqueo de ciertas Eph (Kertesz y cols. 2006, Campbell y cols. 2008, Castano y cols. 2008, Pasquale).

Actualmente un número creciente de trabajos han demostrado expresión y posible función de estas moléculas en el sistema inmune, principalmente centrados en la fisiología del timo y los linfocitos T (Munoz y cols. 2002, Yu y cols. 2004, Munoz y cols. 2006). Sin embargo, los estudios sobre linfocitos B o neoplasias hematológicas como las leucemias, han sido escasos (Aasheim y cols. 2000, Alonso y cols. 2009, Trinidad y cols. 2009, Trinidad y cols. 2010, Takahashi y cols. 2014, Charmsaz y cols. 2015), por lo que es de importancia el estudio en este tipo de malignidades.

5. TEM y el papel de Eph/ephrin

Diversas interacciones de Eph/ephrin se han descrito en diferentes tipos de endotelio con diferentes tipos de leucocitos, en las que algunas isoformas de Eph/ephrin han sido implicadas en la activación endotelial y TEM de leucocitos y células cancerígenas (Hordijk 2016) (Figura 6). Nuestro laboratorio ha encontrado que las interacciones EphA2/ephrinA4 juegan un papel crucial en los procesos de migración trans-endotelial a través de endotelios vasculares en la leucemia linfocítica crónica (Alonso y cols. 2009, Trinidad y cols. 2009).

Como ha sido demostrado a través de ensayos TEM, ya sea en condiciones estáticas o de flujo, las células LLC muestran una capacidad de TEM menor que los linfocitos B sanos (Till y cols. 2002, Miyasaka y Tanaka 2004, Till y cols. 2005, Hartmann y cols. 2009, Zucchetto y cols. 2009). Esto es debido en parte a la sobreexpresión de ephrinA4, ligando de los receptores Eph, que se encuentra unido a la membrana y como isoforma soluble en las células LLC y linfocitos B sanos (Aasheim y cols. 2000, Alonso-Colmenar y cols. 2009). La señal *reverse* de la isoforma expresada en membrana inducida por la unión con su receptor EphA2 en la superficie de la célula endotelial inhibe la adhesión mediada por integrinas de las células LLC al endotelio (Till y cols. 2002, Trinidad y cols. 2010) probablemente afectando la extravasación. En contraste, en ensayos *in vitro* se ha demostrado que la isoforma soluble mejora la TEM de las LLC cuando se une a la célula endotelial en un mecanismo poco caracterizado, involucrando el secuestro de EphA2 y reclutamiento de ICAM-1 y VCAM-1 (Trinidad y cols. 2009).

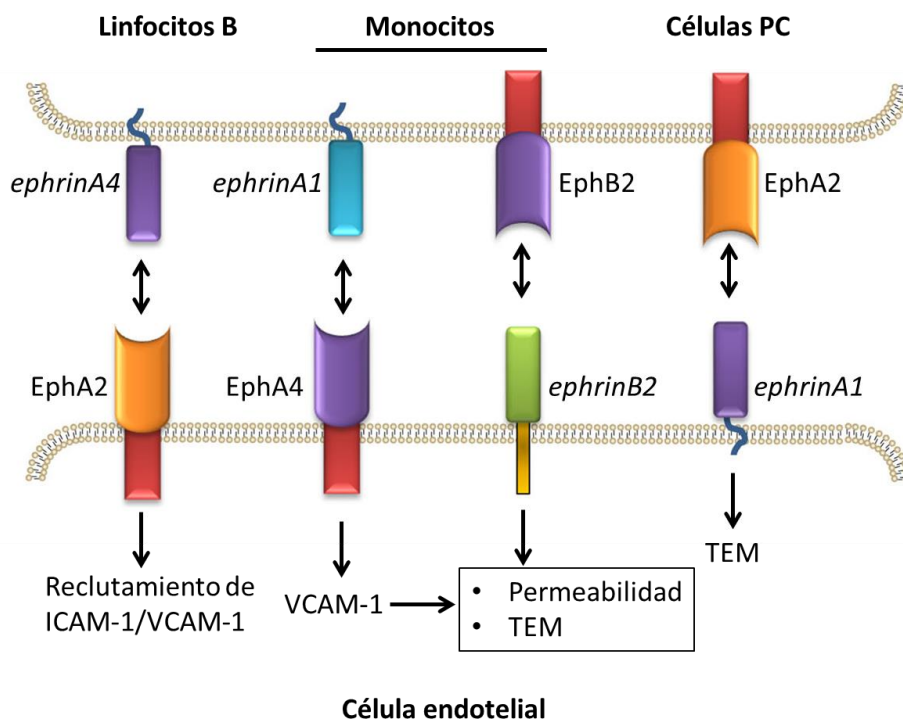


Figura 6. Esquema representativo de algunos ejemplos de interacciones Eph/ephrins implicados en la TEM.

La interacción de receptores Eph y sus ligandos ephrin han sido implicados en la migración trans-endotelial (TEM) de leucocitos como linfocitos B y monocitos así como en células cancerígenas como las del cáncer de próstata (PC). Algunas de estas interacciones resultan en un incremento de la permeabilidad y efectos de reclutamiento o expresión de ICAM-1 y VCAM-1 que conducen a una TEM. Adaptado de Peter L. Hordijk *Cellular and Molecular Life Sciences* 2016.

Un aspecto interesante observado en pacientes con adenopatías es la baja expresión de la isoforma de membrana de ephrinA4 y los niveles aumentados de la isoforma soluble en suero (Alonso-Colmenar y cols. 2009), sugiriendo que ambas pueden contribuir a la diseminación ganglionar. Estos pacientes con adenopatías pueden presentar varios gánglios infiltrados dentro de la misma cadena ganglionar, lo que probablemente se deba a la infiltración de las células leucémicas hacia los gánglios linfáticos vecinos a través de la linfa, promoviendo su diseminación. La migración a través de endotelios linfáticos es un aspecto poco o nada estudiado dentro de la patología de la enfermedad, por lo que sería de interés el estudio de los endotelios linfáticos y su papel en la diseminación a través de la linfa, donde probablemente la interacción EphA2-ephrinA4 previamente descrita por nuestro laboratorio en la TEM por endotelio sanguíneo (Trinidad y cols. 2009) intervenga en este proceso a través de linfáticos.

6. Esfingosina-1-fosfato (S1P) en la migración trans-endotelial (TEM)

La extravasación de los linfocitos hacia los tejidos linfáticos está ampliamente estudiada, sin embargo los mecanismos de salida de los linfocitos desde los gánglios linfáticos hacia la circulación no están del todo descritos. Estudios han demostrado que la salida de los linfocitos se da en respuesta a esfingosin-1-fosfato (S1P). S1P puede actuar intracelularmente como intermediario en la membrana para el metabolismo de esfingolípidos y extracelularmente como ligando de receptores unidos a proteína G (GPCR). Esta familia fue llamada receptores de esfingosina 1 fosfato (S1PR) conformada por 5 miembros S1PR1 – S1PR5. (Rivera y cols. 2008).

S1P se encuentra en altas concentraciones en la sangre periférica que van de 100nM a 1µM y en linfa con concentraciones de hasta 6 veces menores que en sangre. Sin embargo en tejidos linfoides su concentración es mucho menor (Lee y cols. 2007) por lo que existe una diferencia de gradientes a través de la cual migran los linfocitos por la señal generada a través del receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1PR1)(Matloubian y cols. 2004). S1PR1 debe ser re-expresado dentro del GL el cual se ve favorecido por las bajas concentraciones de S1P en el tejido. En circulación los

linfocitos internalizan S1PR1 debido a las altas concentraciones de S1P en la sangre periférica y linfa (Schwab y cols. 2005, Rivera y cols. 2008) (Figura 7).

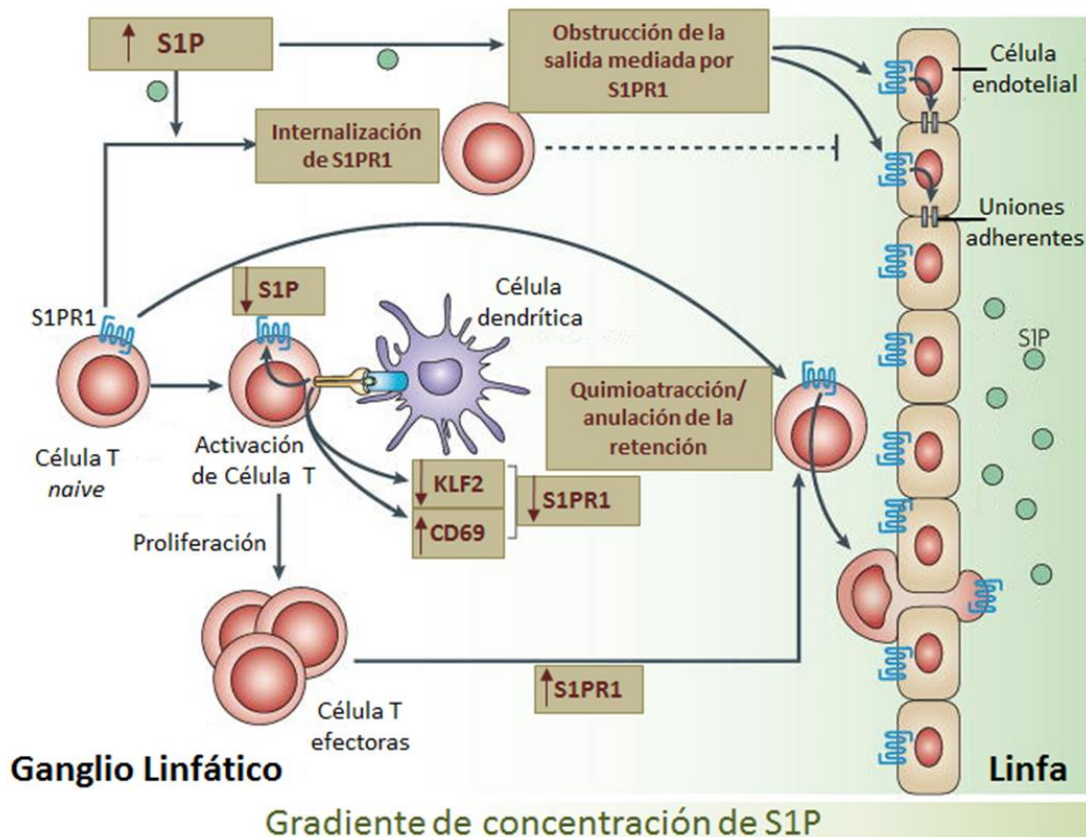


Figura 7. Esquema representativo de la salida de linfocitos T desde el ganglio linfático (GL) mediada por S1PR1.

Los niveles de esfingosin-1-fosfato (S1P) en tejido linfoide normalmente se encuentran relativamente bajos comparado con la linfa, formando de este modo un gradiente de S1P (sombreado verde). El receptor 1 de S1P (S1PR1) expresado en las células T es sensible al gradiente de S1P y promueve la salida de las células T desde el órgano linfoide a través de la barrera endotelial hacia la linfa. Después de la activación de la célula T en el GL tras encontrarse con una célula dendrítica o por estimulación de interferón tipo I, la expresión de S1PR1 disminuye. Los mecanismos incluyen la interacción directa proteína-proteína con CD69, la cual es inducida después de la estimulación de interferón tipo I y el silenciamiento del factor de transcripción KLF2, que es un activador directo del gen S1PR1. Células T efectoras eventualmente re-expresan S1PR1 y con ello la salida desde los GL hacia la linfa. Si los niveles de S1P son incrementados en los tejidos linfoides, por la inhibición de S1P-liasas o por la inflamación, la salida de las células T puede ser bloqueada por varios mecanismos posibles: disipación del gradiente de S1P, disminución de la expresión de S1PR1 en las células T por la internalización inducida por el ligando y por la obstrucción en la salida mediada por el endotelio a través del aumento de las uniones adherentes. Adaptado de Juan Rivera y col. *Nature reviews-Immunology 2008*

En la última década diferentes estudios han abundado en este proceso y con mayor auge en linfocitos T (Yopp y cols. 2005, Ledgerwood y cols. 2008), mientras que

los mecanismos que involucran a los linfocitos B han sido menos estudiados y en un menor grado dentro de la patología de la LLC (Capitani y cols. 2012, Borge y cols. 2014, Sic y cols. 2014, Patrussi y cols. 2015, Till y cols. 2015). La retención de las células LLC en el GL puede ser en parte, debido a la reducción de la expresión S1PR1, mostrando niveles variables en la expresión pero suficientes para responder a S1P en ensayos realizados *in vitro* a través de filtros (Capitani y cols. 2012, Borge y cols. 2014). Sin embargo los mecanismos de TEM en respuesta a S1P dentro de esta patología a través de endotelios no han sido del todo abordados, por tal motivo es importante profundizar en su estudio para un mejor entendimiento de la formación de linfadenopatías que producen un agravamiento de los pacientes de LLC.

7. Esfingosina-1-fosfato (S1P) y Quimiocinas

Mientras que quimiocinas como CCL19 y CXCL12 y sus receptores CCR7 y CXCR4 involucran a las células LLC en la infiltración de los GL (Lopez-Giral y cols. 2004, Davids y Brown 2012), S1P y su receptor S1PR1 son requeridos en la salida desde los GL (Capitani y cols. 2012). Estudios *in vitro* de TEM con linfocitos T procedentes del bazo han demostrado que el estímulo de S1PR1 mejora la migración en respuesta a CXCL12 y CCL19, mientras que en linfocitos T procedentes del GL el estímulo es necesario para la respuesta a CXCL12 pero no para CCL19 (Yopp y cols. 2005). Estudios en procesos cancerígenos y en células de mieloma múltiple han demostrado que la adhesión y migración de estas células por la actividad en conjunto de CXCL12 y S1P podría tener importantes consecuencias en la progresión de la enfermedad (Garcia-Bernal y cols. 2013), mientras que en células LLC el estímulo con CXCL12 inhibe la migración en respuesta a S1P (Borge y cols. 2014). Estudios *in vivo* e *in vitro* en condiciones de entrada y salida de linfocitos T hacia y desde el GL respectivamente han demostrado que S1P causa retención en los tejidos inhibiendo la entrada a los vasos linfáticos aferentes (Ledgerwood y cols. 2008). Pero el estudio de estas interacciones en la TEM de las células LLC a través de endotelios sanguíneos y linfáticos desde la perspectiva de condiciones de entrada y/o salida aún no ha sido abordado.

Estudios de histoquímica en linfadenopatías de pacientes de LLC comparadas con GL reactivos (sanos), muestran que la expresión de CXCR4 y CCR7 se mantienen altas, promoviendo un acúmulo de estas células en el GL que junto con la deficiencia

en la expresión de S1PR1, generan un desequilibrio que promueve la formación de linfadenopatías (Patrussi y cols. 2015). Sin embargo, el cómo estos dos sistemas de receptores se regulan para la entrada y salida de las células LLC hacia y desde los GL no ha sido descrito.

Estos datos en conjunto revelan, que, aunque en los últimos años ha habido grandes avances en el estudio de infiltración y salida de los linfocitos hacia y desde el GL a través de endotelios sanguíneos y linfáticos, aún no está del todo esclarecido el cómo interactúan y se modulan estos dos sistemas, sobretodo en la patología de la LLC. Por tanto es necesario un mayor conocimiento de estos mecanismos que puedan ayudar a evitar la progresión de la enfermedad.

8. Esfingosina-1-fosfato (S1P) y Eph/ephrin

Entre los múltiples procesos en los que participan las señalizaciones de Eph/ephrin como repulsión celular, adhesión célula-célula, proliferación y migración (Pasquale 2008, Kania y Klein 2016), cabe señalar su participación en procesos cancerígenos interviniendo en la migración celular, como el caso de EphA2 en gliomas y cáncer de próstata (Astin y cols. 2010, Miao y Wang 2011), y en el caso específico de la interacción EphA2-ephrinA4 en la LLC (Trinidad y cols. 2009). Actualmente se han desarrollado agentes terapéuticos que involucran la señalización del BCR actuando como inhibidores de cinasas como diana terapéutica, provocando una movilización de las células LLC desde el ganglio linfático hacia la sangre periférica, produciéndose una rápida linfocitosis y disminución de adenopatías en este tipo de paciente (Friedberg y cols. 2010, Hoellenriegel y cols. 2011, Davids y Brown 2012, Advani y cols. 2013, Till y cols. 2015).

Por tanto podríamos pensar que los receptores Eph al ser miembros de la familia tirosin kinasa podrían intervenir en la señal de S1P y por tanto provocar una movilización en las células LLC desde el GL. Además existen estudios que se han centrado en el desarrollo terapéutico contra Eph y/o ephrin (Boyd y cols. 2014). De tal manera que las señalizaciones Eph-ephrin en los últimos años han sido un objetivo importante en terapias contra cáncer.



Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar la patobiología de los procesos de diseminación de las células leucémicas en la leucemia linfocítica crónica a través de endotelios sanguíneos y linfáticos y el papel que juegan las interacciones de los receptores Eph y sus ligandos ephrin en dicho proceso.

Objetivos parciales:

1. Estudiar la viabilidad de las células LLC durante la migración trans-endotelial (TEM), su asociación con la expresión de integrinas y su implicación en el desarrollo de linfadenopatías.

2. Determinar el significado que para la patobiología de la enfermedad tiene la sobreexpresión de ephrinA4 y la presencia de una isoforma soluble, así como sus efectos en la supervivencia de las células LLC durante la TEM a través de endotelios sanguíneos.

3. Caracterizar las vías de migración transcelular y paracelular de las células LLC a través de endotelios sanguíneos, el papel de Eph/ephrin en los mismos y su relación con la supervivencia/muerte de las LLC en procesos *in vivo*.

4. Analizar si la ruta linfática es utilizada por las células LLC para entrada a los ganglios linfáticos, su relación con la supervivencia y el posible papel en la diseminación.

5. Determinar qué interacciones Eph/ephrin están principalmente implicadas en la TEM a través de endotelios linfáticos incluyendo el análisis de EphA2/ephrinA4.

6. Determinar el papel que juegan las interacción de EphA2/ephrinA4 y EphB4/ephrinB2 en procesos de salida de las células LLC a través de endotelios sanguíneos y linfáticos, así como la interacción de S1PR1 y los receptores de quimiocinas CCR7 y CXCR4.



Material y Métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras humanas.

Los pacientes dieron su consentimiento informado antes de su inclusión en este estudio de acuerdo con los principios contenidos en la declaración de Helsinki. El estudio cuenta con la aprobación de los comités éticos de investigación de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y los hospitales participantes (HGU Morales Meseguer de Murcia, HGU Gregorio Marañón de Madrid, Clínico San Carlos de Madrid). Para este estudio respetamos la identidad de los donantes tanto de pacientes de LLC como donantes sanos manteniéndola en el anonimato en todo momento.

1.1 Pacientes de LLC

Las muestras humanas utilizadas fueron sangre periférica de pacientes de LLC, así como pequeñas porciones de adenopatías o ganglios linfáticos destinados a estudios anatomopatológicos de diagnóstico propios del hospital. Todas las muestras correspondían a sobrantes de material utilizado por los especialistas clínicos en los procedimientos rutinarios de seguimiento de los pacientes o cirugías practicadas a los mismos con fines terapéuticos y previo consentimiento informado de los pacientes para la donación de tejidos con fines de investigación.

El diagnóstico de los pacientes se realizó de acuerdo a estándares clínicos, morfológicos e inmunofenotípicos propios de la enfermedad. Los pacientes no estaban en tratamiento en el momento de obtención de la muestra y los datos clínicos fueron proporcionados por los respectivos hospitales. Para el estudio de la viabilidad durante la TEM se incluyó un total de 30 sujetos (Anexo I, Tabla 1), para el estudio de la diseminación a través de endotelio linfáticos y sanguíneos y del papel de S1P fueron utilizadas 15 muestras de pacientes de LLC (Anexo 1, Tabla 2).

1.2 Donantes Sanos

Donantes que al momento de la toma de muestra de sangre periférica no presentaban ningún síndrome linfoproliferativo fueron considerados donantes sanos. Las muestras de sangre periférica fueron donadas por voluntad propia de acuerdo a los

estándares éticos para fines de investigación. Se utilizaron 10 muestras de sujetos para el estudio de la viabilidad durante la TEM por endotelios sanguíneos y 2 muestras para el estudio de la diseminación y el papel de S1P.

2. Procesamiento de muestras.

2.1 Aislamiento de Células B leucémicas (LLC) y linfocitos B sanos (LBP) para ensayos *in vitro*.

Para obtención de la población de linfocitos B requeridas para este estudio, la fracción linfocitaria de las muestras de sangre periférica de donantes sanos o pacientes de LLC, recolectada en anticoagulante (EDTA), fue enriquecida mediante centrifugación a 400 g durante 30 minutos a 22°C (*Centrifuge 5810; Eppendorf*) en solución Histopaque-1077 (*Sigma-Aldrich*) en proporción de 1:2 (por cada volumen de sangre dos de histopaque). La fracción superior correspondiente al plasma fue recuperado y almacenado a -80°C para estudios posteriores. La fracción leucocitaria ubicada en la interfase Histopaque-plasma se recuperó en solución PBS-EDTA-FBS (Anexo 2). Tras el recuento celular en cámara de *Neubauer (BRAND GMBH + CO KG)* las suspensiones celulares fueron procesadas de acuerdo al tipo de muestra, fenotipo y propósito del estudio para los ensayos *in vitro*. El enriquecimiento de las poblaciones B se realizó mediante depleción del resto de poblaciones leucocitarias.

El aislamiento de las poblaciones de células LLC y LBP se realizó mediante depleción de otras poblaciones de sangre periférica, principalmente linfocitos T, células NK (*Natural Killer*), monocitos y granulocitos. Para ello, las suspensiones celulares de la fracción leucocitaria enriquecida previamente en Histopaque-1077 se incubaron con una mezcla de anticuerpos de ratón contra antígenos humanos expresados por las poblaciones a eliminar (CD2, CD3, CD14, CD13 y CD56; *BD Biosciences*) (Anexo 3, Tabla 1). Posteriormente, las suspensiones se incubaron nuevamente con bolas magnéticas (*Dynabeads[®] Pan Mouse IgG, Invitrogen*) conjugadas a un anticuerpo secundario frente a IgG de ratón, en una relación de 4 bolas por cada célula diana. La suspensión celular incubada con las bolas se colocó en un separador magnético (*Dynal*), realizándose dos rondas de separación. La proporción de células CD19⁺ en la fracción resultante de la separación, se verificaba mediante

análisis por citometría de flujo de suspensiones teñidas con anticuerpos anti CD19 humano unido a FITC (*Immunostep*). Las suspensiones celulares recuperadas tras la depleción estaban enriquecidas con más del 98% de la población CD19⁺ en las células LLC o más del 90% en el caso de los LBP.

2.2 Procesamiento de adenopatías y ganglios linfáticos (GL).

Biopsias frescas de linfadenopatías de pacientes LLC eran divididas en porciones utilizando un bisturí y se embebían en un medio crio-protector (Tissue-TEK[®] O.C.T.[™] Compound; *Sakura Finetek*) específico para la preservación de tejidos. Tras la congelación rápida mediante inmersión en nitrógeno líquido, los tejidos congelados se almacenaron en el mismo hasta ser utilizados. Para los estudios de inmunofluorescencia, se obtuvieron secciones tisulares de ganglios linfáticos de 7 µm de grosor, mediante corte en congelación con un crio-tomo (*Leyca*), los cortes se almacenaron en un congelador a -80°C hasta su utilización.

3. Cultivos celulares

3.1 Cultivo de células endoteliales HUVEC y HDLEC

Células endoteliales humanas de cordón umbilical (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC; *PromoCell*) y células primarias endoteliales humanas de dermis linfática (*Human Dermal Lymphatic Endothelial Cell*, HDLEC; *PromoCell*) se cultivaron en medio de cultivo comercial *Endothelial Cell Growth Medium 2* y *Endothelial Cell Growth Medium MV2* (ambos *PromoCell*) respectivamente, hasta su utilización en los experimentos, renovándolo cada 2 días de cultivo y desdoblándolos, para su expansión, cuando la confluencia en los recipientes de cultivo (*flasks*, *BD Falcon*) era de aproximadamente un 70%, mediante un primer lavado (5 segundos) con PBS-EDTA (Anexo 2) y seguido de incubación (1 minuto) en una solución PBS-EDTA-TRIPSINA (*Sigma-Aldrich*) (Anexo 2). Se neutralizó la tripsina con RPMI-FBS y se centrifugaron las muestras a 220 g durante 4 minutos. Las células se re-suspendieron en el medio de cultivo correspondiente y se realizó un conteo celular tras el que se sembraron según el experimento requerido o se crio-preservaron en FBS-10%DMSO en nitrógeno líquido. Todas las soluciones se atemperaron previamente a 37°C y las células utilizadas en los experimentos no excedieron los 6 pases.

3.2 Co-cultivos de HUVEC o HDLEC con células LLC y/o LBP para ensayos de migración

Se utilizaron portaobjetos multipocillo *Chamber slides* (Corning) previamente tratados con fibronectina (*Sigma-Aldrich*) (10 µg/mL, dos horas a 37°C),.Tras dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X (Anexo 2) se sembraron células HUVEC y HDLEC para su cultivo hasta obtener confluencia. Las células LLC y/o LBP se co-cultivaron durante dos horas con las monocapas, pretratadas o no, con TNF-α (ver tratamientos), tras lo cual los cultivos se fijaron en una solución comercial conteniendo paraformaldehído (*Cytofix-cytoperm* BD). Según el caso, se realizaron tratamientos con proteínas recombinantes ephrinA4-Fc (R&D Systems®) o EphA2-Fc (R&D Systems®) (ver tratamientos). Tras la fijación se realizó la tinción con anticuerpos (Anexo 3) según se requería.

3.3 Co-cultivos de HUVEC con células LLC, para ensayos de supervivencia.

Células HUVEC fueron crecidas en placas de cultivo multipocillos hasta alcanzar la confluencia. Las monocapas de HUVEC fueron tratadas o no con TNF-α (10 ng/mL) durante la noche (12 horas) en medio para HUVEC (*Promocel*). El tratamiento de TNF se lavaba con medio RPMI previamente atemperado (37°C). Un grupo de cultivos se fijaban con solución formaldehido 4% comercial (*Cellfix, BD*) durante 15 minutos en el incubador, se lavaron (3 veces) con PBS 1X para quitar el exceso del fijador. Para ambas condiciones (fijadas y no), se añadieron $2,5 \times 10^5$ células LLC en medio RPMI-Experimental (Anexo II), cultivándose durante distintos tiempos como se detalla en el apartado *Resultados*.

Para la determinación por citometría de flujo de la supervivencia y apoptosis de las células leucémicas en estos cultivos, las células eran recuperadas de los pocillos en su totalidad, mediante tratamiento con PBS-EDTA-TRIPSINA, en los cultivos con HUVEC vivas, o PBS-EDTA en los cultivos con HUVEC fijadas.

Para los ensayos con medio condicionado, las células LLC fueron cultivadas 12 horas con medio de cultivo (control) o medio condicionado procedente de co-cultivos de células LLC-HUVEC-no TNF después de 5 días de cultivo. Tras las 12 horas de cultivo las células LLC fueron recuperadas con PBS-EDTA y analizadas por citometría de flujo con la tinción de Anexina V-PE/7AAD.

La tinción AnexinaV/7AAD en todos los casos se realizó como se describe en el apartado de análisis por citometría de flujo.

3.4 Cultivos en suspensión sobre moléculas de adhesión celular (MAC) y matrices extracelulares (MEC) pegadas a placa.

Para el estudio de la supervivencia generada por la señal de los ligandos VCAM-1 e ICAM-1 realizamos ensayos de cultivos en suspensión. Para ello las proteínas recombinantes rhVCAM-1 y rhICAM-1 (R&D Systems®) (5 µg/mL de cada una), así como las MEC en las que incluimos fibronectina (FN), vitronectina (VN), laminina (LM), colágeno tipo 1 (CL-1) (todas de *Becton Dickinson*) (10 µg/mL de cada una) y BSA (*Sigma*) (5 µg/mL) usada como proteína control, fueron unidas a la superficie de los pocillos de las placas multipocillo (96 pocillos, *Corning*) durante 2 horas a 37°C diluidas en 100 µL de PBS 1X a la concentración indicada. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con PBS 1X de 15 minutos. Posteriormente se añadieron las células LLC pre tratadas y no con EphA2-Fc (ver tratamientos), en un volumen final de 200 µL de medio completo (Anexo 2) y se incubaron durante 12 horas a 37°C, 5% CO₂. El análisis de supervivencia se realizó por citometría de flujo mediante de la tinción de Anexina-V-PE/7-AAD.

3.5 Ensayos del estado de activación de integrinas y de unión al ligando.

Suspensiones celulares de células LLC (1X10⁵/mL) fueron pre-incubadas durante 30 min a 37°C en medio de cultivo RPMI 2% FBS, con y sin MnCl₂ (1mM), a los cuales se añadieron fragmentos purificados Fc de IgG humana (Jackson). Posteriormente las células se mantuvieron en el mismo medio al que se agregó proteína recombinante humana EphA2 (0.5µg/1X10⁶células) y se incubaron durante 30 minutos. Tras un lavado con RPMI se detectó por un lado el estado de activación de α4 (VLA4), para lo que las células fueron incubadas en frío con el anticuerpo HUTS21 unido a PE en PBS (*Becton Dickinson*). Por otro lado para analizar la unión al ligando, VCAM-1 soluble fue previamente agrupado con anticuerpo contra IgG humano con afinidad al fragmento Fc conjugado a PE y posteriormente añadido a la suspensión celular. Después de 30 minutos con los anticuerpos en ambos ensayos, se analizaron por citometría de flujo.

4. Análisis de la expresión de Eph/Ephrin mediante Q-RT-PCR

4.1 Aislamiento de ARN

El ARN se extrajo de monocapas cultivadas de HDLEC estimuladas y no con TNF- α (ver tratamientos) utilizando una solución comercial (TRI-REAGENT; *Sigma-Aldrich*) basada en el método de extracción mediante fenol-cloroformo. Las células se recuperaron de los cultivos endoteliales mediante tratamiento con PBS-EDTA-TRIPSINA (Anexo 2), como se describe en el apartado 3.1 de este apartado.. Posteriormente se lisaron en la solución *Tri-Reagent*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad y calidad del ARN extraído se valoró mediante lectura de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm de longitud de onda (SmartSpecTM3000, Bio-Rad). Se consideró un valor óptimo de calidad de ARN (A_{260}/A_{280}) de 1,8-2.

4.2 PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR)

La determinación por PCR cuantitativa (Q-RT-PCR) del contenido de ARNm de los miembros de la familia de Eph/ephrin en los endotelios linfáticos (HDLEC), fue realizada por el CAI de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), utilizando el sistema *TaqMan[®] Low Density Array (Thermo Fisher Scientific)*. Se empleó β -actina como gen de control interno (*housekeeping*). Los valores de Q-PCR-RT de HDLEC estimuladas y no con TNF- α se expresaron como valor ΔCt (CT GEN PROBLEMA – CT β -ACTINA).

5. Análisis mediante Citometría de flujo.

La adquisición de células se realizaba en un citómetro de flujo analizador (FACSCALIBUR; *BD Immunocytometry systems*) del Centro de Citometría y Microscopía Fluorescencia de la UCM, equipado con dos láseres de 488 nm y 630 nm y cuatro detectores de fluorescencia. La adquisición y el análisis de muestras se llevó a cabo con los programas *CellQuest-Pro (BD Immunocytometry systems)*.

5.1 Tinción de células LLC, linfocitos B y células endoteliales HDLEC

La tinción con anticuerpos de los distintos tipos celulares (HDLEC, células LLC o linfocitos B) se realizó sobre suspensiones celulares en solución PBS-FACS (Anexo 2) (3×10^5 células /50 μ l). Para la tinción en superficie se incubaron las células con

concentraciones saturantes de anticuerpos directamente unidos a fluorocromo, o a biotina, o no modificados (Anexo 3, Tabla 2, 3 y 4). En el caso de anticuerpos unidos a biotina éstos se identificaron mediante incubación de la suspensión celular con SAV unida a fluorocromo (SAV-Alexa-Fluor®488; *Molecular Probes, Invitrogen*). En el caso de anticuerpos no modificados, su presencia en las células se detectó incubando las suspensiones con anticuerpos secundarios especie-específicos unidos a un fluorocromo (*Invitrogen*). En todos los casos se utilizaron cantidades saturantes de anticuerpo, recomendadas por los fabricantes o evaluadas previamente en el laboratorio.

En las tinciones en las que se utilizaron anticuerpos contra el dominio intracitoplásmico de proteína, tras realizar las tinciones de los marcadores de la superficie celular, las células se incubaron con la solución Cytofix/Cytoperm (*BD Biosciences*), conteniendo 4% paraformaldehído durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron en un tampón comercial que contenía saponina como agente permeabilizante (*PermWash, BD Biosciences*), en el que así mismo se realizó la incubación con los anticuerpos intracelulares. Finalmente las células eran re-suspendidas en tampón PBS-FACS para su análisis por citometría de flujo.

5.2 Análisis de supervivencia mediante de la tinción de Anexina-V-PE/7-AAD.

Para determinar la viabilidad las células LLC, estas se incubaron en tampón de Anexina (Anexo 2) conteniendo Anexina-V-PE (1µL/marcaje) (*Inmunostep*) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con α-CD19 unido a FITC (*Inmunostep*) en frío durante 15 minutos. Tras un lavado con el tampón de anexina se incubaron con 7-AAD (0,1 µg/marcaje) (*Sigma-Aldrich*) en 100µL de tampón durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 100 µL más del tampón de anexina y se analizó por citometría de flujo. Considerando células apoptóticas (Anexina V^{pos}, 7AAD^{neg}) y células viables (Anexina V^{neg}, 7AAD^{neg}).

6. Ensayos de Migración

6.1 Ensayos de trans-migración endotelial (TEM).

Los ensayos de trans migración de las células LLC o LBP a través de monocapas de HUVEC y/o HDLEC se realizaron en cámaras *Boyden*, placas *transwell Insert Plates*

de 96 pocillos, con filtros de 5 μm de tamaño de poro (*Corning*). Pevio a los ensayos, las HDLEC y/o HUVEC fueron crecidas sobre los filtros para las migraciones desde la parte apical de la célula endotelial hacia el lado basal de la misma (TEM Apical-Basal) (Figura 8A), o debajo de ellos para las migraciones desde la parte basal hacia la parte apical (TEM Basal-Apical) (Figura 8B), según el tipo de estudio que se requería. Los filtros se pre-trataron con fibronectina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y las células se dejaron en cultivo hasta alcanzar una confluencia del 100%. Posteriormente, las monocapas se trataron con 10 ng/mL de TNF- α durante toda una noche (12 horas), que se retiró al menos cuatro horas antes del ensayo. Para realizar estos ensayos de migración, se añadieron las células LLC o los linfocitos B al compartimento superior de los pocillos (3×10^5 - 5×10^5 células/ pocillo), sobre la monocapa de HUVEC o HDLEC, dejando transcurrir la migración durante 4 horas en incubador (37°C, 5% CO_2). Las placas se centrifugaron 5 segundos a 200 g. Finalmente, los linfocitos LLC/LBP se recuperaron del compartimento superior (células no migradas, fracción no-TM) mediante un lavado suave con RPMI previamente atemperado a 37°C y del compartimento inferior (células migradas, fracción TM) mediante re-suspensión en solución PBS-EDTA (Anexo 2). Para el recuento de las células recuperadas, las suspensiones celulares se incubaron con anticuerpo anti-CD19 unido a FITC (*Immunostep*) y todas las suspensiones se re-suspendieron en 200 μL de PBS-FACS. La adquisición de datos en el citómetro de flujo se realizó en modo recuento, a velocidad baja durante 1 minuto.

El análisis de supervivencia de los ensayos TEM en las fracciones de células transmigradas (TM) y no-transmigradas (no-TM) después de 4 y/o 12 horas de incubación, se realizó por citometría de flujo mediante de la tinción de Anexina-V-PE/7-AAD, descrita en el punto 5 de este apartado.

En el caso del estudio de la viabilidad de la fracción trans-migrada (TM) respecto a su densidad celular, células LLC (3×10^5 /pocillo) previamente teñidas con CFSE (5 μM , por cada 1×10^6 de células durante 1 hora a 37°C) (*Thermofisher*) tras comprobar por citometría de flujo la tinción de las células, se añadieron previo al ensayo TEM en el pocillo inferior de la placa *transwell*.

Los tratamientos de proteínas recombinantes se realizaron de la manera descrita en el punto 12 de este apartado(tratamientos).

6.2 Ensayo de migración a través de filtros

Los ensayos de migración de las células LLC o linfocitos B (LBP) se realizaron en placas *transwell* antes descritas, conteniendo filtros de 5 μm de tamaño de poro (*Cornin*). Estos ensayos se realizaron de manera similar que los ensayos de migración trans-endotelial (TEM) antes descritos, solo que en ausencia de endotelio. Los tratamientos de proteínas recombinantes se realizaron de la manera descrita en el apartado tratamientos.

6.3 Ensayos de migración y TEM en respuesta a gradientes de quimiocinas (Quimiotaxis)

Los ensayos de quimiotaxis se realizaron añadiendo quimioquinas recombinantes humanas (Anexo IV) en el compartimento inferior de los pocillos de las placas *transwell* en los ensayos TEM y de migración. La concentración de quimioquina añadida fue: CCL19 (100 ng/mL), CXCL12 (100 ng/mL) (*PEPROTECH*).

De la misma manera se realizaron ensayos de migración y TEM en respuesta a S1P (100nM) (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*). La recuperación de las fracciones migradas y no migradas así como el cuento se realizó de la misma manera descrita en los ensayos TEM.

6.4 Ensayos de migración y TEM en condiciones de "Salida" desde el GL.

Para simular las condiciones *in vivo* de la salida de las células LLC desde el GL realizamos estudios *in vitro* de migración y TEM. Los endotelios se sembraron en la parte inferior de los filtros de la placa, colocando S1P en el pocillo inferior (PI) mientras que CCL19 y CXCL12 se colocaron en el pocillo superior (PS) (Figura 8C). Para los casos de migración se realizaron de la misma manera pero en ausencia de endotelio. Las células LLC se colocaron en el PS y se incubaron durante 4 horas a 37°C para la TEM y/o migración. El recuento celular de células migradas y no migradas se realizó por citometría de flujo.

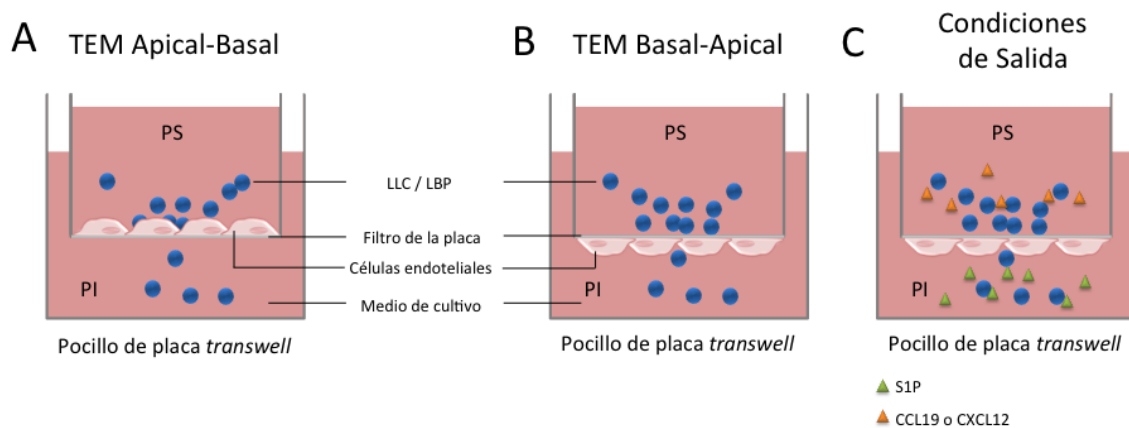


Figura 8. Representación gráfica de la TEM y las condición de salida desde el GL. A-B) Las células endoteliales (HUVEC/HDLEC) fueron sembradas hasta lograr la confluencia sobre los filtros de la placa *transwell* para los ensayos de TEM dirección Apical-Basal (A), o por la parte inferior del filtro para ensayos TEM dirección Basal-Apical (B). C) Ensayos *in vitro* de la condición de salida, se colocó S1P en el PI y las quimocinas CCL19 y CXCL12 de manera independiente en el PS.

7. Ensayos de silenciamiento mediante pequeños ARN de interferencia (*siRNA*)

7.1 Silenciamiento de *ephrinA4* en las células LLC

ARN pequeños de interferencia de doble cadena (*siRNA*) dirigidos a diferentes exones de *ephrinA4* (Anexo V, tabla 5) o de control negativo (*Stealth RNAi negative control duplexes, medium-GC, Invitrogen*) fueron utilizadas (300nM) para nucleofectar las células LLC siguiendo las recomendaciones del fabricante (*Amaxa, nucleofection reagents 4DV4XP-3024; 4D-Nucleofector X-unit*). El silenciamiento de la proteína *ephrinA4* y la supervivencia de las células LLC se analizaron por citometría de flujo 48 horas después de la nucleofección.

7.2 Silenciamiento de *EphA2* en HUVEC

Se utilizaron *siRNA* dirigidos contra *EphA2* (*EphA2 Validated Stealth RNAi, Invitrogen, LifeTechnologies*) para la transfección de HUVEC adheridas a placa (*Lipofectamine RNAiMAX, Invitrogen*) o nucleofectadas en suspensión (*Nucleofection technology; Amaxa 4D-Nucleofector for HUVEC; Cat. No. V4XP-5024; Lonza*) siguiendo las recomendaciones del fabricante, añadiendo el TNF- α antes y después de la interferencia. La evaluación y optimización de la entrada del ARN de interferencia

dentro de la HUVEC en ambos métodos se realizó mediante la transfección de oligonucleótidos conjugados a AlexaFlour® (*BLOCK-iT AlexaFluor Red Fluorescent Oligo; Invitrogen; o AlexaFluor488 ALLSatsr Negative Control, Quiagen*) y verificada por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo para determinar la eficacia de la transfección. Se realizaron transfecciones con un control negativo de oligonucleótidos de ARN de interferencia (*Stealth RNAi negative Control Duplexes, Medium GC; Invitrogen*) como control de efectos independientes después de verificar la entrada del ARN de interferencia.

El silenciamiento de EphA2 se determinó a 24 y 48 horas después de la transfección por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia, con anticuerpo conjugado a PE α -EphA2 (Santa Cruz *Biotechnology*) o con anticuerpo no conjugado seguido de un secundario contra anticuerpos de cabra unido a AlexaFluor (*LifeTechnologies*).

Después de la transfección las HUVEC se sembraron bajo condiciones óptimas de cultivo como se describe en el apartado de cultivos celulares para verificar la formación de la monocapa.

8. Cuantificación de ephrinA4 soluble en el plasma de los pacientes de LLC mediante ELISA

La cuantificación de ephrinA4 soluble se realizó a través de ensayos *ELISA* (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) de tipo captura de antígeno "Sandwich". Para la captura del antígeno los pocillos de la placa ELISA (*MaxiSorp Nunc-ImmunoPlates, Nunc*) fueron pre-incubados con 2 μ g/mL del anticuerpo contra humano ephrinA4 (*R&D Systems*) en 100 μ L de PBS1X durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se añadieron 100 μ L de los plasmas de los pacientes diluidos en el tampón de incubación (TBS, 0,5% *Tween-20*) de 2 a 8 veces y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Para la detección de la ephrinA4, las placas se lavaron y se añadió el anticuerpo α -ephrinA4-b (1 μ g/mL). Finalmente las placas se incubaron con de SAV-HRPO (0,5 μ g/mL) (*Jackson-ImmunoResearch*). El revelado de la actividad peroxidasa se realizó con el sistema ABTS como sustrato. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de placas para ELISA (*Bio-Tek Instruments*) a 405 nm (longitud de onda de referencia 492 nm). La curva de calibración fue realizada con la proteína recombinante humana ephrinA4-Fc

(*R&D Systems*) generada con diluciones seriadas, partiendo de una concentración máxima de 1,0µg/mL y hasta 8 diluciones cada una de ellas 4 veces menor a la anterior. A partir de esta curva se determinaron las concentraciones de ephrinA4 en las muestras problemas en unidades de ng/mL.

9. Purificación de ephrinA4 del plasma de los pacientes de LLC

La obtención de ephrinA4 se llevó a cabo mediante ensayos de cromatografía de afinidad. Para ello se prepararon columnas con anticuerpo contra humano ephrinA4 (*R&D Systems*) unido a proteínas G de agarosa (*Sigma*) a través de DMP (*dimethyl pimelimidate dihydrochloride, SIGMA*). 10mL del plasma de 3 pacientes fueron dializados en PBS durante 12 horas en frío y después colocados en la columna de afinidad. La ephrinA4 unida fue eluída en tampón de glicina 100nM (pH 2,5) seguida de 12 horas de diálisis en PBS en frío para su posterior uso.

10. Análisis genéticos de las células LLC

Los ensayos citogenéticos fueron realizados por el departamento de citogenética del Hospital General Universitario Morales Meseguer de Murcia.

10.1 Análisis del estado mutacional de los genes IgHV

El estado mutacional de los genes de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgHV) se analizó de acuerdo a las recomendaciones de la ERIC (*Education Resources Information Center*) usando cebadores 5' específicos de la familia VH (segmentos variables de la cadena pesada) en combinación con un grupo de cebadores 3' de la región JH (segmentos de unión de la cadena pesada), en reacciones de PCR realizadas por separado en cada pareja de oligonucleótidos recomendado por el consorcio (BIOMED-2 protocol; 17) (Van Dongen y cols. 2003). Los productos de PCR se secuenciaron directamente y las secuencias 5' y 3' se compararon con la base de datos IMGT (Immunogenetics database). (*IMGT/VQUEST tool; International ImMunoGeneTics information system, <http://imgt.cines.fr>*)(Alonso-Colmenar y cols. 2009, Trinidad y cols. 2010). Una homología de línea germinal $\geq 98\%$ fue considerada como no mutada (UM).

10.2 Análisis citogenético a través de la hibridación in situ mediante sondas fluorescentes (FISH)

La hibridación in situ mediante sondas fluorescentes (FISH) se llevó a cabo para detectar anomalías citogenéticas en los brazos 13q, 12, 11q y 17p usando sondas Vysis (Abbott) 17p13.1, 11q22.3, 13q14.3 y 13q34 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Un corte a partir del 5% se consideró positivo para todas las anomalías a excepción de la delección del 17p para el cual se utilizó un 10%. En cada caso se evaluaron por lo menos 200 núcleos.

11. Ensayos del estudio *in vivo* de ephrinA4 soluble en la infiltración de ganglios linfáticos (GL) de ratón

Los ratones balbc fueron inoculados vía intravenosa a través de la vena de la cola con células LLC (20×10^6 células/ratón) previamente teñidas con CFSE ($5 \mu\text{M}$, por 1×10^6 de células durante 1 hora a 37°C) en $100 \mu\text{L}$ de PBS 1X estéril conteniendo o no (control, 0,00 ng) diferentes concentraciones crecientes (0,10, 0,50, 2,00 y 10,00 ng/ratón) de ephrinA4 humana purificada de plasmas de pacientes (como se describe en el punto 9). 24 horas tras la inoculación los ratones fueron sacrificados. Las células LLC infiltradas a los GL fueron obtenidas en suspensiones celulares procedentes de los GL poplíteos removidos quirúrgicamente de los ratones inoculados y se analizaron por citometría de flujo teñidas con anticuerpo conjugado a APC contra el antígeno CD45 de ratón ($\alpha\text{-mCD45}$), Anexina-V PE y 7-AAD. Las células LLC humanas fueron identificadas de acuerdo a la población CFSE⁺ y mCD45⁻. Los estudios con animales fueron aprobados por el comité de ética e investigación en animales de experimentación de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

12. Tratamientos

12.1 Tratamiento de TNF- α

Los tratamientos con TNF- α (*Recombinant human Tumor Necrosis Factor- α , PEPROTECH*) se realizaron cultivando las monocapas durante 4 o 12 horas en medio de cultivo conteniendo TNF- α (10 ó 100 ng/mL) según el experimento. Tras esta incubación, se retiró el estímulo de TNF- α mediante el intercambio del medio de cultivo con uno fresco sin TNF- α (2 lavados de 15 minutos cada uno) previamente

atemperado a 37°C y se mantenían en estas condiciones hasta su utilización en los distintos ensayos.

12.2 Tratamiento de proteínas recombinantes a endotelios HUVEC/HDLEC y LLC/LBP

a) hFc

Las proteínas recombinantes (rh) utilizadas tienen una fracción Fc de una Inmunoglobulina G (IgG). Por esta razón en todos los experimentos en los que se utilizaron proteínas recombinantes se bloquearon los sitios de unión Fc 15 minutos antes de añadir las rh utilizadas para el estudio con 1 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ de células con fracciones Fc de humano (hFc, *Jackson ImmunoResearch*), asegurando que la interacción entre estas proteínas recombinantes y la célula fuera a través del extremo de dominio de unión.

b) EphA2-Fc, ephrinA4-Fc, EphB4-Fc y ephrinB2-Fc.

Para el bloqueo de las interacciones EphA2-ephrinA4 y/o EphB4-ephrinB2 en los ensayos TEM o co-cultivos, las monocapas de HUVEC/HDLEC o filtros de la paca *transwell* se pre-incubaban a 37°C (excepto filtros, que se incubaron a temperatura ambiente) con cantidades saturantes de ephrinA4-Fc o ephrinB2-Fc (R&D Systems). Para las células LLC y/o LBP se pre-incubaron a temperatura ambiente con EphA2-Fc o EphB4-Fc (R&D Systems) separadamente y previo al ensayo durante 30 min (0,5 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células) en medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza) (Figura 9). El exceso de proteína no unido a las células se retiró mediante lavado de las células con un exceso de medio de cultivo nuevo. Las células LLC y/o LBP se re-suspendieron en medio de cultivo completo (Anexo 2). Las cantidades saturantes fueron previamente determinadas por nuestro laboratorio (16) por citometría de flujo usando anticuerpos anti hFc o anti Poli-Histidina.

c) ICAM-1 y VCAM-1

Para el bloqueo de integrinas, las células LLC fueron pre-incubadas en medio de cultivo RPMI durante 30 minutos con 0,2 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células de proteínas recombinantes ICAM-1 (rhICAM-1) o VCAM-1 (rhVCAM-1) (R&D Systems). Tras 30 minutos de

incubación se lavaron con medio de cultivo nuevo para retirar el exceso de proteína y las células LLC se re-suspendieron en medio completo (Anexo 2).

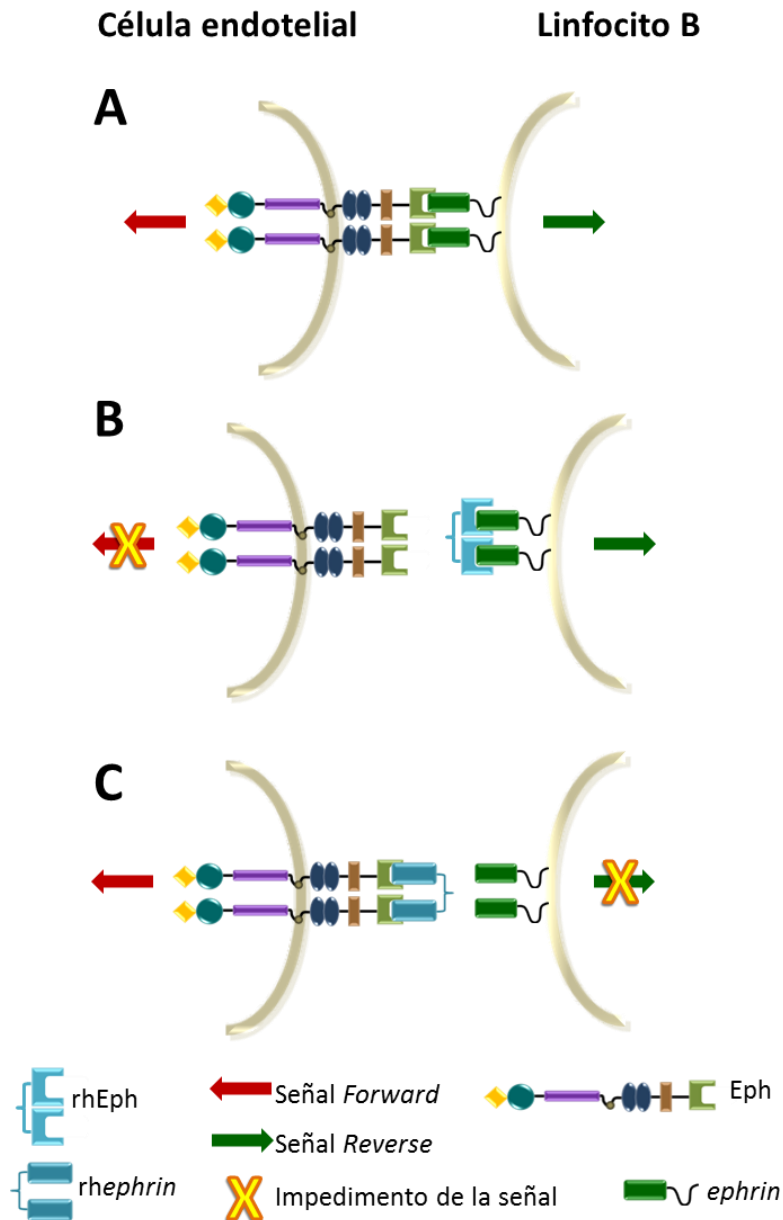


Figura 9. Representación gráfica del bloqueo de las interacciones Eph/ephrin.

A) La unión entre receptores Eph y sus ligandos ephrin genera una señalización bidireccional denominada *forward* (hacia el receptor) y *reverse* (hacia el ligando). B-C) Al suministrar las proteínas recombinantes, EphA2-Fc, EphB4-Fc, ephrinA4 y ephrinB2 de manera independiente sobre la población celular correspondiente, estamos evitando la unión Eph/ephrin entre ambos tipos celulares. B) Impidiendo la señales *forward* y C) La señal *reverse* y tras la unión de la proteína recombinante humana (rh) posiblemente se produzca señalización a través de la molécula expresada en cada tipo celular.

13. Microscopía confocal.

13.1 Adquisición y análisis de imágenes.

Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal espectral (TCS-SP2 AOBS, Leica) acoplado a un microscopio motorizado invertido (IRE-2, Leica), bajo las siguientes condiciones de adquisición: El escaneo secuencial se llevó a cabo por line-averaging (X8). Se acumuló por frame (X2), a una resolución de 1024 X 1024 píxeles, en una habitación oscura a 22°C. Las imágenes fueron tomadas con los objetivos en seco de 20X, o de inmersión en aceite 40X y 60X. Las proyecciones en Z se tomaron con 1 µm de distancia entre una y otra. Los programas informáticos utilizados para tratamiento y análisis de imágenes para la co-localización, recuento celular, análisis cuantitativo de imagen y maquetado de figuras fueron: Image-J, Image Surfer, Paraview y Adobe Photoshop CS2.

13.2 Inmunofluorescencias en monocapas de co-cultivos HUVEC o HDLEC

Los co-cultivos fijados con paraformaldehído (*Cytofix-Cytoperm*, BD) se incubaron en cámara húmeda con anticuerpos en solución PBS-BSA (Anexo 2) durante 30 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados fueron α-ICAM-1, α-VCAM-1, α-VE-Cadherina, α-Caveolina-1 (Anexo III, Tabla 5). Finalmente, los núcleos celulares se tiñeron con *Hoechst 33258* (*Molecular Probes, Invitrogen*) y las preparaciones se cubrieron con cubreobjetos de vidrio utilizando un medio de montaje no-fluorescente (*Prolong Gold; Invitrogen*).

13.3 Inmunofluorescencia en filtros de los ensayos TEM

Los filtros con las monocapas de los ensayos TEM fueron fijados con paraformaldehído (*Cytofix-Cytoperm*, BD) durante 20 minutos a temperatura ambiente (25°C). Tras el lavado con PBS 1X se incubaron con anticuerpos anti-CD31 o VE-Cadherina durante 30 minutos en PBS-BSA. Posteriormente se fijaron 10 minutos (*Cytofix, BD*) y se tiñeron con TUNEL unido a FITC con el *kit* de detección siguiendo las indicaciones del fabricante (Roche) y los núcleos celulares se tiñeron con *Hoechst 33258* (*Molecular Probes, Invitrogen*). Los filtros fueron retirados de la placa *transwell*, se colocaron sobre un portabjetos y se cubrieron con cubreobjetos de vidrio utilizando un medio de montaje no-fluorescente (*Prolong Gold; Invitrogen*).

13.4 Inmunofluorescencias en Gánglios Linfáticos

Las secciones de adenopatías obtenidas a partir de las biopsias congeladas se fijaron en acetona (*PanReac*) 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se rehidrataron en una solución de PBS-BSA previo a la incubación con anticuerpos en cámara húmeda. Los tejidos eran primeramente incubados con anticuerpos contra EphA2, ephrinA4, *PNA_d*, *CD19* (Anexo III, tabla 5) según se requiriera. Posteriormente, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios anti inmunoglobulinas de cabra o conejo unidos a AlexaFluor[®] (*Molecular Probes, Invitrogen*) o SAV unida a algún fluorocromo AlexaFluor[®]. Tras la fijación de 10 minutos (*Cytofix, BD*) se tiñeron con túnel según el caso como se describió anteriormente. Finalmente, los núcleos celulares se marcaron con *Hoechst 33258 (Invitrogen)* y las preparaciones se cubrieron con cubreobjetos de vidrio utilizando un medio de montaje no-fluorescente (*Prolong Gold; Invitrogen*).

Para la co-localización las regiones de interés (ROIs) entorno a las HEVs fueron trazadas de acuerdo a la tinción con EphA2 y se midió la intensidad de la expresión de ephrinA4 dentro de ROIs. Las HEVs que contenían $\geq 10\%$ de *pixeles* por encima de 200 en la escala de grises fueron consideradas como positivas.

13.5 Co-localización mediante el Clustering de ephrinA4 con integrinas.

Suspensiones celulares de células LLC se incubaron con cantidades saturantes de proteína recombinante humana de dominio extracelular EphA2 (EphA2-Fc) (0.5 $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células) durante 30 minutos, seguidos por otros 30 minutos de incubación con anticuerpos de ratón anti-Histidina conjugados a biotina. Después del lavado las células fueron adheridas a portaobjetos durante 15 minutos en medio de cultivo que contenía *AlexaFluor (AF)* conjugado a estreptovidina AF488 para inducir el *clustering* de ephrinA4 en la superficie celular o en ausencia de esta (Tiempo = 0, Control). Posteriormente se fijaron con paraformaldehído (*Cytofix-Cytoperm, BD*), y tras ello fueron incubados con anticuerpos α -CD49d o α -CD18 conjugados a *AlexaFluor647 (BD)* para el marcaje de las cadenas de integrinas $\alpha 4$ y αL . Los núcleos se tiñeron con *Hoechst 33258 (Invitrogen)* y las preparaciones se cubrieron con cubreobjetos de vidrio utilizando un medio de montaje no-fluorescente (*Prolong Gold; Invitrogen*).

14. Análisis estadístico

Las representaciones gráficas de los valores se realizaron en *Microsoft Office Excel 2010* o *StatGraphics Centurion XVI*.

Los análisis de regresión lineal, para determinar la correlación entre variables continuas, se realizaron en *StatGraphics Centurion XVI* o *Microsoft Office Excel*.

Las significancias estadísticas de los experimentos fueron determinadas por la prueba de *t-student* para muestras pareada o no pareadas según sea el caso con dos colas de distribución.

Las diferencias significativas se representaron en base al valor de su significación estadística ($*p<0,05$; $**p<0,01$; y $***p<0,001$) n.s. no significativa.



Resultados

RESULTADOS

1. Estudio de la viabilidad de las células LLC en procesos de trans-migración endotelial (TEM) y su asociación con la presencia de linfadenopatías (LA) mediada por expresión de ephrinA4 y su interacción con las integrinas $\alpha 4$ y αL .

1.1 Las células LLC pero no los linfocitos B sanos, pueden sufrir apoptosis a través de los contactos físicos con endotelios sanguíneos estimulados con TNF- α durante la migración trans-endotelial (TEM).

Para el estudio *in vitro* de la viabilidad de células LLC durante la TEM utilizamos 10 muestras de pacientes con LLC tras aislar la población leucémica CD19⁺CD5⁺ de sangre periférica (SP) y 10 muestras de linfocitos B (LBP) CD19⁺, población aislada de la SP de donantes sanos. El posible impacto de la extravasación en la supervivencia de las células LLC fue analizado mediante ensayos de migración trans-endotelial (TEM) a través de monocapas de células HUVEC crecidas sobre los filtros de placas *transwell*. Para reproducir las condiciones de inflamación del endotelio en estos pacientes, las monocapas fueron pre-estimuladas durante 4 horas con TNF- α (HUVEC-TNF) , el tratamiento se retiró y se lavó con medio de cultivo fresco previamente atemperado a 37°C antes de añadir las células LLC.

El porcentaje de células apoptóticas (Anexina V^{pos}, 7AAD^{neg}) y células viables (Anexina V^{neg}, 7AAD^{neg}) se midió por citometría de flujo en las fracciones de células transmigradas (TM) y no-transmigradas (no-TM) después de 4 y 12 horas de incubación. Los valores obtenidos fueron comparados con los porcentajes de cultivos en suspensión (control), es decir de células LLC que no sufrieron el proceso de TEM. Para ello las células LLC fueron colocadas en el pocillo inferior de la placa con y sin monocapas de HUVEC sembradas sobre los filtros pre-tratados con TNF- α .

Los resultados mostraron que tras 4 horas de incubación en los cultivos en suspensión (control) no se observaron cambios relevantes en la apoptosis espontánea, pero si se observó un claro incremento tras 12 horas de cultivo (Figura 10A). Cuando

analizamos las células LLC que se sometieron a ensayos TEM observamos los mismos efectos que los cultivos en suspensión en la fracción trans-migrada (TM) y no trans-migrada (no-TM) de la TEM (Figura 10B). Por lo tanto al no observar cambios significativos a las 4 horas de cultivo, 12 horas de incubación fue el tiempo elegido para estudiar los efectos en la viabilidad de las células LLC durante la TEM.

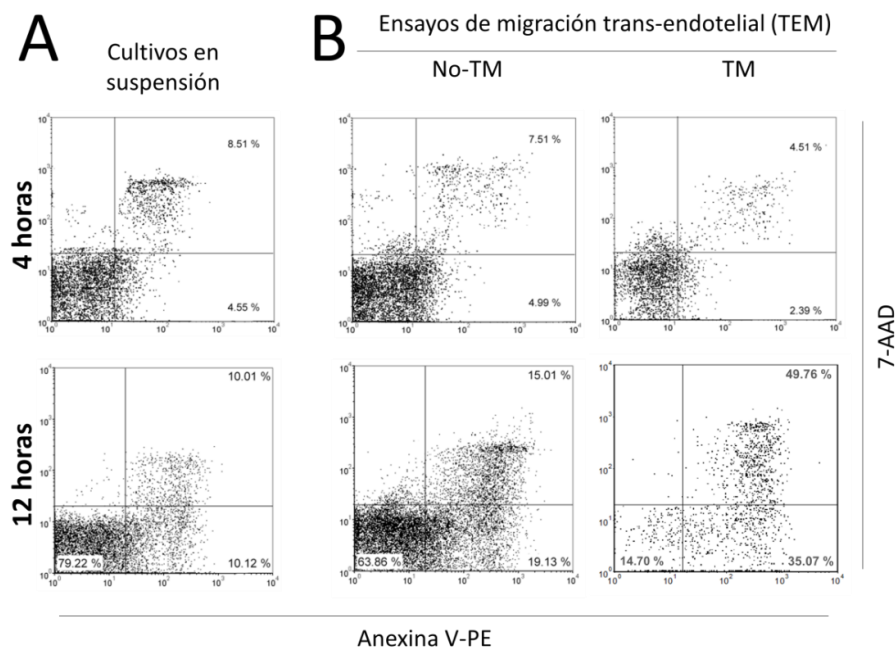


Figura 10. Análisis por citometría de flujo de la apoptosis y viabilidad de las células LLC en cultivos en suspensión y ensayos de trans-migración endotelial (TEM).

A-B) Células LLC (5×10^5 células por pocillo) fueron cultivadas en suspensión (A) o trans-migradas a través de monocapas HUVEC pre-estimuladas con TNF- α (B). Tras 4 y 12 horas de cultivo se determinó por citometría de flujo el porcentaje de viabilidad (Anexina-V^{neg} 7-AAD^{neg}) y porcentaje de células apoptóticas tempranas (Anexina-V^{pos} 7-AAD^{neg}). Cultivos en suspensión (A) y ambas fracciones; no trans-migrada (no-TM) y trans-migrada (TM) de los ensayos TEM (B), muestran los cambios más significativos en la apoptosis y viabilidad de las células fueron detectados después de 12 horas en las muestras analizadas. Los *dot plots* representan una muestra de 10 analizadas.

a) Los contactos físicos de las células LLC con endotelios activados con TNF- α durante la TEM disminuyen la supervivencia de las células leucémicas.

Para descartar la posibilidad de que el endotelio pre-tratado con TNF- α pudiera estar liberando factores que afecten la supervivencia de las células LLC comparamos la viabilidad de los cultivos en suspensión con aquellos que llevaban monocapa HUVEC-

TNF y los que carecían de ella (No HUVEC). Después de 12 horas de incubación observamos que la caída en la viabilidad de los cultivos en suspensión era independiente de la presencia o no de la monocapa de HUVEC-TNF, no observando diferencias significativas entre ambos cultivos (Figura 11A). Por consiguiente podríamos descartar la posibilidad de que el endotelio estuviera liberando factores solubles que pudieran tener posibles efectos en la viabilidad de las células LLC. Una vez descartados estos factores, analizamos la supervivencia de las células LLC en los ensayos TEM. Tras compararlas con el cultivo en suspensión (control) observamos que la viabilidad de las células LLC fue menor en ambas fracciones, con mayor efecto en la fracción TM (Figura 11A). Por lo tanto estos resultados indican que los efectos provocados en la apoptosis de las células LLC son causados por el contacto directo con el endotelio.

Tras observar los efectos en las células LLC durante la TEM, nos preguntamos si esta apoptosis ocurría a los linfocitos B sanos durante la diapédesis como un proceso natural o era específicamente provocado en las células leucémicas. Para abordar esta posibilidad y observar los efectos provocados por el endotelio en los linfocitos B sanos realizamos ensayos TEM bajo las mismas condiciones experimentales con linfocitos B purificados de sangre periférica (LBP) de 10 donantes sanos. Las fracciones (no-TM y TM) no presentaron cambios significativos en la supervivencia al compararlas con los cultivos en suspensión (control) (Figura 11B). Por lo tanto esto sugiere que el efecto de apoptosis provocado por el endotelio en la condición inflamatoria (HUVEC-TNF) es específico en las células LLC.

Además es importante resaltar que también realizamos ensayos TEM bajo las mismas condiciones experimentales, pero, sin previa estimulación del endotelio con TNF- α (HUVEC-no TNF), para estudiar si estos efectos en las células LLC eran independientes de su condición inflamatoria. Tras el análisis observamos que las células LLC tanto de la fracción no-TM como de la TM no mostraron cambios significativos en la viabilidad comparada con el cultivo en suspensión (control) (Figura 11C). Por tanto, podemos destacar que solo los endotelios activados proveen de estas señales apoptóticas a las células leucémicas durante la TEM.

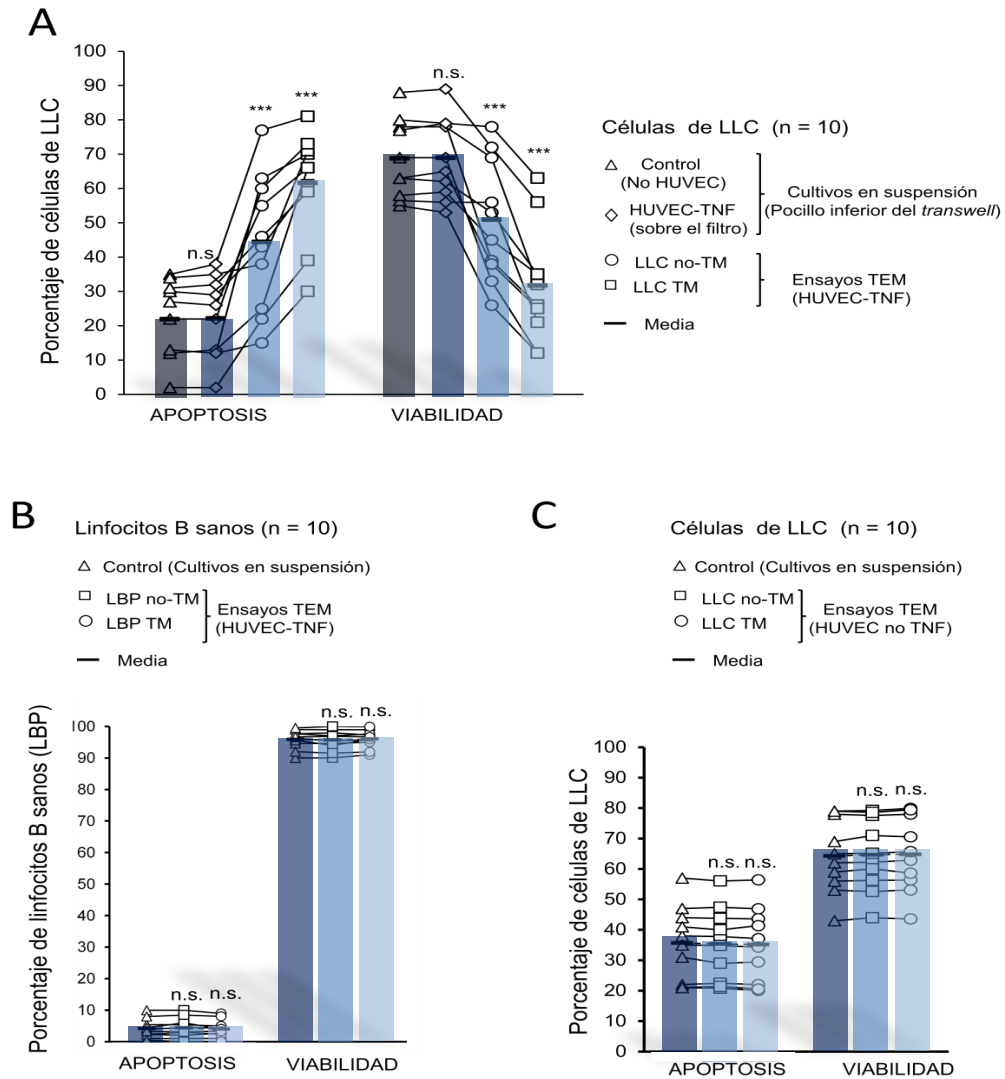


Figura 11. Los contactos físicos durante la migración trans-endorelial (TEM) de las células LLC con monocapas de células endoteliales activadas con TNF- α disminuyen la supervivencia de las células leucémicas.

A-B) Células LLC de 10 pacientes (Tabla1; n=1-10) (A) y Linfocitos B aislados de sangre periférica de 10 donantes sanos (LBP) (B), fueron sometidas a ensayos TEM. A) Las células no transmigradas (LLC-no-TM) y a mayor magnitud las células transmigradas (LLC-TM) disminuyen su viabilidad tras la TEM comparadas con el control (cultivos en suspensión). B) ambas fracciones de linfocitos B sanos; LBP-no-TM y LBP-TM no presentan cambios significativos en su viabilidad respecto a los cultivos en suspensión. C) Células LLC en ensayos TEM sobre monocapas HUVEC no estimuladas con TNF- α (HUVEC no TNF) no presentan cambios en su viabilidad. El porcentaje de apoptosis y viabilidad celular fue determinado después de 12 horas de incubación mediante la tinción con Anexina-V-PE/7-AAD y analizado por citometría de flujo. Para las diferencias estadísticamente significativas utilizamos prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa. Las barras representan la media de la muestras.

Después de observar que durante los ensayos TEM las células LLC al contacto con el endotelio parecen recibir señales apoptóticas y analizar que existían diferencias

en la supervivencia entre ambas fracciones de la TEM con una mayor apoptosis en la fracción TM y conociendo que las células LLC poseen una baja capacidad de migración en comparación con los LBP, nos preguntamos si estas diferencias en la supervivencia entre las células TM y no-TM eran debidas a una densidad celular baja en las células LLC TM. Para descartar este efecto realizamos ensayos TEM bajo las condiciones experimentales descritas con anterioridad (HUVEC-TNF) en los que previo al ensayo colocamos en la parte inferior del pocillo células LLC previamente teñidas con CFSE. Al analizar la viabilidad, no observamos cambios significativos respecto a los pocillos en los que no se colocaron previamente células LLC teñidas (Figura 12A) una vez acotada la población TM ($CFSE^{neg}$) (Figura 12B). Por lo tanto descartamos la posibilidad que la apoptosis observada en la fracción TM fuera debida a la baja densidad celular.

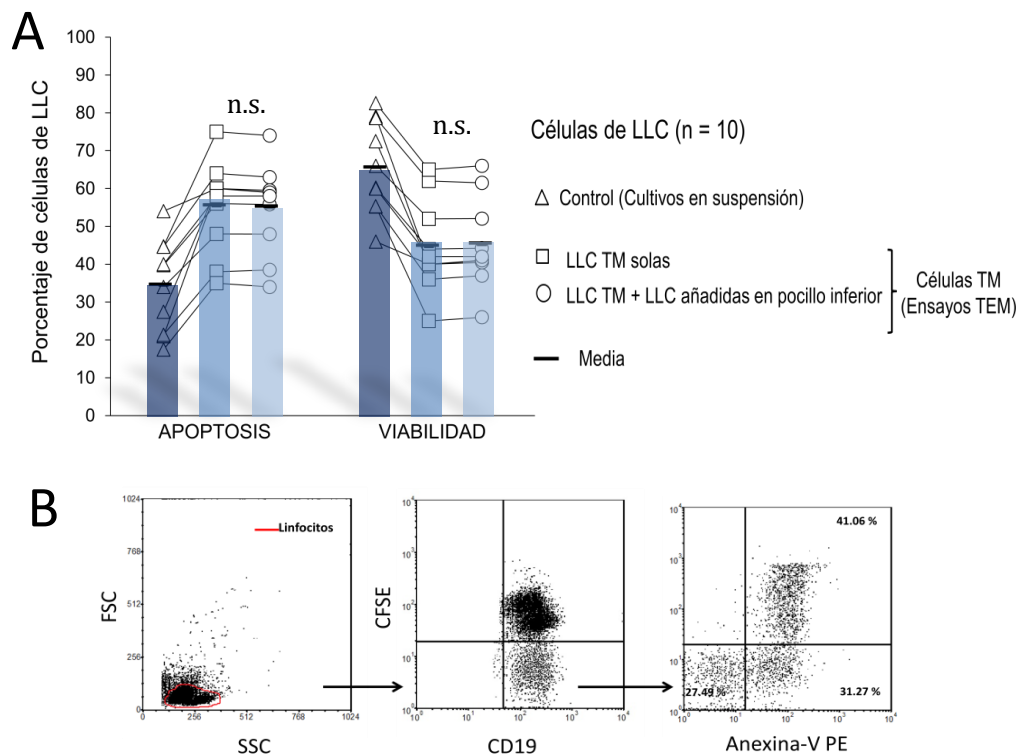


Figura 12. La densidad celular de las células LLC TM durante los ensayos TEM no influye en caída de la viabilidad.

A) Ensayos TEM, células LLC (5×10^5 por pocillo) fueron cultivadas solas sin monocapa HUVEC (cultivos en suspensión) o trans-migradas a través de monocapas HUVEC pre-tratadas con TNF- α . Las células trans-migradas TM muestran una menor viabilidad respecto al control, sin embargo estas no mostraron cambios significativos en su viabilidad respecto a las células TM con LLC previamente añadidas en el fondo del pocillo. B) *dot plots* representa una muestra de 10 analizadas El porcentaje de viabilidad y apoptosis fue determinado tras acotar la población de células LLC TM ($CFSE^{neg}$), mediante el análisis por citometría de flujo de la doble tinción con Anexina-V-PE/7-AAD. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa. Las barras representan la media de 10 muestras.

b) La frecuencia de células LLC apoptóticas es mayor en el lado basal de la monocapa HUVEC-TNF, sugiriendo que reciben señales apoptóticas durante la TEM.

Una vez observado que la baja densidad de células LLC en la fracción TM no alteraba su viabilidad, quisimos confirmar que las células LLC reciben señales apoptóticas mientras atraviesan la monocapa HUVEC estimulada con TNF- α . Para ello examinamos por microscopía confocal los filtros del ensayo TEM con las monocapas HUVEC teñidos con TUNEL. Esto demostró que el número de células apoptóticas en ambos lados del filtro era significativamente mayor en HUVEC-TNF (Figura 13A, panel inferior) comparadas con HUVEC-no TNF (Figura 13A, panel superior). Mientras que en HUVEC-TNF el número absoluto del total de células LLC y células apoptóticas predominaban en la parte superior de la monocapa, la frecuencia de células apoptóticas fue significativamente más alta en la parte inferior (Figura 13B). Esto se relaciona con la alta frecuencia del número de células apoptóticas observadas en las células TM determinadas por citometría de flujo en los ensayos TEM (Figura 11A). Sin embargo, en el endotelio no estimulado no se observaron diferencias significativas entre ambos lados del filtro (Figura 13B). En conjunto estos resultados sustentan que las células LLC reciben señales apoptóticas durante la TEM a través de monocapas de endotelio HUVEC estimulada con TNF- α .

c) Las células LLC reciben señales apoptóticas a partir de 2 horas de co-cultivo con HUVEC-TNF pero tras un tiempo prolongado se acumulan factores solubles provenientes de la célula endotelial brindando supervivencia a las células leucémicas.

En contraste con estos resultados observados, estudios previos han reportado que después de algunos días de co-cultivo el endotelio brinda efectos de supervivencia a las células LLC (Long y cols. 1995, Moreno y cols. 2001, Ghia y cols. 2008, Buggins y cols. 2010, Badoux y cols. 2011, Burger 2012, Maffei y cols. 2012). Por tal motivo analizamos los efectos del tratamiento de TNF- α en el endotelio a distintos tiempos de incubación, co-cultivando las células LLC sobre monocapas estimuladas o no con TNF- α , en la que evaluamos su viabilidad tras 12 horas de cultivo y después de 2 y 5 días. Al comparar la viabilidad de las células LLC con el control (no-HUVEC) observamos que

al igual que los resultados reportados previamente (Long y cols. 1995, Moreno y cols. 2001, Ghia y cols. 2008, Buggins y cols. 2010, Badoux y cols. 2011, Burger 2012, Maffei y cols. 2012) después de varios días de cultivo (2 y 5 días) había efectos de supervivencia de las células LLC co-cultivadas en monocapas no estimuladas (HUVEC-noTNF) y a menor medida en HUVEC-TNF (Figura 14A). Sin embargo estos efectos no se observaron a las 12 horas, observando incluso en HUVEC-TNF una caída en la supervivencia (Figura 14A), coincidiendo con lo previamente observado en nuestros ensayos TEM. Además en co-cultivos con monocapas fijadas con paraformaldehído observamos que las células LLC carecían de efectos de supervivencia en HUVEC-noTNF y de manera destacada la apoptosis se enfatiza a las 12 horas en HUVEC-TNF y aún más a los 2 y 5 días (Figura 14A). Esto sugiere la liberación de factores solubles a tiempos prolongados que brindan dicha supervivencia a las células LLC en las monocapas de HUVEC vivas.

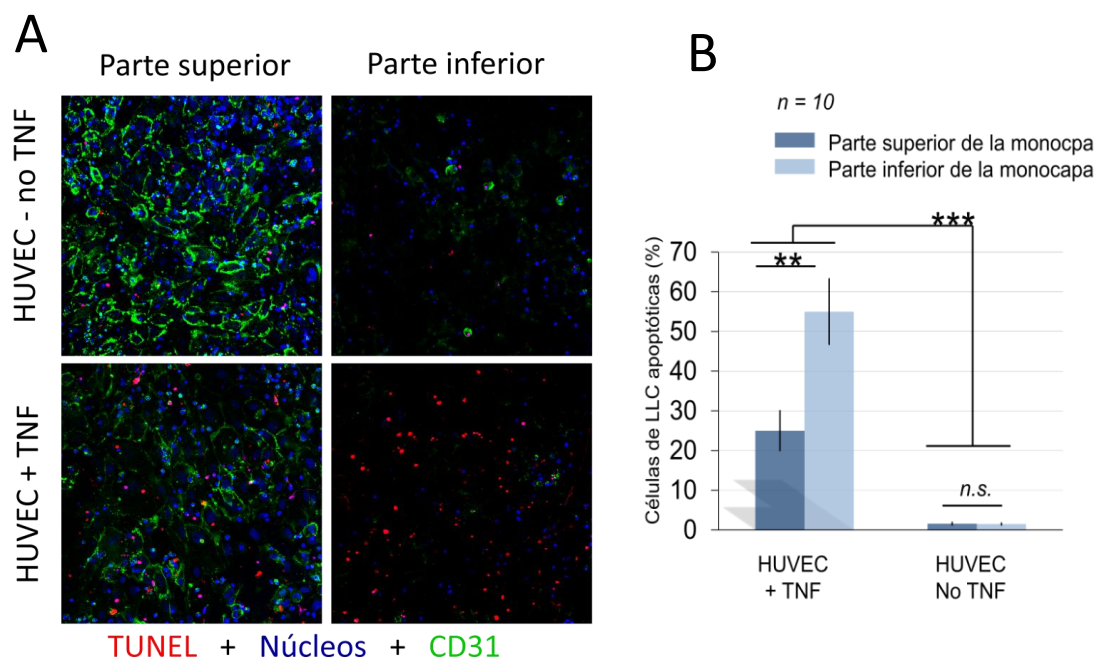


Figura 13. La frecuencia de células LLC apoptóticas es mayor en el lado basal de la monocapa HUVEC-TNF, sugiriendo que reciben señales apoptóticas durante la TEM.

A-B) Inmunofluorescencia de filtros de las placas *transwell* procedentes de los ensayos TEM de 12 horas sobre monocapas HUVEC estimuladas (HUVEC +TNF) y no (HUVEC –no TNF) con TNF- α . A) Se observa un mayor número de células apoptóticas (rojo) en HUVEC-TNF (panel inferior izquierdo) y con mayor frecuencia en la parte inferior del filtro (panel inferior derecha). TUNEL (rojo, núcleos apoptóticos), α -CD31 (verde, uniones HUVEC) y *Hoechst* (azul, núcleos). B) Frecuencia en porcentaje del número de células LLC apoptóticas. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal de la parte superior e inferior de los filtros (20X; ≥ 3 campos por filtro, 1-2 filtros por muestra), son representativas de un experimento TEM. El número total de núcleos fueron contados con el programa informático Image J (> 200 núcleos por muestra y condición experimental). Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

Para abordar el aspecto de la liberación de posibles factores solubles co-cultivamos células LLC con monocapas HUVEC-noTNF, debido a que fue donde observamos un mayor efecto de supervivencia a tiempos prolongados. Transcurridos 5 días de cultivo retiramos los sobrenadantes (medio condicionado) y los colocamos en diferentes condiciones de cultivo (células LLC solas, co-cultivos con HUVEC-TNF y HUVEC-noTNF) y tras 12 horas de incubación analizamos la supervivencia. Al comparar estas condiciones con ensayos similares con medio de cultivo nuevo no condicionado (control), encontramos que el medio condicionado promueve la supervivencia en las 3 condiciones de cultivo; células LLC solas, células LLC+HUVEC-TNF y células LLC+HUVEC-noTNF (Figura 14B). Esto demuestra que definitivamente tras un prolongado tiempo de cultivo se acumulan factores solubles provenientes de la célula endotelial que brindan supervivencia a las células LLC.

Para estudiar las señales apoptóticas generadas por el endotelio estimulado (HUVEC-TNF) observadas a las 12 horas, realizamos ensayos de co-cultivos a diferentes lapsos de tiempo hasta llegar a las 12 horas, colocando las células LLC sobre monocapas HUVEC-TNF y HUVEC-no TNF, tras retirar las células LLC del co-cultivo en los tiempos señalados éstas se mantuvieron en cultivo separadas de la monocapa hasta completar las 12 horas con el objetivo estudiar las señales recibidas por parte del endotelio. Tras el análisis de la supervivencia observamos que a partir de 2 horas éstas señales ya son capaces de generar un efecto apoptótico intensificándose a tiempos más prolongados (4 y 12 horas), sin embargo estos efectos no se observaron en monocapas no estimuladas (HUVEC-no TNF) comparadas con las células LLC solas (control, no-HUVEC), (Figura 14C). Por lo tanto podemos concluir que 2 horas de co-cultivo de las células leucémicas con HUVEC-TNF eran suficientes para recibir éstas señales a través del contacto que conducen irreversiblemente su apoptosis.

En conjunto estos resultados muestran que la viabilidad de las células LLC puede verse afectada por el contacto directo con monocapas HUVEC pre-estimuladas con TNF- α durante la extravasación. Por lo tanto pensamos que este aspecto requiere de una mayor investigación para poder entender los mecanismos a través de los cuales se reciben éstas señales pro-apoptóticas.

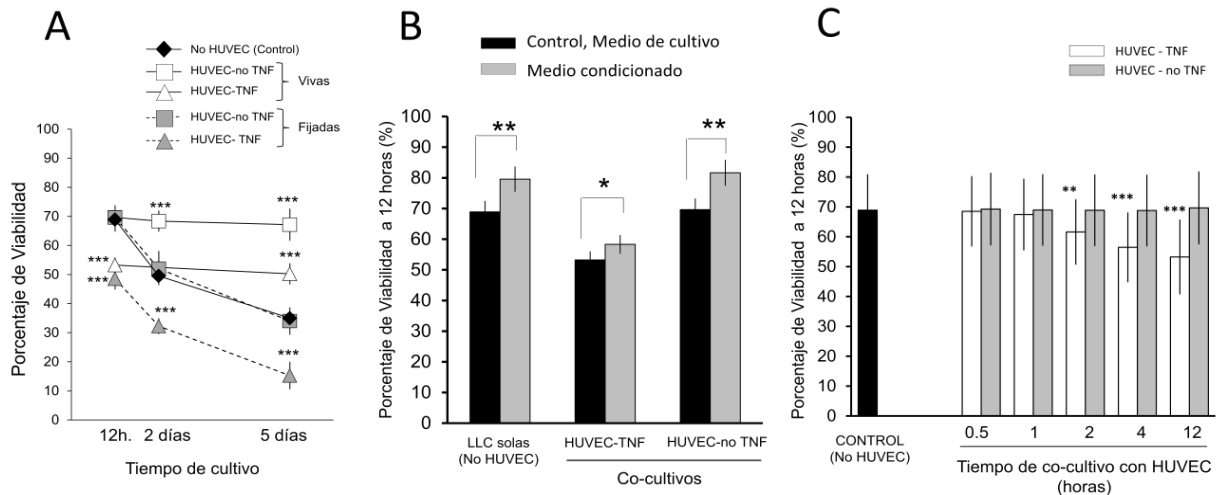


Figura 14. Las células LLC reciben señales apoptóticas a partir de 2 horas de co-cultivo con HUVEC-TNF pero tras un tiempo prolongado se acumulan factores solubles provenientes de la célula endotelial brindando supervivencia a las células leucémicas.

A) células LLC fueron cultivadas sobre monocapas HUVEC vivas y fijadas tratadas (HUVEC-TNF) y no (HUVEC-no TNF) con TNF- α , se comparo con células LLC solas en cultivos en suspensión (No HUVEC, control), No se observaron efectos de supervivencia a las 12 horas, pero si a los 2 y 5 días, esto sugiere la liberación de factores solubles a tiempos prolongados que brindan dicha supervivencia a las células LLC en las monocapas de HUVEC vivas. B) células LLC fueron cultivadas por 12 horas con medio de cultivo (control) o medio condicionado procedente de co-cultivos de células LLC-HUVEC-noTNF después de 5 días de cultivo. En todos los casos se observó un incremento en la viabilidad de las células LLC con el medio condicionado. C) Células LLC fueron cultivadas en los tiempos señalados, solas en ausencia de HUVEC (control) y sobre monocapas HUVEC tratadas (HUVEC-TNF) y no (HUVEC-noTNF) con TNF- α . Tras los tiempos señalados se cultivaron solas hasta completar las 12 horas de incubación. Se observa que dos horas son suficientes para que las células LLC reciban las señales apoptóticas. Los gráficos muestran los porcentajes de viabilidad en los tiempos indicados. El porcentaje de viabilidad de las células LLC (Anexina-V^{neg}, 7-AAD^{neg}) fue determinado por citometría de flujo y comparado con su respectivo control. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

1.2 Células LLC de pacientes con adenopatía (LApos) presentan una mayor supervivencia durante la TEM mediada por las cadenas de integrinas $\alpha 4$ y αL .

Una vez establecido que la TEM afecta la supervivencia de las células LLC, pensamos si pudiera existir una posible asociación relacionados con parámetros clínicos de la enfermedad incluyendo la presencia de linfadenopatías (LA), estado mutacional del gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas (IgHV) y la expresión de los antígenos ZAP-70 y CD38. Para este fin aumentamos el número de muestras incluyendo 20 pacientes más en los ensayos TEM (Anexo 1, Tabla 1).

a) Células LLC de pacientes con presencia de adenopatía (LApos) muestran un mayor índice de migración asociado a una mayor supervivencia durante la TEM.

Tras analizar los ensayos TEM añadidos a los previamente realizados, observamos en todas las muestras estudiadas una disminución en la viabilidad de ambas fracciones del ensayo TEM, tanto en las células no-TM y con mayor énfasis en la fracción TM tras compararlas con los niveles de supervivencia de las células LLC de los cultivos en suspensión (control), confirmando nuestros ensayos previos. Observamos una caída en la viabilidad de hasta un 20% en promedio, que iba de un 68% en el control hasta una 48% en la fracción TM (Figura 15A). Debido a que los niveles de supervivencia variaban entre las diferentes muestras las normalizamos de tal manera que los cultivos en suspensión (control) fueron considerados el 100% y los datos de la fracción TM fueron referidos a éste porcentaje. Estos valores obtenidos fueron definidos como resultados del porcentaje de supervivencia. Una vez relativizados los datos los clasificamos de acuerdo a los parámetros clínicos presentados por el paciente al momento de recolección de la muestra.

Esto nos llevó a encontrar una asociación significativa en la condición de linfadenopatías (LA) y a menor grado en la expresión de ZAP-70, pero no así en el estado mutacional (IgHV) y la expresión de CD38 (Figura 15B). De manera interesante las muestras de los pacientes que presentaban adenopatía (LApos) mostraban una supervivencia significativamente mayor respecto a los que carecían de ellas (LANeg) (Figura 15B). Por lo tanto pensamos que esto podría sugerir una posible asociación con la capacidad de la TEM. Para indagar en este aspecto determinamos los índices de migración mediante el cálculo de los ratios de migración referido al número de células LLC colocadas para su migración de cada una de las muestras y los comparamos en cada uno de los diferentes parámetros clínicos. Tras el análisis observamos una asociación significativa en el índice de migración de la condición LA, pero no así en cualquiera de los otros parámetros estudiados como el estado mutacional (IgHV), expresión de Zap-70 o CD38 (Figura 15C).

Para afianzar esta hipótesis realizamos un análisis de regresión lineal entre los niveles del porcentaje de supervivencia y del el índice de migración obteniendo como resultado una marcada correlación (Figura 15D), sustentando nuestra conclusión anterior.

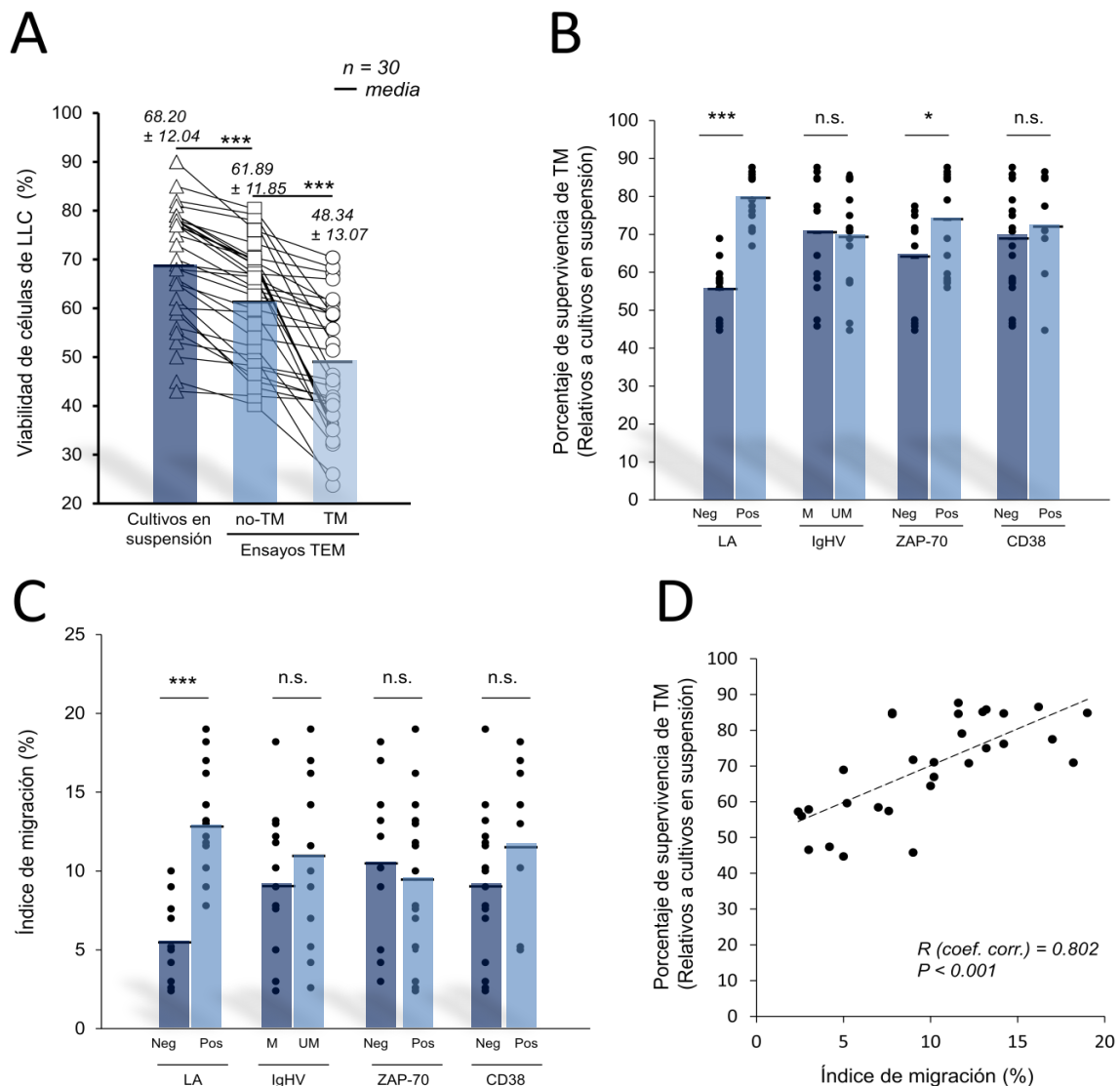


Figura 15. Células LLC de pacientes con presencia de adenopatía (LApos) muestran un mayor índice de migración asociado a una mayor supervivencia durante la TEM.

A) Células LLC de 30 pacientes fueron estudiadas en ensayos TEM a través de monocapas HUVEC-TNF. La viabilidad de las células no-TM y TM fue determinada mediante el análisis por citometría de flujo después de 12 horas de cultivo y comparadas con las células LLC de los cultivos en suspensión (No-HUVEC). Todas las muestras disminuyeron su viabilidad en las fracciones no-TM y con mayor énfasis en TM. B) El porcentaje de supervivencia fue determinado tras referir la viabilidad de la fracción TM a los cultivos en suspensión y comparados entre las muestras de acuerdo a los parámetros clínicos de enfermedad indicados. Encontrando la mayor asociación con el parámetro de LA, con una mayor supervivencia en los casos LApos. C) El número absoluto de células TM recuperadas del pocillo inferior fue medido por citometría de flujo y expresado como índice de migración tras ser referido al número total de células LLC colocadas en el pocillo superior al inicio de la TEM. El índice de migración de las muestras fue comparado a los distintos parámetros clínicos. Encontrando una fuerte asociación con la condición LA con un mayor índice en LApos. D) El gráfico muestra una correlación directa entre el porcentaje de supervivencia y el índice de migración. La R representa el coeficiente de correlación de *spearman*. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

b) La expresión más alta de la integrina $\alpha 4$ en las células LLC se asocia de manera directa con los pacientes de LApos y con el índice de migración.

Debido a que la expresión de la integrina $\alpha 4$ ha sido correlacionada con una mayor capacidad TEM en los casos de LApos (Till y cols. 2002, Till y cols. 2005, Hartmann y cols. 2009) y que probablemente podría mediar señales de supervivencia (Zucchetto y cols. 2009, Maffei y cols. 2012), investigamos las posibles asociaciones entre el índice de migración y porcentaje de supervivencia en relación a la expresión de las integrinas $\alpha 4$ y αL . Mediante estudios de citometría de flujo determinamos la expresión de ambas integrinas y su correspondiente cadena β . De acuerdo a los parámetros de enfermedad estudiados observamos en el parametro LA diferencias significativas en la expresión de $\alpha 4$ y en menor grado en la expresión de CD38, pero no así en el estado mutacional y ZAP-70 (Figura 16A), mientras que en el caso de αL no se encontró una asociación significativa en ninguno de los parámetros estudiados (Figura 16B).

Después de analizar los niveles de expresión de estas integrinas estudiamos su relación con el índice de migración. Mediante el estudio de regresión lineal entre la expresión de $\alpha 4$ y αL con el índice de migración encontramos una marcada correlación con $\alpha 4$ (Figura 16C) y a menor grado con αL (Figura 16D).

c) Las células LLC muestran una disminución en las expresiones de integrinas en comparación con los LBP, correlacionándose con el porcentaje de supervivencia de las células TM.

Al comparar las expresiones antes obtenidas con linfocitos B sanos (LBP) encontramos que las células LLC muestran una expresión más baja que los LBP pero significativamente aumentada en pacientes con LApos respecto a los casos LANeg en las 4 cadenas de integrinas estudiadas ($\alpha 4$, $\beta 1$, αL y $\beta 2$) (Figura 17A). Esto se correlaciona con una mejor capacidad en la TEM de los casos LApos antes descrita (Figura 15C).

Al analizar estas expresiones y su relación con el porcentaje de supervivencia en el parámetro clínico de LA, encontramos de manera interesante una fuerte correlación entre el porcentaje de supervivencia de las células TM y la expresión de $\alpha 4$

(Figura 17B) pero no así con α L (Figura 17C). Esto refuerza el papel específico de α 4, observándose claramente una mayor expresión de α 4 en los casos LApos directamente relacionada a un mayor porcentaje de supervivencia en la células TM (Figura 17B).

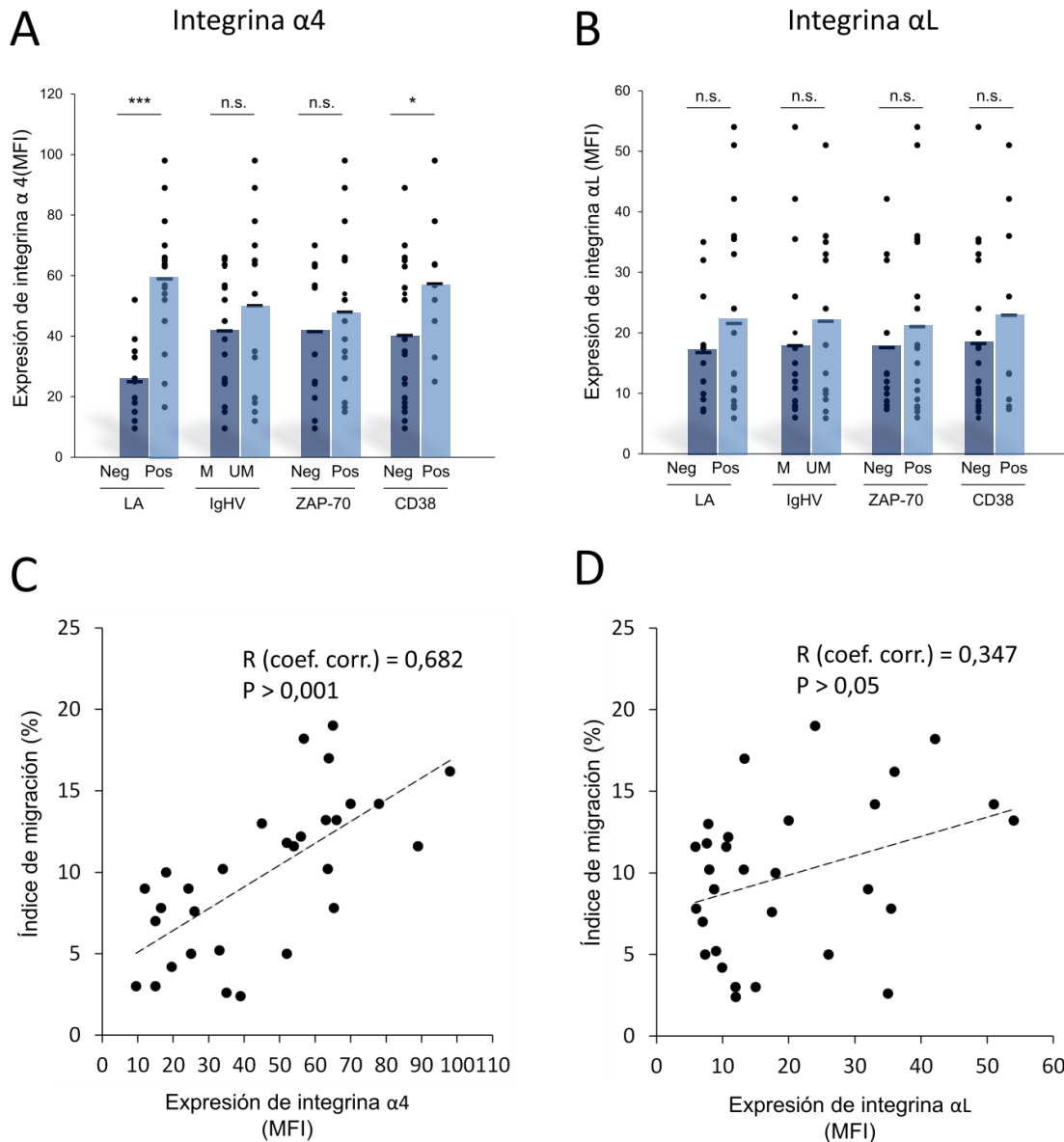


Figura 16. La expresión más alta de la integrina α 4 en las células LLC se asocia de manera directa con los pacientes de LApos y con el índice de migración.

A-D) La expresión de membrana de las cadenas de integrinas α 4 y α L determinada por la intensidad media de fluorescencia (MFI) medida por citometría de flujo en las 30 muestras de pacientes de LLC. (A-B) Tras determinar los niveles de expresión se compararon con los parámetros clínicos señalados. A) α 4 presenta una marcada asociación con la condición LA, con una mayor expresión en LApos. B) α L no presenta ninguna asociación a los parámetros clínicos. (C-D) También se determinó la correlación lineal de los índices de migración con la expresión de α 4 (C) y α L (B). Encontrando una mayor correlación con α 4. La R representa el coeficiente de correlación de *spearman*. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

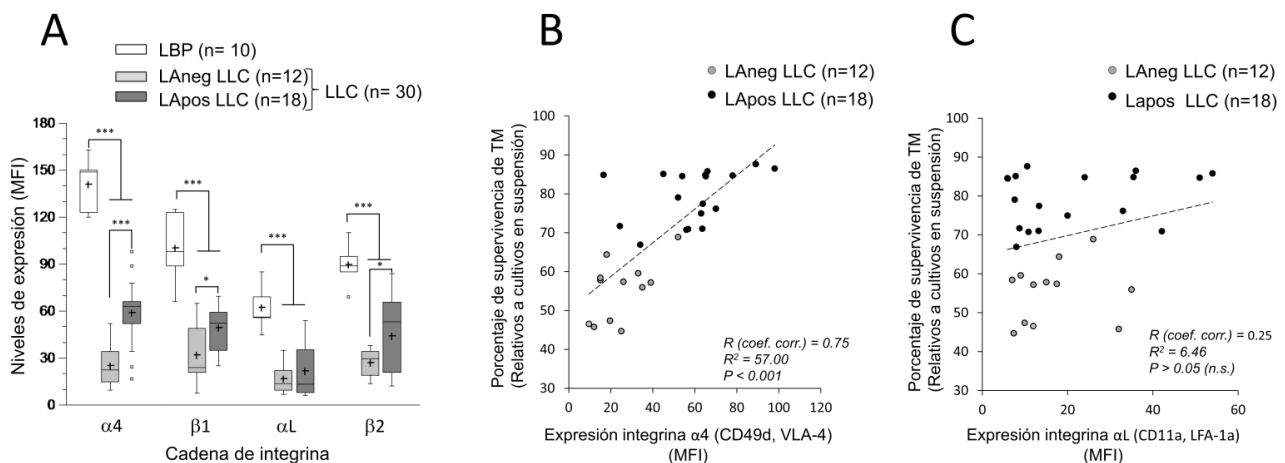


Figura 17. Las células LLC muestran una disminución en las expresiones de integrinas en comparación con los LBP, correlacionándose con el porcentaje de supervivencia de las células TM.

A-C) Los niveles de expresión de membrana de las parejas de cadenas de integrinas $\alpha 4$, $\beta 1$ y αL , $\beta 2$ fue medido por citometría de flujo (MFI) en linfocitos b (LBP) y células LLC. A) Las células LLC de pacientes LApos presentan una menor expresión de integrinas que los LBP pero mayor a los casos LANeg. *Whisper-box plots* representan los datos del número de casos indicados en cada condición LA. B-C) Análisis de correlación lineal del porcentaje de supervivencia de la fracción TM de la TEM y la expresión (MFI) de $\alpha 4$ (B) y αL (C). Encontrando una correlación significativa en $\alpha 4$. La R representa el coeficiente de correlación de *spearman*. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

d) El bloqueo de la interacción de las integrinas $\alpha 4$ y αL en las células LLC con sus ligandos endoteliales VCAM-1 e ICAM-1 respectivamente promueve la supervivencia de las células leucémicas durante la TEM.

Para confirmar este resultado previo, realizamos ensayos TEM de pacientes con LApos y LANeg bloqueando de manera independiente las interacciones de $\alpha 4$ y αL mediante la pre-incubación de las células LLC con sus ligandos endoteliales usando proteínas recombinantes de VCAM-1 (rh-VCAM-1) o ICAM-1 (rh-ICAM-1) respectivamente. Para este ensayo comparamos cinco muestras con diferentes expresiones de $\alpha 4$ o αL de cada condición clínica de LA (Tabla 3). Los casos LApos mostraron una marcada reducción en el índice de migración con el bloqueo de ambas integrinas comparadas con las células LLC no tratadas (control). Sin embargo un efecto mayor del bloqueo fue observado en $\alpha 4$ a través del tratamiento con rh VCAM-1

(Figura 18A), en contraste con las muestras de la condición clínica LANeg donde no se observaron efectos evidentes (Figura 18A). Esto confirma que ambas integrinas juegan un papel crítico en la TEM en los casos de LApos.

Al analizar de manera independiente los efectos en la viabilidad de los bloqueos de las integrinas $\alpha 4$ y αL en las fracciones no-TM y TM de la TEM, observamos que en los caso de LApos el bloqueo tanto en $\alpha 4$ como en αL , provoca un aumento en la supervivencia en ambas fracciones de la TEM y en mayor magnitud en el bloqueo de αL comparadas con las células LLC no tratadas (Figura 18B), mientras que en los casos de LANeg este efecto solo se observa en el bloqueo de αL (Figura 18B). En los cultivos en suspensión no se observaron cambios significativos en la viabilidad de las células LLC tras el bloqueo por la unión de las proteínas recombinantes (Figura 18B). Esto sugiere que los efectos observados en los ensayos TEM pueden estar relacionados con la inhibición de la interacción de la integrina correspondiente con el endotelio. Al referir los porcentajes de supervivencia de las células TM respecto a los cultivos en suspensión, observamos que en los casos de LApos tras los tratamientos con los ligandos recombinantes los efectos de una mayor supervivencia se mantienen (Figura 18C), sin embargo al referirlos a la fracción no-TM estos efectos se ven afectados, disminuyendo su viabilidad (Figura 18C). Por tanto esto sugiere que la interacción de integrinas incluso podría además rescatar a las células LLC durante la diapédesis de las señales apoptóticas recibidas al inicio de la adhesión.

Tabla 3: Expresiones de $\alpha 4$ y αL en muestras de células LLC utilizadas para el bloqueo con rh-ICAM-1 y rh-VCAM-1 en los ensayos TEM n = número, MFI = Intensidad media

Casos LApos			Casos LANeg		
LLC n.	$\alpha 4$ (MFI)	αL (MFI)	LLC n.	$\alpha 4$ (MFI)	αL (MFI)
n. 6	89.00	7.84	n. 1	25.00	11.95
n. 9	63.56	8.73	n. 23	18.00	18.00
n. 12	45.00	10.54	n. 25	33.00	26.00
n. 14	78.00	10.85	n. 26	35.00	35.00
n. 20	65.00	24.00	n. 27	39.00	12.00

de fluorescencia, LApos = Linfadenopatía positiva, LANeg = Linfadenopatía negativa

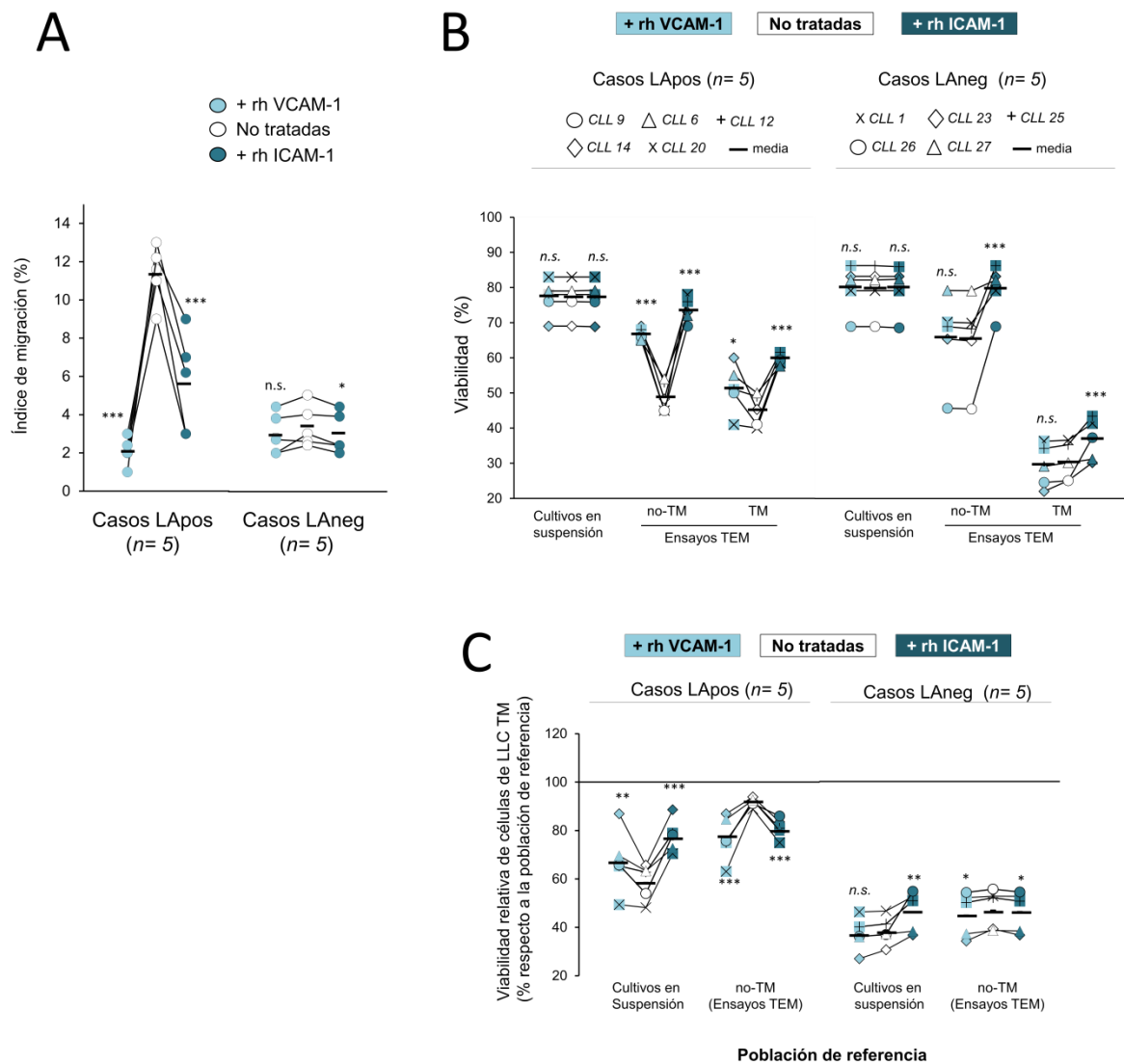


Figura 18. El bloqueo de la interacción de las integrinas $\alpha 4$ y αL de las células LLC con sus ligandos endoteliales VCAM-1 e ICAM-1 respectivamente, promueve la supervivencia de las células leucémicas durante la TEM.

A-C) 10 pacientes de LLC con (LApos) y sin (LANeg) adenopatía (5 de c/u) fueron pre-incubadas o no (No tratadas) con proteína soluble recombinante de humano VCAM-1 (+ rh VCAM-1) o ICAM-1 (+ rh ICAM-1). Estas se utilizaron en ensayos TEM sobre monocapas HUVEC-TNF o cultivadas solas en suspensión (cultivos en suspensión) durante 12 horas. A) El bloqueo de las integrinas provoco una disminución en los casos LApos marcadamente mayor comparada con el control. B) LApos presentan un aumento en los niveles de viabilidad comparados con el control (No tratamiento) de los cultivos en suspensión en ambas fracciones de los ensayos TEM (no-TM y TM). C) Efectos de los tratamientos de rhVCAM-1 o rhVCAM-1 en porcentajes de viabilidad relativa, de la fracción TM referida a los cultivos en suspensión, las LApos presentaron cambios más significativos con un aumento en la viabilidad, pero no así al referirlos con la fracción no-TM de cada una de las muestras (poblaciones de referencia = 100%). Los colores indican: Azul claro, tratamiento con rhVCAM-1; blanco, células LLC no tratadas; azul oscuro tratamiento con rhICAM-1. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

1.3 La supervivencia dependiente de integrinas es contrarrestada por la señalización *reverse* de ephrinA4.

Una vez establecido que las integrinas median la supervivencia en las células LLC durante la TEM, quisimos analizar la posible modulación a través de ephrinA4 mediante la señal *reverse* como previamente habíamos descrito en nuestro laboratorio (Trinidad y cols. 2009). Primero determinamos los niveles de expresión por citometría de flujo de ephrinA4 en la superficie celular en las 30 muestras analizadas y estudiamos su asociación con los parámetros clínicos antes descritos a los que incluimos alteraciones citogenéticas.

a) La expresión de membrana de ephrinA4 en la células LLC está claramente disminuida en los casos de LApos correlacionándose de manera indirecta con el porcentaje de supervivencia durante la TEM en ambas condiciones de LA.

Tras clasificar las muestras de acuerdo a los diferentes parámetros clínicos estudiados en relación a su expresión de ephrinA4, la mayor asociación fue encontrada de manera significativa en la condición LA pero no así en IgHV, ZAP-70 y CD38 (Figura 19A). Estas expresiones están dentro de la misma línea de nuestros resultados previos (Alonso-Colmenar y cols. 2009, Trinidad y cols. 2009), en donde encontramos que la expresión de ephrinA4 fue significativamente más alta en LANeg que en las muestras LApos (Figura 19A). En relación a las alteraciones citogenéticas encontramos que los niveles de expresión de ephrinA4 fueron bajos en la mayoría de los casos con trisomía 12 (tris12) (4 de 5) y en pacientes con delección 11q (3 de 4) (Figura 19A), lo que podría estar relacionado con el incremento en el riesgo de presentar adenopatías en este tipo de pacientes.

De manera interesante al estudiar esta expresión y su relación con el porcentaje de supervivencia en ambas condiciones de LA (Figura 19B-C), encontramos una correlación inversa tanto en las LApos (Figura 19B) como en los casos de LANeg (Figura 19C), observando en términos generales que una mayor expresión de la ephrinA4 resulta en una menor supervivencia, contrario a lo observado con integrinas (Figura 17B-C). Por lo tanto las expresiones de ephrinA4 y CD49d ($\alpha 4$) parecieran seguir un patrón inverso. Tras realizar un estudio de correlación lineal entre estas dos moléculas, efectivamente, encontramos una correlación inversa en los niveles de

expresión (Figura 20A). Además encontramos que en los casos LApos la presencia de una población con alta expresión de CD49d se correlaciona con una baja expresión de *ephrinA4* (Figura 20B). En conjunto estos datos sugieren que *ephrinA4* podría mediar la supervivencia durante la TEM de las células LLC directa y/o indirectamente modulando la adhesión de integrinas.

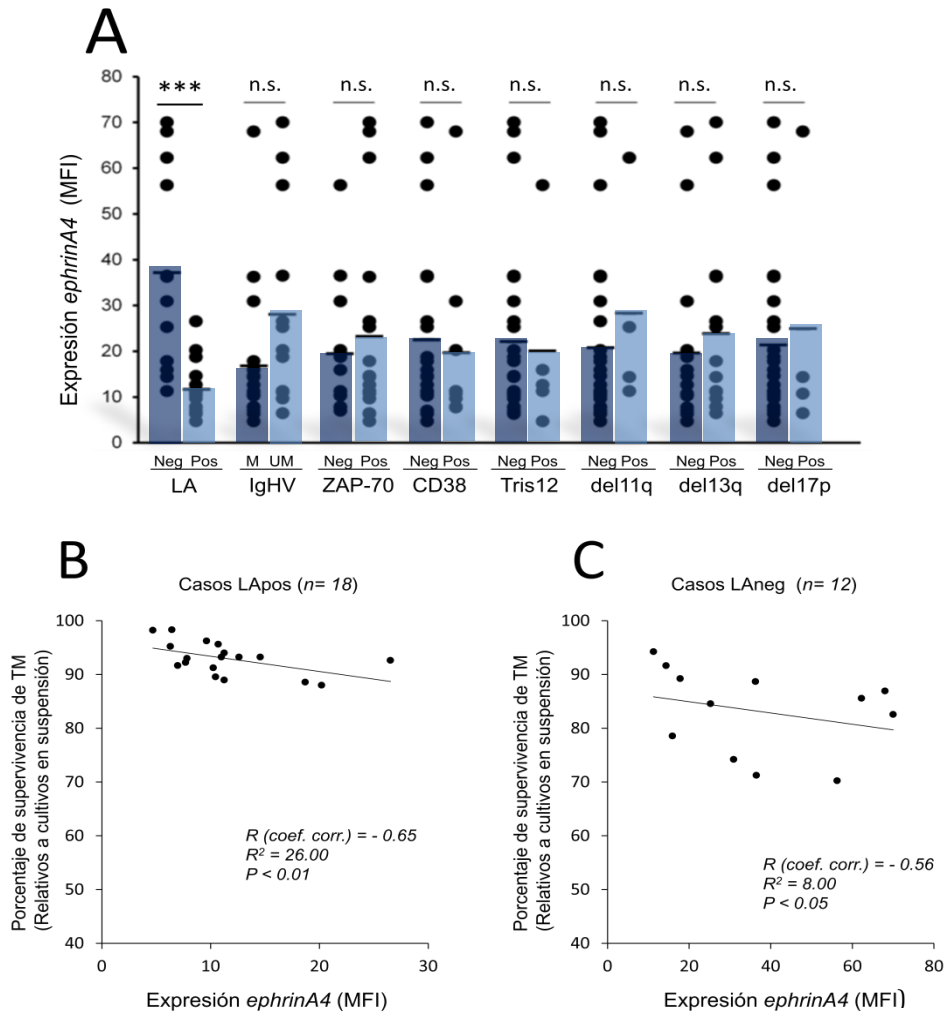


Figura 19. La expresión de membrana de ephrinA4 en las células LLC está claramente disminuida en los casos LApos correlacionándose de manera indirecta con el porcentaje de supervivencia durante la TEM en ambas condiciones de LA.

A-C) La expresión de ephrinA4 fue medida en la superficie celular por citometría de flujo (MFI) de las muestras de los 30 pacientes estudiados y se determinó su correlación con el porcentaje de supervivencia. A) Análisis de la expresión de ephrinA4 de acuerdo a los parámetros clínicos de la enfermedad mostró una asociación directa con LA encontrando una mayor expresión en LANeg. Resultados similares fueron obtenidos cuando se excluyeron los cuatro casos con la expresión considerablemente más alta que el resto de las muestras (no mostrado). B-C) Estudio de correlación lineal de la expresión de ephrinA4 con el porcentaje de supervivencia mostraron una correlación inversa en ambos casos LA, marcadamente mayor en los casos de LApos (B) comparados con LANeg (C). La R representa el coeficiente de correlación de *spearman*. La significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

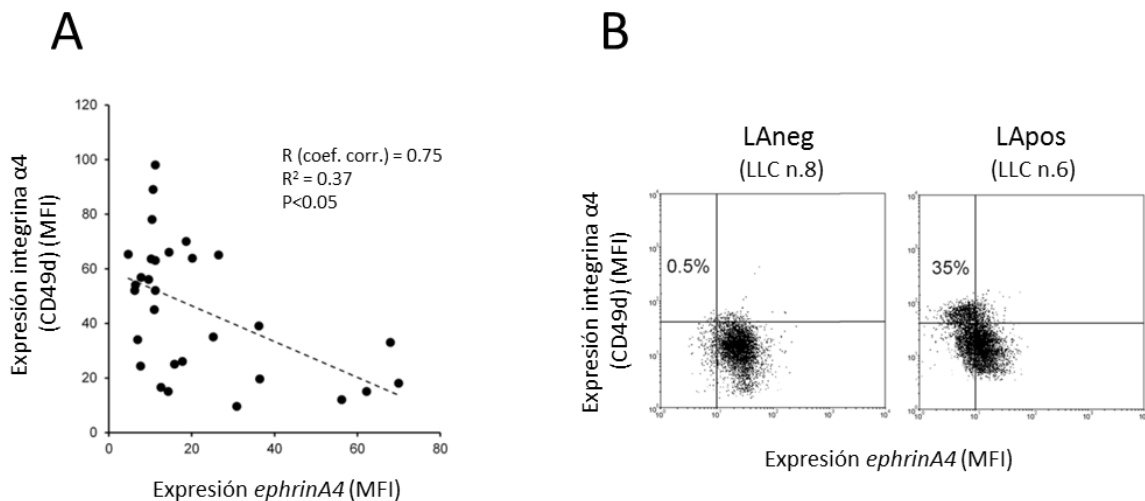


Figura 20. La expresión de membrana de ephrinA4 en las células LLC presenta una correlación inversa con los niveles de expresión de $\alpha 4$.

A-C) La expresión de ephrinA4 y $\alpha 4$ (CD49d) fueron medidos en la superficie celular por citometría de flujo (MFI) de las muestras de los 30 pacientes estudiados. A) Se observó una correlación inversa entre la expresión de membrana de ephrinA4 y $\alpha 4$. B) *dot plots* de la expresión de ephrinA4 respecto a $\alpha 4$ en pacientes de LApos observando una población con una expresión alta de $\alpha 4$ a diferencia de los casos LANeg en la cual está ausente. La R representa el coeficiente de correlación de *spearman*.

b) La señal *reverse* generada por ephrinA4 provoca una disminución en la supervivencia de las células LLC en los casos LApos al interactuar con los ligandos de integrinas ICAM-1 y VCAM-1.

Para estudiar la posibilidad de que ephrinA4 podría probablemente mediar la supervivencia de las células LLC durante la TEM de manera directa y/o indirectamente modulando la adhesión de integrinas, pre-incubamos las células LLC con un exceso de proteína recombinante humana de dominio extracelular de EphA2 (EphA2-Fc) la cual podría provocar una señalización *reverse* modulando la afinidad de las integrinas (Trinidad y cols. 2009). Las células LLC fueron cultivadas solas en suspensión o con rhICAM-1 o rhVCAM-1 previamente pegadas a placa en el fondo el pocillo, además estudiamos otros ligandos de integrinas de la matriz extracelular (ECM) incluyendo fibronectina (FN), colágeno tipo-1 (CL-1), laminina (LM) y vitronectina (VN) y BSA como testigo. Analizamos su viabilidad como en los ensayos TEM tras 12 horas de cultivo.

Al relativizar los datos al control (células LLC solas en suspensión) observamos que EphA2-Fc no provocó efectos significativos en la viabilidad de las células

leucémicas cultivadas con BSA, descartando un rol autónomo de la señalización *reverse* de ephrinA4 en la supervivencia de las células LLC. Al contrario de esto, si se observaron efectos sobre los distintos ligandos de integrinas en ambas condiciones clínicas de LA (Figura 21A-B).

En las células LLC no tratadas con EphA2-Fc observamos efectos de supervivencia en los casos LApos sobre cada uno de los dos ligandos endoteliales (ICAM-1, VCAM-1) (Figura 21A) pero no así en los casos LANeg (Figura 21B). Por otro lado se observó en todas las muestras que las ECM inducen una disminución en la viabilidad de las células LLC (Figura 21A-B), a excepción de FN que se une a través de la integrina $\alpha 4$, generando efectos de supervivencia en los casos de LApos (Figura 21A) pero no así en LANeg (Figura 21B). Estos datos concuerdan con las señales de supervivencia mediadas por las integrinas αL y principalmente por $\alpha 4$ durante la diapédesis, como se concluyó anteriormente al bloquearlas durante los ensayos TEM (Figura 18B).

Por otro lado las células LLC tratadas con EphA2-Fc provocaron una disminución de los efectos observados en las células LLC no tratadas, disminuyendo la viabilidad en las LApos con rhICAM-1 y rhVCAM-1 así como con FN (Figura 21A), mientras que en las ECM la señal *reverse* protege de la apoptosis en ambos casos de LA (Figura 21A-B) disminuyendo la apoptosis observada en las células LLC no tratadas. Por lo tanto podríamos pensar que la señal *reverse* generada por ephrinA4 podría estar afectando los niveles de expresión de las integrinas provocando, por un lado, una disminución en la supervivencia de las células LLC y por otro evitando la apoptosis en los casos de las ECM, probablemente al impedir la interacción con sus respectivos ligandos.

c) La señal *reverse* generada por ephrinA4 provoca una disminución en la adhesión de las células LLC a HUVEC-TNF mediante el secuestro de las integrinas $\alpha 4$ y αL sin alterar sus niveles de expresión de membrana.

Para indagar en los efectos provocados por la señal *reverse* generada por ephrinA4 y el posible daño a los niveles de expresión de integrinas estudiamos 3 muestras de casos de LApos. Tras el tratamiento de EphA2-Fc los niveles de expresión fueron medidos por citometría de flujo y las células LLC fueron colocadas sobre

monocapas HUVEC-TNF durante dos horas de incubación para estudiar su adhesión. Tras analizar la adhesión por microscopía encontramos que la señal *reverse* generada a través ephrinA4 tras la unión con EphA2-Fc inhibe la adhesión a los ligandos de integrinas (Figura 22A), observando una disminución en el número de células LLC adheridas respecto a las células LLC no tratadas en las 3 muestras analizadas (Figura 22B). Esta señal generada no provocó una alteración en la expresión de membrana de las integrinas en las células LLC (Figura 22C). Tras determinar las medias de las muestras analizadas no encontraron cambios significativos después el tratamiento de EphA2-Fc (Figura 22D).

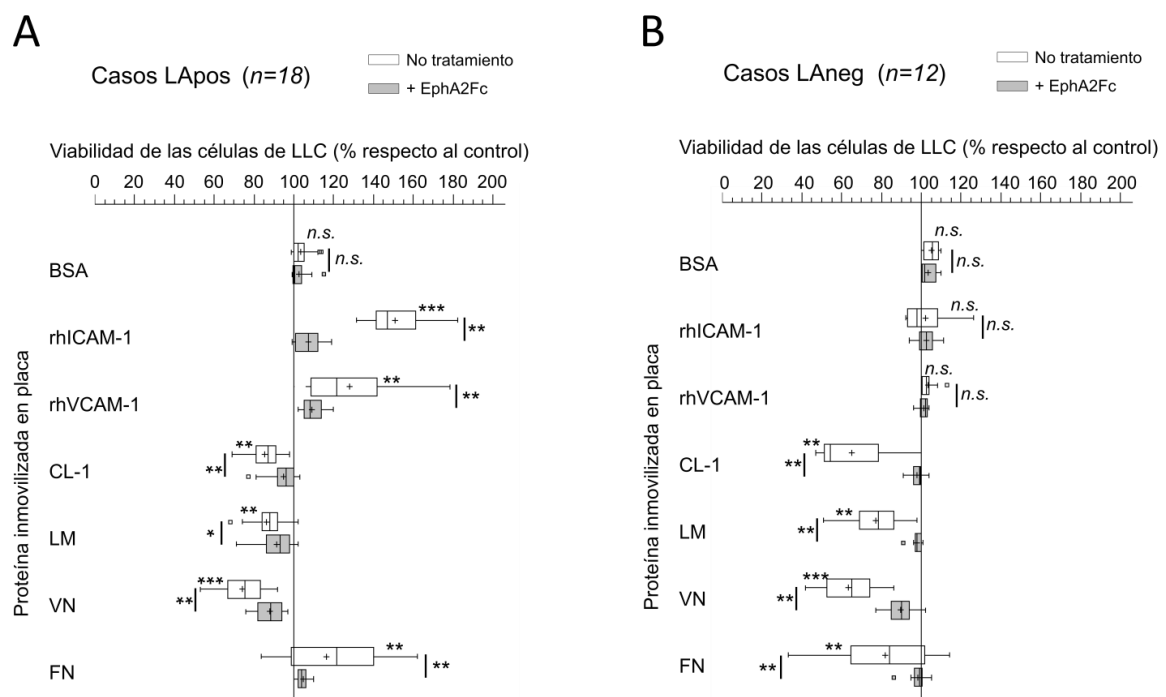


Figura 21. La señal *reverse* generada por ephrinA4 provoca una disminución en la supervivencia de las células LLC en los casos LApos al interactuar con los ligandos de integrinas ICAM-1 y VCAM-1.

A-B) Células LLC fueron cultivadas en suspensión durante 12 horas en pocillos no tratados (control) o en pocillos que contenían proteína inmovilizada pegada en placa (rhICAM-1, rhVCAM-1, CL-1, LM, VN, FN) y BSA usado como proteína no específica también inmovilizado en placa. Las células fueron pre-incubadas (+ EphA2-Fc) o no (no tratamiento) con cantidades saturantes de proteína recombinante EphA2 de dominio extracelular (EphA2-Fc). A) EphA2-Fc provocó en las muestras LApos una disminución en la viabilidad con las MAC pero disminuye la apoptosis provocada por las proteínas de la MEC (excepto FN). B) En LANeg no se observaron cambios significativos con las MAC pero si rescata de la apoptosis a las células LLC con las proteínas de las MEC. La viabilidad de las células LLC se muestra en porcentaje respecto al control. *Whisker-plots* representan los datos del número de casos indicados en cada condición LA: (+) media y (-) mediana. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

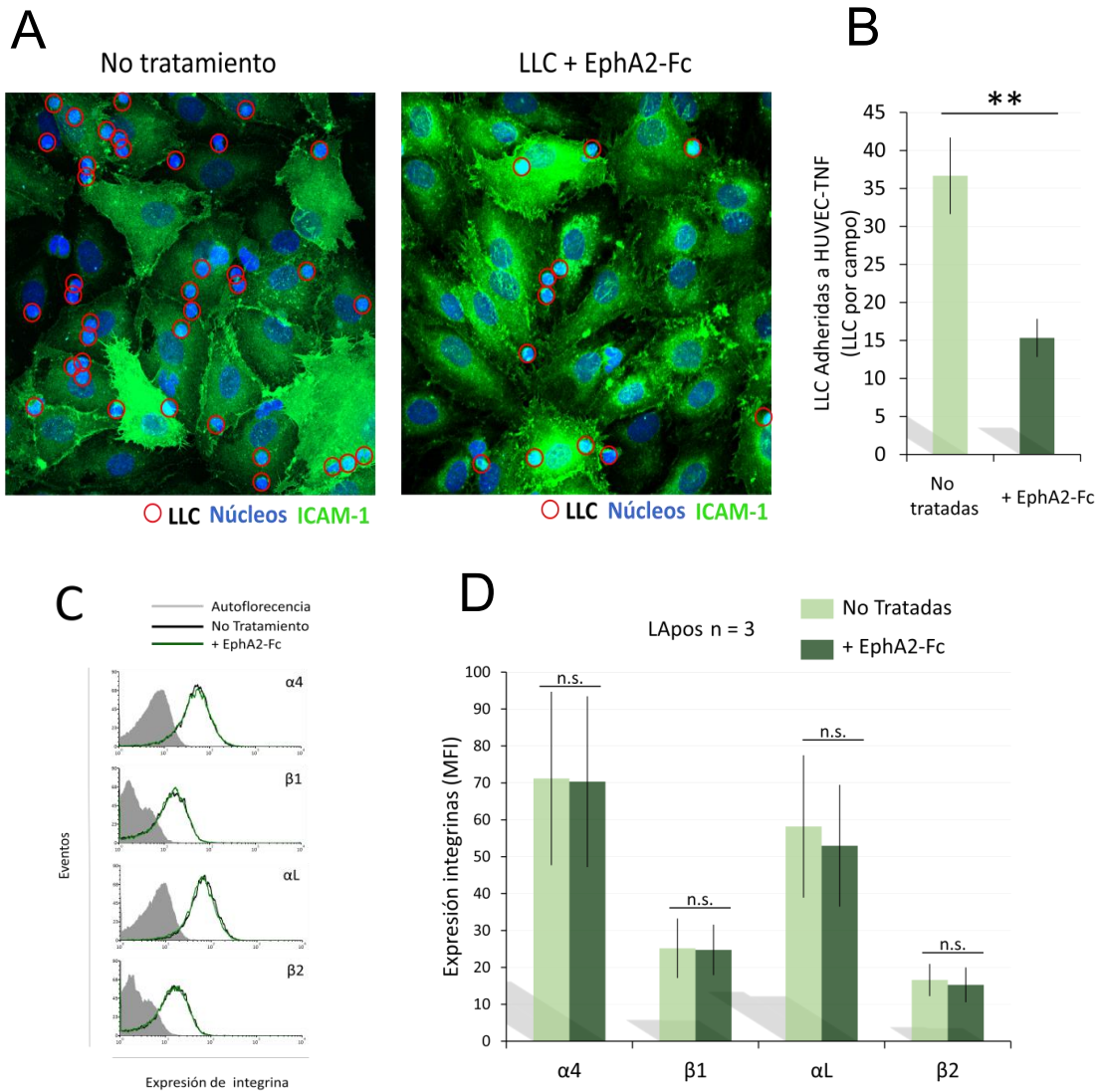


Figura 22. La señal *reverse* generada por ephrinA4 provoca una disminución en la adhesión de las células LLC a HUVEC-TNF sin alterar los niveles de expresión de membrana de las parejas de integrinas $\alpha 4$, $\beta 1$ y αL , $\beta 2$.

A-B) Ensayos de co-cultivos (2 horas) sobre monocapas HUVEC previamente estimuladas con TNF- α . 3×10^5 células LLC fueron colocadas por pocillo tratadas y no previamente con EphA2-Fc. A) Estudios de inmunofluorescencia analizados por microscopia confocal (Objetivo 40X) teñidos con los anticuerpos α -ICAM-1-FITC (verde) y *Hoechst* (azul). Se observa un mayor número de células LLC no tratadas (izquierda) adheridas comparadas con las tratadas con EphA2-Fc (derecha), los círculos en rojo fueron colocados manualmente para indicar las células LLC adheridas. B) Representación gráfica del promedio del número de células LLC adheridas por campo (3 campos por muestra), las barras representan la media de tres experimentos con diferentes muestras de células LLC. C-D) Expresión de las cadenas de integrinas $\alpha 4$, $\beta 1$, αL y $\beta 2$ de tres pacientes con LApos previamente tratadas (+ EphA2-Fc) y no (No tratamiento) con concentraciones saturantes de EphA2-Fc. C) Histogramas del análisis por citometría de flujo no muestran cambios en la expresión de integrinas tras el tratamiento. Gris sombreado indica la autofluorescencia; negro, células LLC no tratadas; verde, células LLC + EphA2-Fc. D) Representación gráfica del análisis por citometría de flujo, las barras representan la media de las muestras analizadas. Ninguna cadena de integrinas presentó cambios en su expresión tras el tratamiento. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

Posteriormente realizamos ensayos de co-localización mediante microscopía confocal de células LLC incubadas y no con EphA2-Fc (Figura 23). Tras realizar la agrupación “*clustering*” de ephrinA4 (Tiempo 15 min) observamos la ausencia de un marcaje intracelular de las cadenas de integrinas $\alpha 4$ y αL (Figura 23A), descartando una internalización. Esto concuerda con los resultados anteriores, en los que no se observaron variaciones en los niveles de expresión de membrana de las integrinas. Sin embargo, si se observó a ephrinA4 agrupada a través de EphA2-Fc coincidiendo con las cadenas de integrinas $\alpha 4$ (Figura 23 A, panel superior) y αL (Figura 23A, panel inferior). El tiempo 0 min fue usado como control. Por tanto se determinó que existe un alto porcentaje de co-localización de las integrinas $\alpha 4$ y αL a ephrinA4 cuando las células LLC fueron tratadas con EphA2-Fc (Figura 23B, barras rojas). Resultados similares fueron obtenidos en el porcentaje de co-localización de ephrinA4 con integrinas (Figura 23B, barras verdes). Por lo tanto, la unión de ephrinA4 con EphA2 podría inhibir la adhesión de integrinas durante la TEM a través de una captura física de estas cadenas, secuestrando la cadena de integrina en la superficie celular de las células LLC, sugiriendo que la interacción física podría modular la capacidad de unión de las integrinas.

Por tanto pensamos que esta interacción pudiera provocar un efecto que altere la funcionalidad de las integrinas. Para abordar este aspecto medimos por citometría de flujo el estado de activación de $\alpha 4$ en las células LLC tratadas y no con EphA2-Fc. Las células LLC fueron teñidas con el anticuerpo HUTS-21, el cual reconoce con gran afinidad el estado conformacional de la integrina $\alpha 4$. Los resultados demostraron que el tratamiento con EphA2-Fc inactiva la integrina $\alpha 4$ en las células leucémicas, incluso cuando provocamos una activación en estas células añadiendo Mn^{2+} al medio de cultivo (Figura 24A). De la misma manera, cuando añadimos VCAM-1-Fc soluble la unión a las células LLC fue marcadamente reducida en las células tratadas con EphA2-Fc (Figura 24B).

En conclusión, estos datos apoyan fuertemente que la señalización a través de ephrinA4 en las células LLC inhibe la unión de integrinas a su ligando y por lo tanto las señales de apoptosis y/o supervivencia.

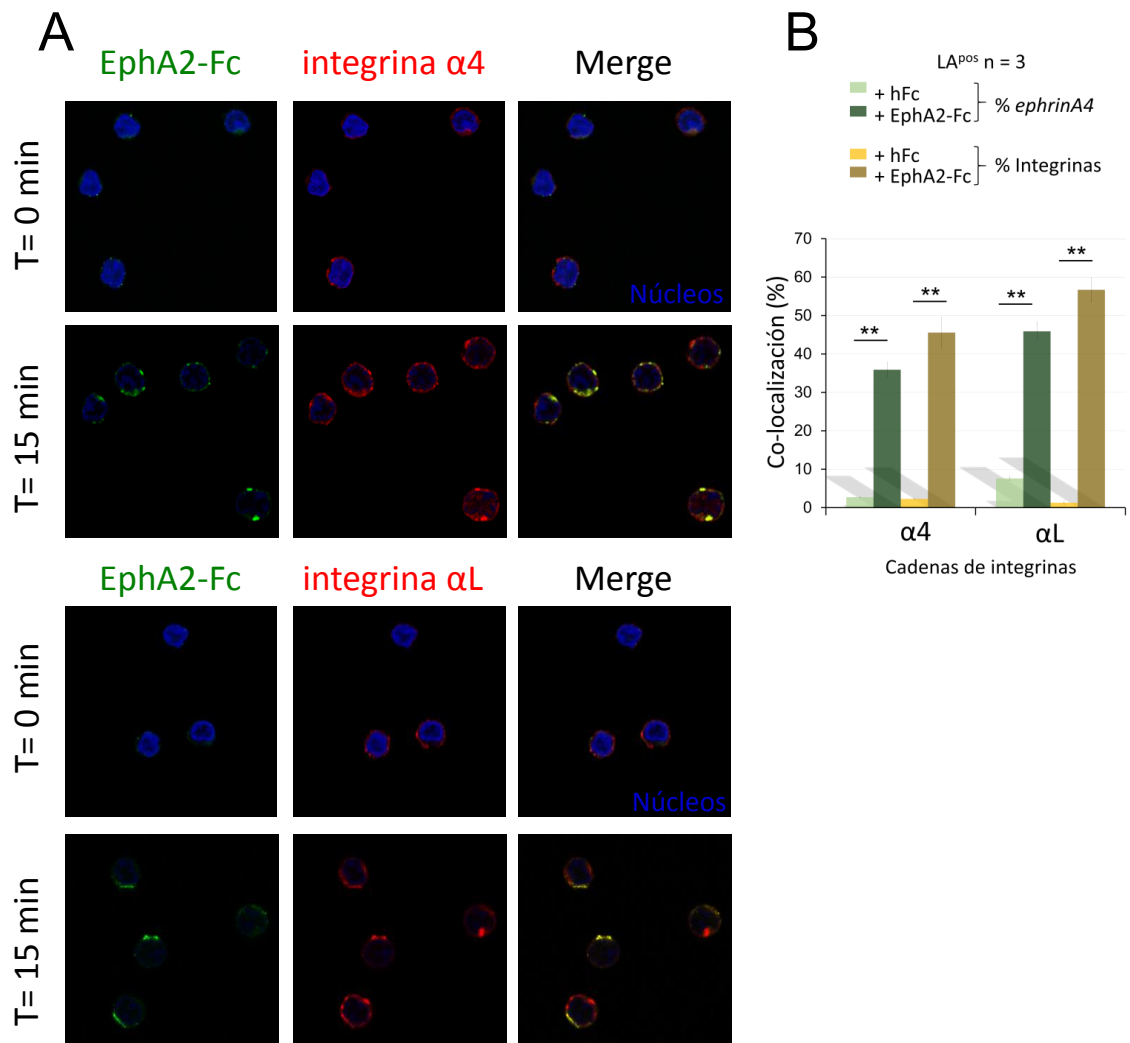


Figura 23. La señal reverse de ephrinA4 provocado por la unión de proteína recombinante EphA2-Fc secuestra físicamente las integrinas $\alpha 4$ y αL .

A) Ensayo de co-localización de ephrinA4 y las cadenas de integrinas $\alpha 4$ panel superior y αL panel inferior a tiempo cero usado como control y a 15 minutos para la agrupación (*clustering*) de ephrinA4. La agrupación de la ephrinA4 (EphA2-Fc, verde) muestra una co-localización con ambas cadenas de integrinas (rojo), observada a los 15 min del cultivo. Los núcleos fueron teñidos con *Hoechst* (azul). B) Las barras muestran ambas integrinas en porcentaje de co-localización de ephrinA4 con integrinas (verde) y el porcentaje de co-localización de integrinas con ephrinA4 (amarillas) en las células LLC tratadas (+ EphA2-Fc) y no (+ hFc, control). Se muestra un experimento representativo de 3 realizados. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

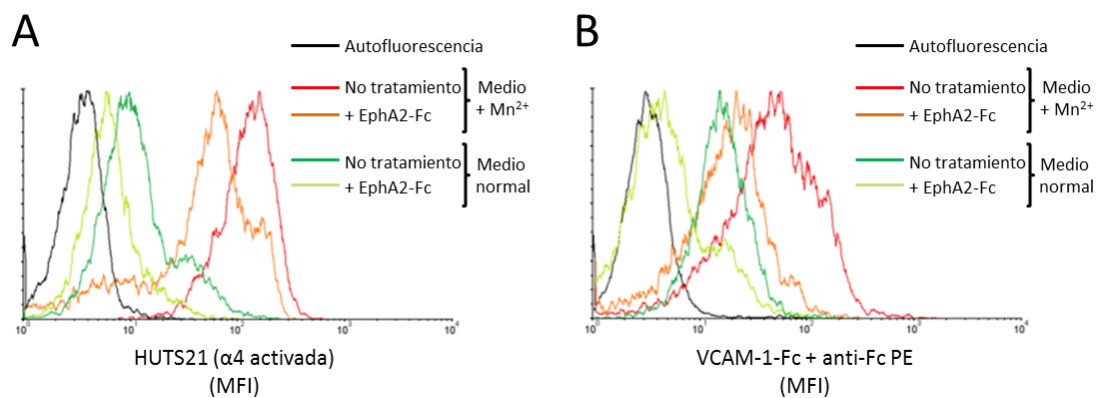


Figura 24. La señal *reverse* de ephrinA4 provocado por la unión de proteína recombinante EphA2-Fc secuestra físicamente las integrinas $\alpha 4$ y αL .

A-B) Suspensiones celulares LLC (1×10^5) fueron incubadas con cantidades saturantes de EphA2-Fc (+ EphA2-Fc) o solo con rhFc (No tratamiento) (A), o con anti-Fc -PE previamente unido a VCAM-1-Fc (B), ambos en medio normal o condicionado para provocar aun más la activación de $\alpha 4$; Medio + 1mM $MnCl_2$ (Medio + Mn^{2+}). A) Tras revelar la activación de $\alpha 4$ con el anticuerpo HUTS-21 unido a PE, los histogramas muestran una disminución en la actividad de $\alpha 4$ en las células tratadas (+ EphA2-Fc) (líneas verdes), incluso con Medio + Mn^{2+} (línea naranja). B) Los histogramas muestran una disminución en la unión de $\alpha 4$ al ligando VCAM-1-Fc (líneas verdes) y de igual manera en medios Medio + Mn^{2+} (línea naranja).

d) La unión de ephrinA4 al endotelio a través de EphA2 impide las señales de supervivencia a través de integrinas proporcionadas durante la TEM.

Tras observar los posibles efectos de la señalización *reverse* a través de ephrinA4 en las células LLC, estudiamos además sus efectos en los ensayos TEM pre-incubando las células LLC con EphA2-Fc. En estas condiciones la señalización bidireccional a través del ligando-receptor en las células LLC y endotelio es inhibida como se explica en el apartado de material y métodos (Figura 9), pero la señalización *reverse* de la ephrinA4 en las células LLC puede llevarse a cabo eventualmente (Trinidad y cols. 2009). Para estos experimentos elegimos seis muestras del parámetro clínico LA con diferentes niveles de expresión de ephrinA4 dentro de cada grupo (LApos, LANeg) (Anexo 1, Tabla 1). De acuerdo con nuestros resultados previos (Trinidad y cols. 2009), observamos que el tratamiento con EphA2-Fc provocó una

marcada disminución en los índices del porcentaje de migración en la TEM en todas las muestras (Figura 25A), corroborando la inhibición de la adhesión de integrinas con sus ligandos endoteliales.

Al analizar la viabilidad encontramos que, del mismo modo que en el bloqueo de integrinas en los ensayos TEM (Figura 18), el bloqueo con EphA2-Fc también induce un incremento significativo en la viabilidad de las células no-TM y TM en todas las muestras y en ambos casos de la condición LA (Figura 25B). Al relativizar los porcentajes de viabilidad de la fracción TM con los cultivos en suspensión se observó que la supervivencia se mantenía con una ligera pero significativa mejora en el porcentaje de supervivencia en LApos y en menor grado en LANeg, pero no así al referirlos a la fracción no-TM, donde se observó una disminución en los casos de LApos y sin efecto en LANeg (Figura 25C). Estos datos apoyan fuertemente que la unión de ephrinA4 al endotelio mediante EphA2 impide las señales de supervivencia a través de integrinas proporcionadas durante la diapédesis.

1.4 La ausencia de la señalización *reverse* de ephrinA4 mejora dramáticamente la supervivencia de las células LLC TM de los casos Lapos

Con el fin de aclarar aún más el rol de la señalización de ephrinA4 en los ensayos TEM, realizamos ensayos de silenciamiento de esta señal empleando ARN de interferencia (siRNA). Primeramente silenciamos EphA2 en la célula endotelial, sin embargo la ausencia de este receptor fue incapaz de unir estrechamente a las células endoteliales y por lo tanto no permitió formar una monocapa (Figura 26), limitando la realización de los ensayos TEM. Por tanto para poder llevar a cabo estos ensayos silenciamos la ephrinA4 en las células LLC mediante nucleofección con *siRNA* en las seis muestras de LApos y LANeg utilizadas anteriormente en los tratamientos de bloqueo con EphA2-Fc en los ensayos TEM.

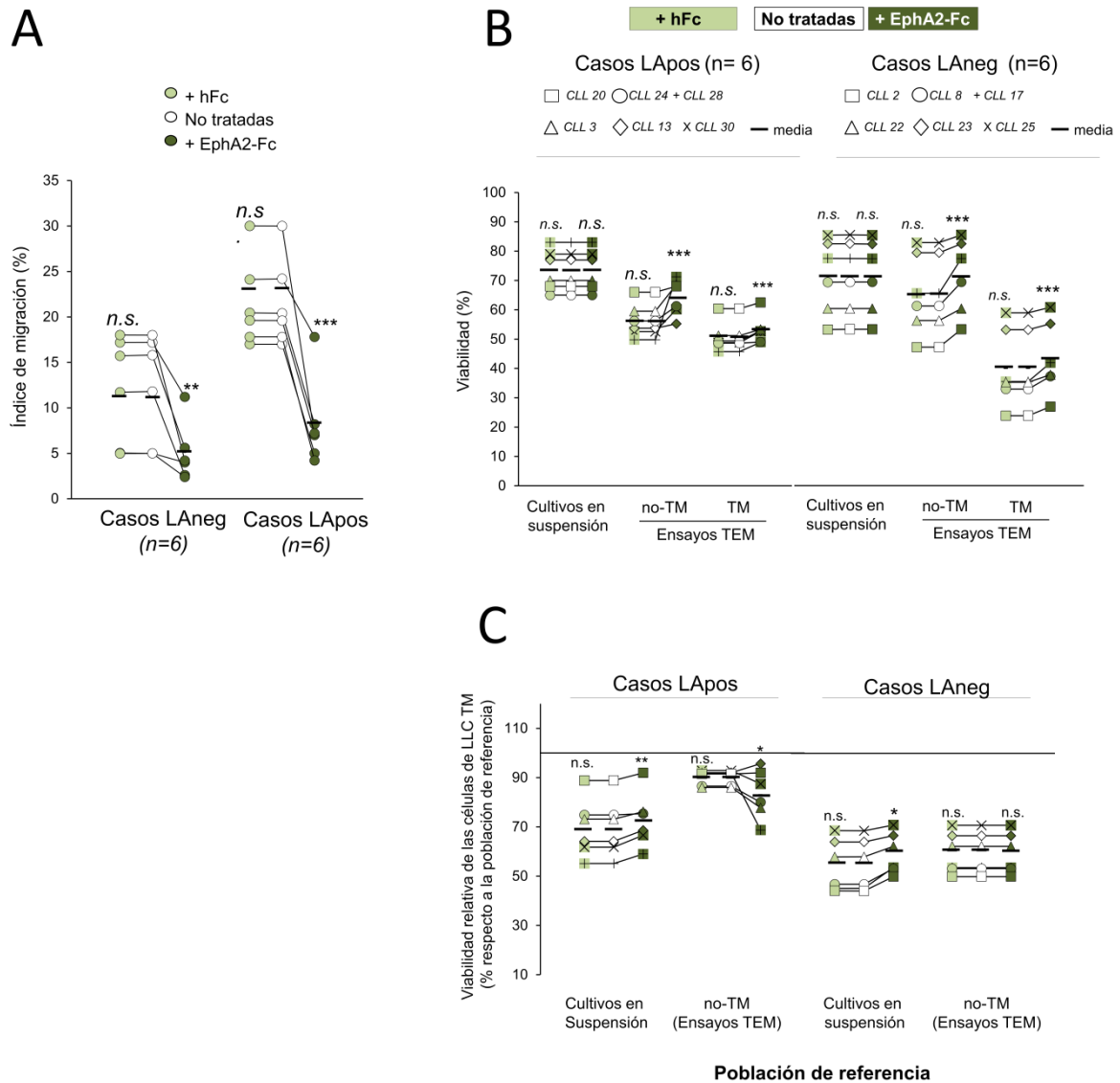


Figura 25. La unión de ephrinA4 al endotelio a través de EphA2 impide las señales de supervivencia a través de integrinas proporcionadas durante la TEM.

A-C) Células LLC de pacientes con (LApos) y sin (LANeg) linfadenopatía, las cuales fueron pre-incubadas o no (No tratadas) con cantidades saturantes de proteína recombinante humana EphA2-Fc (+ EphA2-Fc) o con fragmentos h-Fc (+ hFc). Las células LLC pre-tratadas fueron utilizadas para ensayos TEM sobre monocapas HUVEC-TNF o cultivadas solas en suspensión (cultivos en suspensión) durante 12 horas. A) Disminución en los índices de migración en ambos casos de LA provocado por el tratamiento. B) LApos y LANeg presentan un aumento en los niveles de viabilidad en ambas fracciones de los ensayos TEM (no-TM y TM) después del tratamiento con las proteínas recombinantes. C) Efectos de los tratamientos EphA2-Fc en porcentajes de viabilidad relativa de la fracción TM referida a los cultivos en suspensión muestran un aumento en la viabilidad en LApos y una caída en la viabilidad referida a la fracción no-TM de cada muestra (poblaciones de referencia = 100%). Los colores indican: verde claro, tratamiento con hFc; blanco, células LLC no tratadas; verde oscuro tratamiento con EphA2-Fc. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

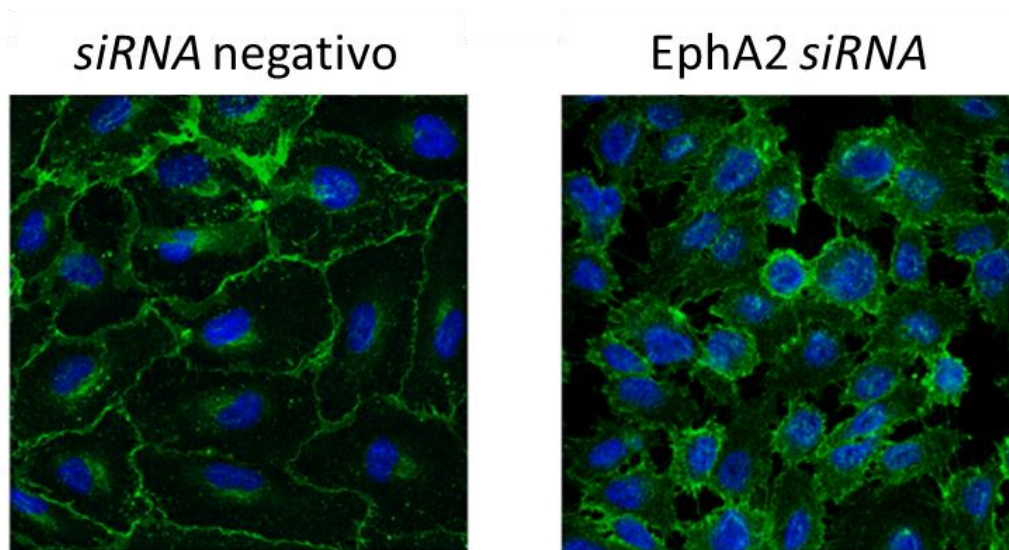


Figura 26. El silenciamiento de EphA2 en las células HUVEC inhibe la formación de la monocapa endotelial. Cultivos de células HUVEC nucleofectadas con ARN de interferencia para EphA2 (*izquierda*, EphA2 *siRNA*) o sin nucleofectar (*derecha*, *siRNA* negativo) fueron procesados para inmunodetección de anti-VE-Cadherina (verde) y *Hoechst* (Azul). *Objetivo HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV*. Se observa que el silenciamiento de EphA2 en las HUVEC inhibe una formación adecuada de la monocapa endotelial (*derecha*), mientras que en el control donde se observa una monocapa uniforme (*Izquierda*)

a) El silenciamiento de la expresión de ephrinA4 en las células LLC de pacientes con y sin adenopatías permite una mayor adhesión al endotelio pero impide su migración.

Una vez nucleofectadas las células LLC se dejaron en cultivo 48 horas y posteriormente se midió por citometría de flujo la expresión de membrana de ephrinA4 (Figura 27A). Todas las muestras de LLC mostraron una fuerte reducción de la expresión (Figura 27B) sin afectar significativamente la expresión de las integrinas (Figura 27C). Una vez verificado el silenciamiento de ephrinA4 utilizamos estas células LLC para el estudio de ensayos TEM. Tras realizar el ensayo TEM observamos que las células leucémicas silenciadas muestran una fuerte reducción en los porcentajes de TEM comparadas con el control negativo (*siRNA* neg) o células LLC no tratadas (Figura 28A). Para indagar si esta disminución de células LLC migradas se debía a un efecto de repulsión o deficiencia de adhesión como lo observamos con los tratamientos de EphA2-Fc, analizamos los filtros de la placa *transwell* del ensayo TEM. Tras analizar los filtros por microscopía de fluorescencia (Figura 28B) observamos en las células LLC

silenciadas un incremento en el número de células adheridas a la monocapa HUVEC-TNF comparadas con las células LLC no tratadas (Figura 28C) indicando que la ausencia de ephrinA4 promueve una mayor adhesión (Alonso-Colmenar y cols. 2009, Trinidad y cols. 2009), pero no permite la diapédesis de las células LLC.

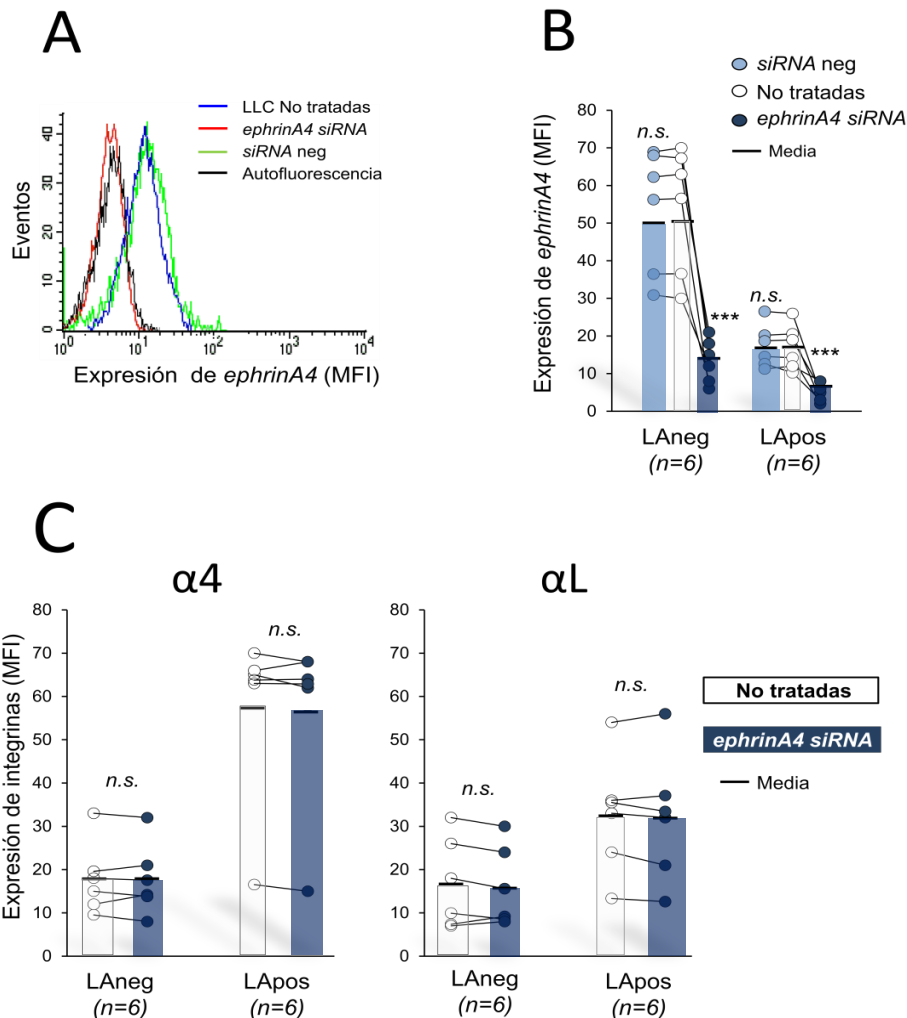


Figura 27. Expresión de membrana de ephrinA4 e integrinas tras 48 horas después de la nucleofección.

A-C) células LLC de pacientes con (LApos) y sin (LAneg) adenopatías fueron nucleofectadas con ARN de interferencia para ephrinA4 (*ephrinA4 siRNA*) o con el control negativo (*siRNA neg*). 48 horas después de la nucleofección la expresión de membrana de ephrinA4 e integrinas $\alpha 4$ y αL fueron medida por citometría de flujo. A) Histogramas representativos de una de las muestras nucleofectadas (rojo) muestra una caída en la expresión de ephrinA4 comparadas con *siRNA neg* (verde) y células LLC no tratadas (azul), la autofluorescencia se muestra en negro. B) Grafico comparativo entre las 12 muestras nucleofectadas (azul oscuro, *ephrinA4 siRNA*) con el control negativo (azul claro, *siRNA neg*) y las células LLC no tratadas (blanco) en ambas condiciones clínicas de LA muestran una caída en la expresión de ephrinA4. C) Comparación de los niveles de expresión (MFI) de integrinas $\alpha 4$ (izquierda) y αL (derecha) interferidas (azul) o no (blanco) 48 horas después de la nucleofección, no presentan cambios en la expresión de integrinas. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

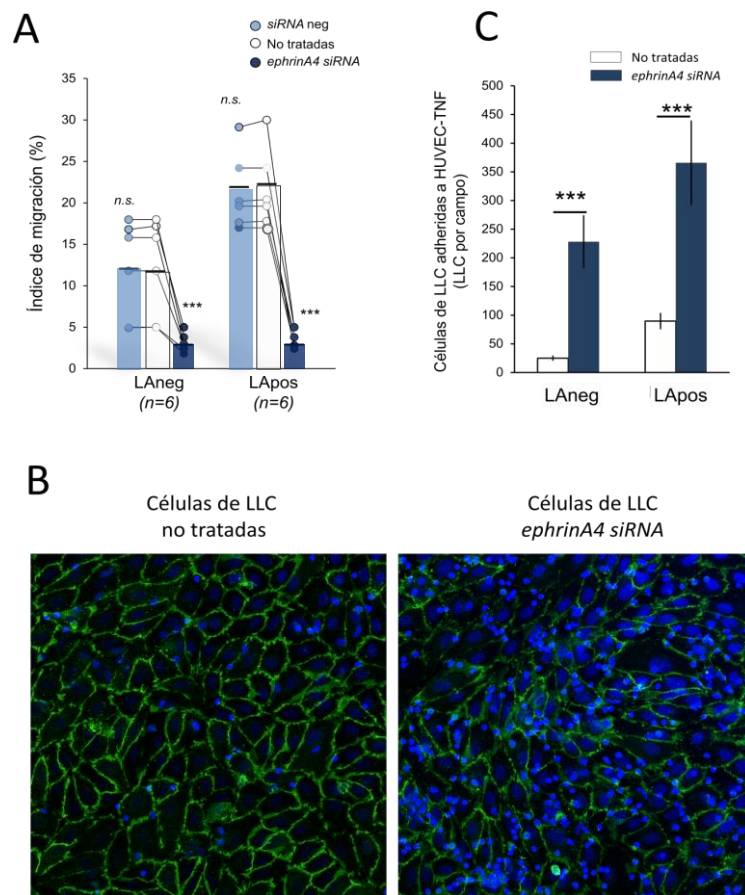


Figura 28. El silenciamiento de la expresión de ephrinA4 en las células LLC de pacientes con y sin adenopatías permite una mayor adhesión al endotelio pero impide su migración.

A) Disminución en los índices de migración de los ensayos TEM de las células LLC nucleofectadas (ephrinA4 siRNA, azul oscuro) comparadas con las no tratadas (blanco) así como el control negativo de la nucleofección (siRNA neg, azul claro) B) Filtros *transwell* de los ensayos TEM fueron teñidos con α -CD31 (verde, uniones entre células HUVEC) y *Hoechst* (azul, núcleos) y examinados por microscopia confocal (20X). Células LLC interferidas con ephrinA4 siRNA (derecha) muestran un gran numero de células adheridas comparadas con las no tratadas (izquierda). C) Número absoluto de células adheridas a las monocapas HUVEC-TNF de los filtros *transwell*. células LLC interferidas (ephrinA4 siRNA) muestran un aumento significativo de células adheridas en LANeg y marcadamente mayor en LApós comparads con células LLC no tratadas. cuantificación por análisis de imagen Imagej; >200 núcleos) en ambas condiciones clínicas de LA, las barras representa el promedio de los campos de 3 muestra de cada condición analizada. Las significancias

b) El silenciamiento de la señalización *reverse* de la ephrinA4 durante la diapédesis puede representar una ventaja para los casos LApós proporcionando señales de supervivencia.

Cuando estudiamos la viabilidad en los ensayos TEM con la nucleofección de ephrinA4 en las células LLC, observamos que este silenciamiento de ephrinA4 produce una marcada disminución en la supervivencia de las células no-TM en ambos grupos de

la condición clínica de LA comparada con el control negativo (*siRNA neg*) o células LLC no tratadas (Figura 29A). Por lo tanto, como habíamos señalado anteriormente, podríamos asociarlo con un incremento en la adhesión favoreciendo la aparición de señales apoptóticas en los pasos iniciales de la TEM. Por otro lado la viabilidad de las células TM de los casos LApos pero no en los LANeg fue drásticamente mejorada comparada con las células LLC no tratadas y con las células no-TM (Figura 29A), confirmando que las señales de supervivencia se llevan a cabo durante la diapédesis. Al referir la viabilidad de las células TM a los cultivos de las células en suspensión observamos en los casos LApos que el porcentaje de supervivencia está marcadamente mejorado y en mayor magnitud cuando las referimos a las células no-TM, no observando estos efectos en los casos LANeg (Figura 29B). Estos resultados, junto con los observados en el bloqueo de las integrinas y en el tratamiento de EphA2-Fc en los ensayos TEM, proveen una fuerte evidencia de que el silenciamiento de la señalización *reverse* de la ephrinA4 durante la diapédesis puede representar una ventaja para los casos LApos proporcionando señales de supervivencia.

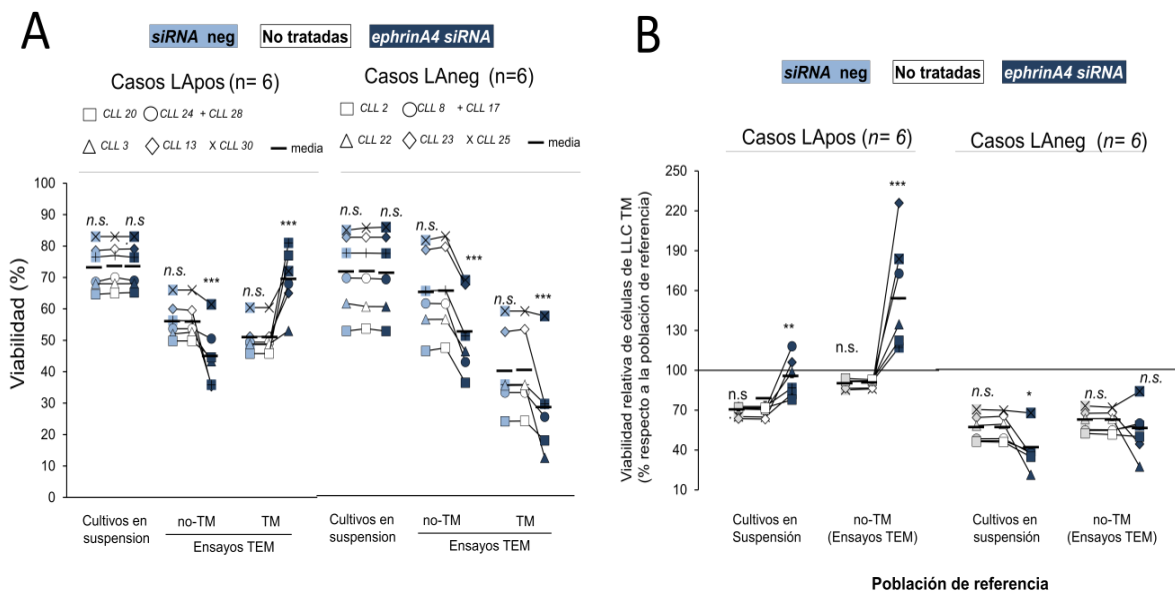


Figura 29. El silenciamiento de la señalización *reverse* de la ephrinA4 durante la diapédesis puede representar una ventaja para los casos LApos proporcionando señales de supervivencia.

A-B) Análisis del silenciamiento de ephrinA4 en la viabilidad de las células LLC en cultivos en suspensión y ensayos TEM de los 12 pacientes anteriormente utilizados en la nucleofección. A) Niveles absolutos de la viabilidad de las células LLC nucleofectadas (*ephrinA4 siRNA*, azul oscuro) en cultivos en suspensión y ensayos TEM (fracciones no-TM y TM) comparadas con el control negativo (*siRNA*, azul claro) y células LLC no tratadas (blanco), muestran una disminución e la viabilidad excepto la fracción TM de los casos LApos la cual muestra un claro aumento en su viabilidad B) Viabilidad relativa de la fracción TM de los ensayos TEM referida a los cultivos en suspensión y fracción no-TM muestran un marcado aumento en la viabilidad en los csos LApos pero no así en LANeg. (poblaciones de referencia = 100%). Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

1.5 La fracción soluble de la ephrinA4 unida al endotelio potencializa la supervivencia de las células LLC en los casos LApos mediante la inducción de la TEM a través de la ruta trans-celular.

La aparición de linfadenopatías en pacientes de LLC está asociada con el incremento de los niveles séricos de la isoforma soluble de ephrinA4 liberada por las propias células LLC a través de un *splicing* alternativo del ARNm. Esta isoforma soluble se une al receptor EphA2 en la superficie de la célula endotelial provocando una mayor adhesión y TEM de las células leucémicas (Alonso-Colmenar y cols. 2009). En principio, estos resultados podrían ser explicados por lo menos parcialmente por la ausencia de la señalización *reverse*, probablemente a través de la inhibición de la expresión de membrana de ephrinA4 mediante la señalización *reverse* y permitiendo la adhesión a través de integrinas. Sin embargo también podría ocurrir mediante un proceso poco caracterizado mediado por EphA2, secuestrando e internalizando los ligandos endoteliales ICAM-1 y VCAM-1 (Alonso-Colmenar y cols. 2009).

a) ephrinA4 soluble presente en el plasma de los pacientes de LLC puede contribuir a la mejora de la supervivencia de los casos LApos durante la TEM.

Para indagar en estos aspectos señalados en el párrafo anterior y en papel que juega la isoforma soluble de ephrinA4, primero analizamos la concentración de esta isoforma en el plasma de los pacientes con LLC. Tras el análisis, como previamente nuestro grupo había demostrado (Alonso-Colmenar y cols. 2009), hemos confirmado los altos niveles de la isoforma soluble de ephrinA4 en el plasma de pacientes con adenopatías (LApos) en comparación con aquellos que no las presentan (LANeg) (Figura 30). Al comparar estos niveles de la isoforma soluble con los demás parámetros clínicos y alteraciones citogenéticas, no encontramos una clara asociación (Figura 30)

Posteriormente realizamos ensayos TEM a través de monocapas HUVEC pre-tratadas con TNF- α , pre-incubándolas con cantidades saturantes de proteína recombinante humana *ephrinA4* (*ephrinA4*-Fc) como previamente lo habíamos señalado (18). Tras el análisis, observamos un incremento en los porcentajes de TEM en las LApos pero no en los casos de LANeg (Fig. 31A) confirmando nuestros resultados previos (16). Para analizar si estos efectos observados en la TEM, generados por la

ephrinA4-Fc mediante la unión a EphA2 del endotelio, pudieran provocar cambios evidentes entre las uniones endoteliales de la monocapa HUVEC-TNF, facilitando una mayor migración de las células LLC, realizamos un análisis por inmunofluorescencia de los filtros de los ensayos TEM tratados con *ephrinA4*-Fc. Observamos que las uniones a través de VE-Cadherina entre las células HUVEC no resultaron alteradas por el tratamiento (Fig. 31B), descartando la existencia de espacios (agujeros) en la monocapa que explicaran el incremento en las TEM.

Tras analizar el efecto del tratamiento de *ephrinA4*-Fc en la viabilidad de las células no-TM y TM observamos una notable mejora en la viabilidad de ambas fracciones de las muestras con LApos y LAneg, aunque menos marcada pero si significativa en estas últimas (Fig. 31C). Sin embargo al comparar la viabilidad de la fracción TM con las células del cultivo en suspensión y con las células no-TM, solo las muestras de pacientes con LApos mostraron un notable incremento, con un efecto marcadamente mayor que en los casos LAneg (Fig. 31D). Por lo tanto la *ephrinA4* soluble presente en el plasma de los pacientes puede contribuir a mejorar la supervivencia de las células leucémicas en los casos LApos durante la TEM.

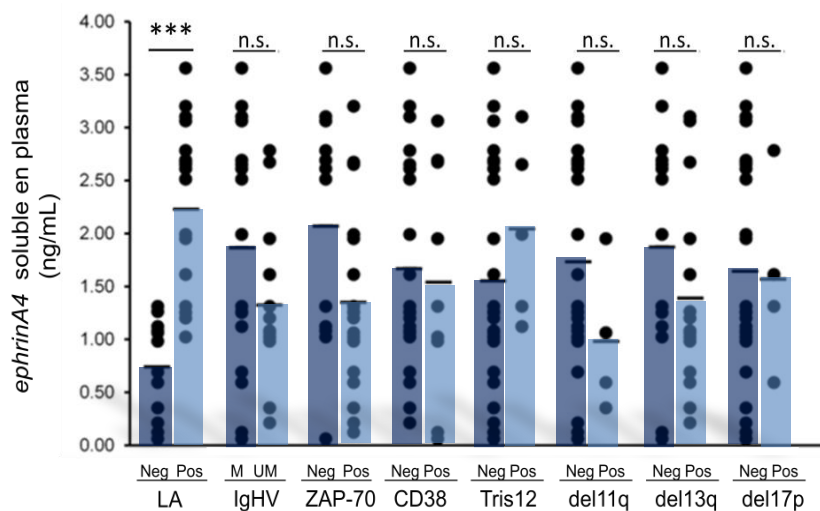


Figura 30. La expresión de membrana de *ephrinA4* en las células LLC está claramente disminuida en los casos de LApos correlacionándose de manera indirecta con el porcentaje de supervivencia durante la TEM en ambas condiciones de LA.

Los niveles solubles de *ephrinA4* en el plasma de los pacientes de LLC fueron cuantificados por el método indirecto de ELISA en unidades de ng/mL y se compararon entre los diferentes parámetros clínicos y alteraciones citogenéticas. Encontrándose una clara asociación en el parámetro de LA pero no así en el resto de parámetros. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

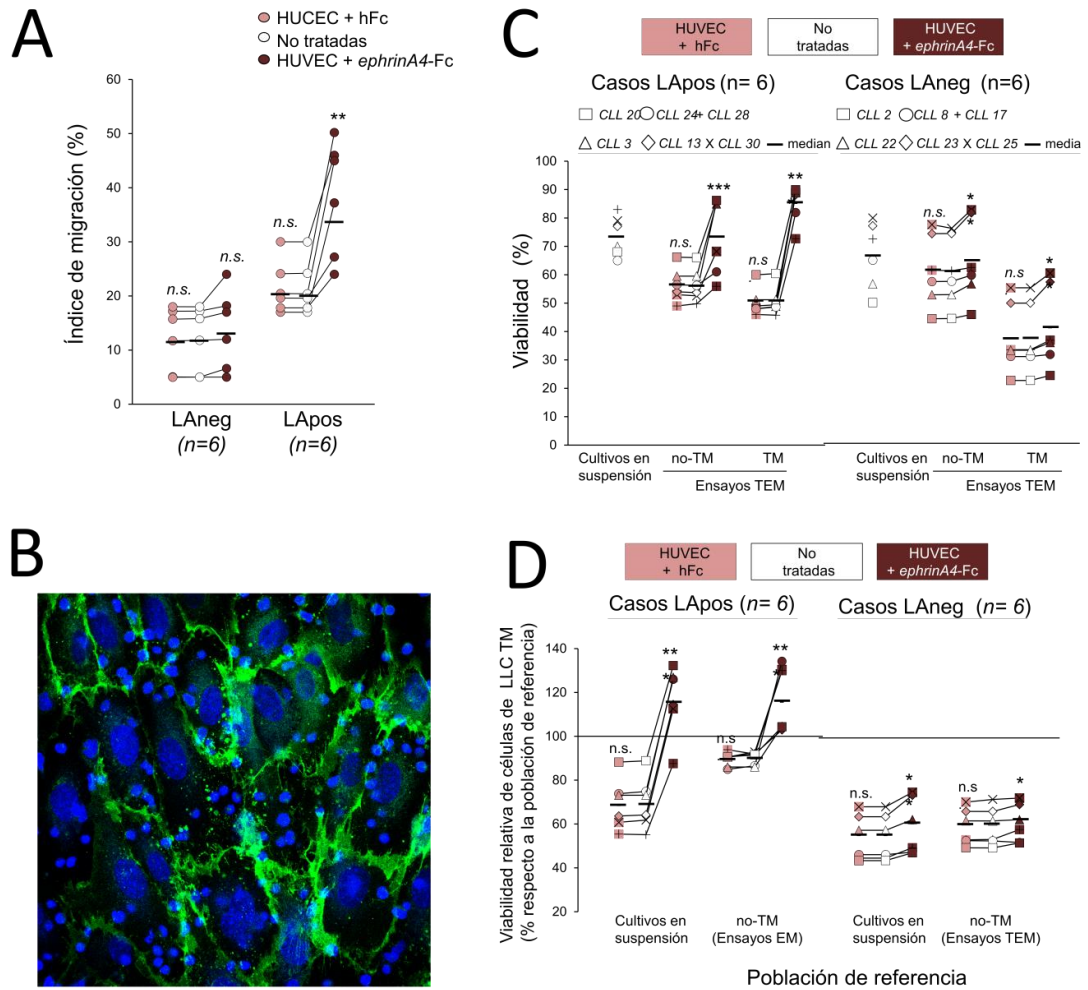


Figura 31. La ephrinA4 soluble presente en el plasma de los pacientes de LLC puede contribuir a la mejora de la supervivencia de los casos LApos durante la TEM.

A-D) Células LLC de los 12 pacientes estudiados, con (LApos) y sin (LANeg) linfadenopatía fueron colocadas para su trans-migración (ensayos TEM) durante 12 horas a través de HUVEC-TNF pre-incubada con concentraciones saturantes de proteína recombinante humana *ephrinA4-Fc* (HUVEC + *ephrinA4-Fc*), fracción humana Fc (HUVEC + hFc) o sin tratamiento (No tratadas). A) El número absoluto las células LLC TM fue contado por citometría de flujo y los índices de migración fueron determinados de acuerdo al número de células leucémicas colocadas en cada pocillo para su migración. Los índices se compararon con el control (HUVEC +hFc) y HUVEC no tratadas, observando un marcado aumento en la TEM en los casos LApos. B) Los filtros de los *transwell* del ensayo TEM no mostraron alteraciones en las uniones de VE-Cadherina (verde, uniones celulares en HUVEC), observando un gran numero de células LLC alejadas de estas uniones, los núcleos se tiñeron con *Hoechst* (azul) y se examino por microscopia confocal (40X). C) Se compararon los porcentajes de viabilidad del tratamiento de *ephrinA4-Fc* y hFc de los cultivos en suspensión o ensayos TEM (fracciones no-TM y TM) a través de HUVEC-TNF con la ausencia de tratamiento. Observando un claro aumento en la viabilidad de ambas fracciones (TM y no-TM) en ambos casos LA pero marcadamente mayor en LApos. D) Viabilidad relativa referida a los cultivos en suspensión y la fracción no-TM de los ensayos TEM muestran un aumento significativo en los casos LApos. (poblaciones de referencia = 100%). Los colores indican: rojo claro, tratamiento con hFc; blanco, HUVEC no tratadas o ausencia de tratamiento (cultivos en suspensión); rojo oscuro tratamiento con *ephrinA4-Fc*. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

b) La ephrinA4 soluble induce una TEM de las células LLC preferentemente a través de la ruta trans-celular.

Tras observar la presencia de una gran cantidad de células LLC adheridas al endotelio provocado por el tratamiento ephrinA4-Fc y sin encontrar alteraciones de las uniones de VE-Cadherina entre las células endoteliales, observamos que un gran número de células LLC se encontraban unidas a la monocapa fuera de los contactos de VE-Cadherina (Figura 31B). Esto nos llevó a investigar más a fondo si el tratamiento podría estar involucrado en la ruta para-celular (PC) o trans-celular (TC) de la TEM, así como la posible relación de estas vías con la viabilidad de las células LLC.

Para este fin, examinamos a través de inmunofluorescencia la posible asociación entre las células LLC adheridas a monocapas tratadas y no con ephrinA4-Fc y caveolina-1, la cual ha sido relacionada con la ruta TC para los linfocitos (Davids y Burger 2012, Schnoor y cols. 2015). Para ello, se añadieron células LLC sobre monocapas de HUVEC-TNF crecidas sobre *shamber slide* pre-tratadas y no con concentraciones saturantes de ephrinA4-Fc. Tras dos horas de incubación, observamos que en los pocillos tratados con ephrinA4-Fc existía un gran porcentaje de células LLC claramente localizadas con caveolina-1 dentro de vacuolas endoteliales y rodeadas por ICAM-1 (Figura 32A), sugiriendo la ruta TC de la TEM. El recuento del número de células LLC adheridas a las uniones de VE-cadherina o dentro de caveolina-1, reveló un incremento en la frecuencia con la unión a caveolina-1 después del tratamiento de ephrinA4-Fc con un 50% de células LLC unidas a ella, mientras que en ausencia del tratamiento solo era de un 5%. Contrario a esto las células LLC unidas a VE-cadherina disminuyeron de un 49% en ausencia de tratamiento a un 18% tras el tratamiento con ephrinA4-Fc (Figura 32B).

Estos datos confirman que ephrinA4 soluble no induce una TEM de las células LLC a través de la desestabilización de las uniones inter-endoteliales, sino más bien a través de las propias células endoteliales sugiriendo además que la ruta TC de la TEM podría facilitar las señales de supervivencia durante la diapédesis.

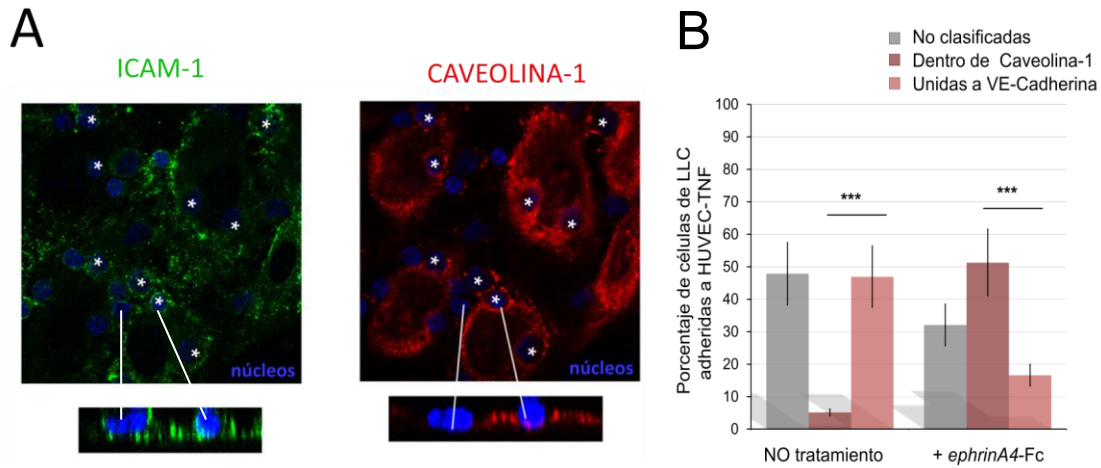


Figura 32. ephrinA4 soluble induce una TEM de las células LLC preferentemente a través de la ruta trans-celular.

A-B) Ensayos TEM en co-cultivos de dos horas, células HUVEC fueron sembradas en placas multi-pocillo *shamber slide* hasta alcanzar la confluencia y posteriormente estimuladas con $\text{TNF-}\alpha$. Tras retirar el estímulo fueron pre-tratadas con cantidades saturantes de proteína recombinante humana ephrinA4-Fc antes de colocar las células LLC de pacientes con LAPos (3×10^5 por pocillo). A) Las preparaciones fueron fijadas con paraformaldehído y mediante estudios de inmunofluorescencia analizados por microscopía confocal (Objetivo 40X) teñidos con los anticuerpos α -Caveolina-1 (rojo) y α -ICAM-1 (verde) y *hoechst* (azul, núcleos). Las células LLC fueron localizadas dentro caveolina-1 en caveolas endoteliales (asteriscos, derecha) rodeadas por ICAM-1 (asteriscos, izquierda). B) Conteo de células LLC adheridas, localizadas dentro de Caveolina-1 (rojo oscuro) muestran un aumento en su porcentaje de adhesión tras el tratamiento de ephrinA4-Fc, mientras que las unidas a VE-Cadherina (rojo claro) disminuyen. Las no clasificadas se muestran en las barras grises. Por lo menos 200 núcleos fueron contados por condición en 3 muestras analizadas. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

1.6 EphrinA4 soluble se encontró unida a EphA2 en las vénulas de endotelio alto (HEV) en linfadenopatías de pacientes con LLC incrementando la viabilidad de las células LLC transferidas a ratones tras infiltrar los gánglio linfático (GL).

Después de haber estudiado la viabilidad de las células LLC durante la TEM en pacientes con y sin adenopatías en ensayos *in vitro*, quisimos estudiar la posible correlación entre la apoptosis y la extravasación *in vivo*. Para ello investigamos de manera indirecta este proceso en las linfadenopatías de pacientes de LLC a través del análisis por microscopía de fluorescencia. Así mismo también realizamos ensayos de infiltración ganglionar en ratones.

a) Células LLC apoptóticas fueron observadas mayoritariamente en la región cortical de linfadenopatías de pacientes con LLC sugiriendo de manera indirecta una asociación con la extravasación.

Secciones de tejidos de linfadenopatías de tres pacientes de LLC se tiñeron con TUNEL, para la ubicación de células apoptóticas en relación a las HEV se realizó la tinción de PNAd. El análisis de las preparaciones a pocos aumentos del microscopio (20X) nos permitió comprobar en los tres casos de linfadenopatías estudiados una acumulación de células apoptóticas dentro de un área de 200 μm bajo la cápsula (Figura 33A, izquierda) los cuales en su mayoría expresaban CD19 (Figura 33A, derecha). Debido a que la arquitectura del GL normal está profundamente afectada en linfadenopatías de pacientes de LLC, nos referimos a estas áreas de concentración de células apoptóticas como regiones exteriores en lugar de llamarlas regiones corticales y llamaremos regiones interiores a las áreas más profundas dentro del parénquima de la linfadenopatía.

Observamos que las células apoptóticas parecían estar más cerca de las HEV en la región exterior (Figura 33B, izquierda) que en la interior (Figura 33B, derecha), sugiriendo de manera indirecta una asociación con la extravasación. Después de la extravasación los linfocitos son retenidos por horas dentro de un área $< 20 \mu\text{m}$ alrededor de las HEV de la región cortical del GL antes de infiltrar el parénquima (Muller y Luscinskas 2008), una característica que podría correlacionarse con la acumulación de las células apoptóticas alrededor de ellas.

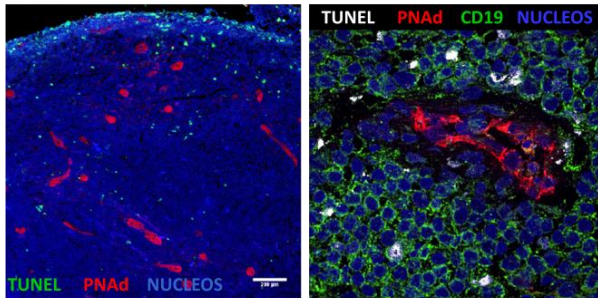
Tras el recuento de células LLC apoptóticas, ciertamente pudimos comprobar que el número de núcleos apoptóticos dentro de un área $\leq 20 \mu\text{m}$ alrededor de las HEV fue significativamente más alto en la región externa que en la interna en las 3 LA estudiadas (Figura 33C), sugiriendo que podrían representar una extravasación reciente de las células leucémicas.

b) EphrinA4 soluble está marcadamente unida a través de EphA2 a las vénulas de endotelio alto (HEVs) de linfadenopatías.

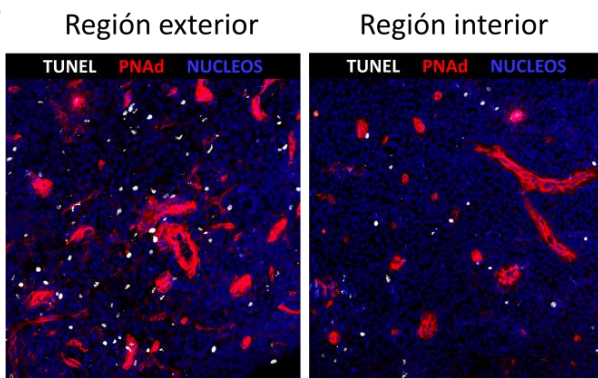
Para estudiar el papel de ephrinA4 y la posible asociación con la apoptosis encontrada en ambas regiones del GL, realizamos tinciones con anticuerpos α -PNAd para identificar las HEV, α -EphA2 y α -ephrinA4 en los 3 casos de LA estudiados. Las

imágenes de microscopía mostraron que la expresión de ephrinA4 no solo se encontró en las células LLC infiltradas, además, se observó dentro de las HEV unida a EphA2 en las células endoteliales (Figura 34A).

A



B



C

■ $\geq 20 \mu\text{m}$ a la HEV más cercana
 ■ $< 20 \mu\text{m}$ a la HEV más cercana

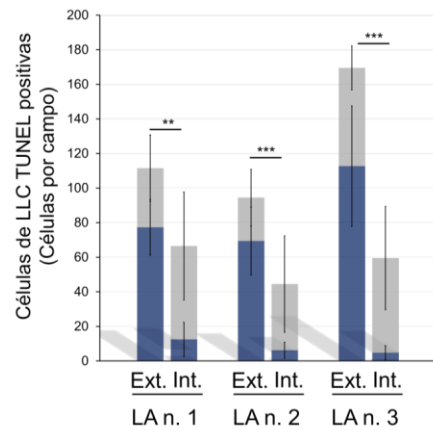


Figura 33. Células LLC apoptóticas fueron observadas mayoritariamente en la región cortical de linfadenopatías de pacientes con LLC sugiriendo de manera indirecta una asociación con la extravasación.

A-B) Secciones de $7\mu\text{m}$ de grosor de linfadenopatías de pacientes con LLC (LA n. 1,2 y 3 correspondientes a los pacientes n.3, 18 y 28 respectivamente del Anexo 1, tabla 1) fueron teñidas con TUNEL y anticuerpos contra PNAAd (rojo) o CD19 (verde) y *Hoechst* (azul, núcleos). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal (TCS SP-2 AOBS, Leica). A) Izquierda: imagen representativa tomada a bajo aumento (20X) muestra en la zona superior (región cortical) mayor número de células LLC teñidas con TUNEL (verde). Derecha: imagen representativa (63X) con un gran número de células positivas para CD19 (verde), en blanco las células LLC positivas a la tinción con TUNEL. B) imágenes tomadas a 20X; Izquierda: área cerca de la capsula (región exterior). Derecha: área más adentro ($>200\mu\text{m}$ lejos de la capsula (región interior). C) Frecuencia del número de núcleos apoptóticos alrededor ($<20\mu\text{m}$, azul) o separadas a ($\geq 20\mu\text{m}$, gris) de las vénulas de endotelio alto (HEV) en las regiones exterior (Ext.) e interior (Int.). Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; n.s. no significativa.

Tras analizar el porcentaje de expresión de ephrinA4 unida a EphA2 en las HEV (Figura 34B), tanto en la región exterior como interior de los GL, los resultados mostraron una frecuencia significativamente mayor en la región interior (Figura 34C) en los tres casos estudiados, siguiendo así una distribución completamente opuesta a la observada por las células LLC apoptóticas. Por lo tanto estos datos en conjunto apoyan que en procesos *in vivo* ephrinA4 soluble puede jugar un papel en la viabilidad de las células LLC promoviendo la supervivencia relacionada con la extravasación de las células LLC en las linfadenopatías.

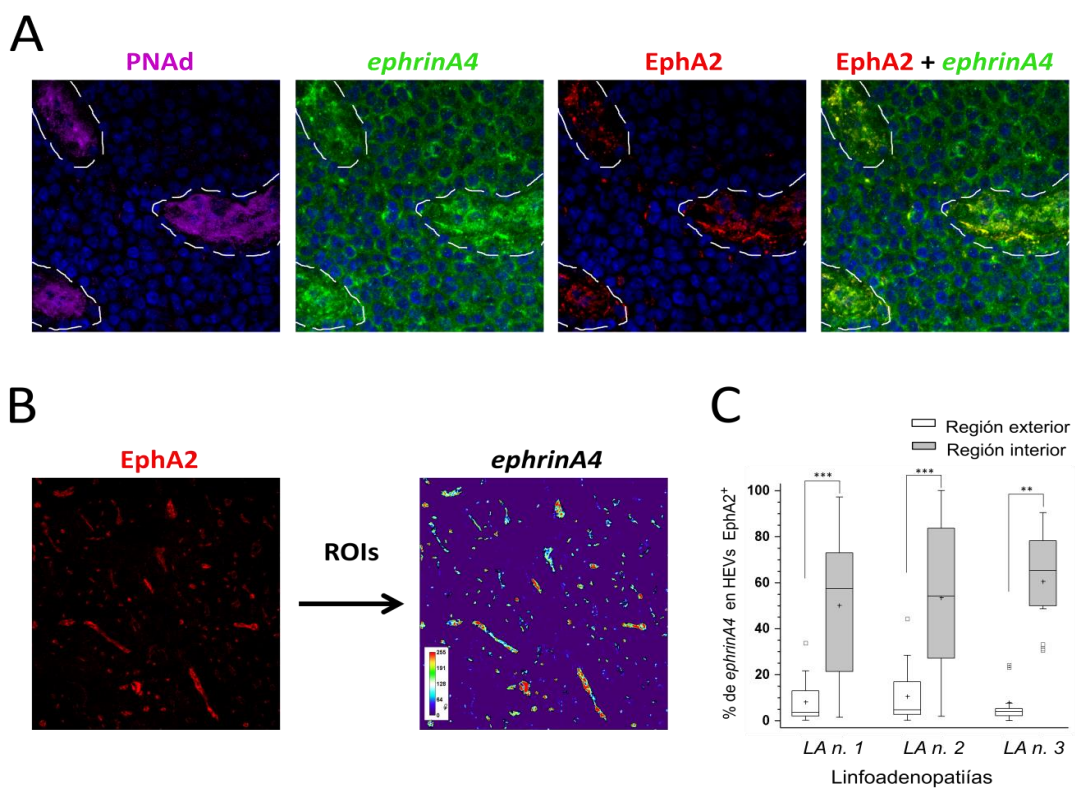


Figura 34. ephrinA4 soluble está altamente unida a las vénulas de endotelio alto (HEVs) a través de EphA2 en linfadenopatías.

A-B) Secciones de 7 μ m de grosor de linfadenopatías de pacientes con LLC (LA n. 1,2 y 3 correspondientes a los pacientes n.3, 18 y 28 respectivamente del Anexo 1, tabla 1). A) Las secciones fueron procesadas para inmunodetección de PNA (magenta), ephrinA4 (verde), EphA2 (rojo) o *Hoechst* (azul, núcleos). La línea blanca punteada delimita las HEV. Se observa una expresión de ephrinA4 co-localizando con EphA2 en las HEV. B) Las regiones de interés (ROIs) entorno a las HEVs fueron trazadas de acuerdo a la tinción con EphA2 (izquierda). Se midió la intensidad de la expresión de ephrinA4 dentro de ROIs (derecha). Las HEVs que contenían $\geq 10\%$ de *pixeles* por encima de 200 en la escala de grises (derecha, escala de color insertada) fueron consideradas como positiva. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal (TCS SP-2 AOBS, Leica) (63X). C) *Whisper-box plots* muestran el porcentaje de HEVs EphA2⁺ expresando ephrinA4 en las regiones exterior e interior de las 3 linfadenopatías estudiadas. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* no pareada de dos colas. * $P < 0.01$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

c) ephrinA4 soluble incrementa la infiltración y la viabilidad de las células LLC transferidas a ratones tras infiltrar los ganglio linfático (GL) en los casos LApos.

Después de haber estudiado de manera indirecta en secciones de adenopatías la viabilidad de las células LLC en la extravasación y observar la implicación de ephrinA4 soluble, estudiamos estos aspectos *in vivo* como previamente se había descrito (Hartmann y cols. 2009). Para ello, ratones inmunodeficientes los ratones Balbc fueron inoculados con células LLC previamente teñidas con CFSE de pacientes con LApos y LANeg. Además se les inyectaron diferentes cantidades de ephrinA4 previamente purificada del plasma de pacientes. Después de 24 horas de haber sido inoculados se obtuvieron suspensiones celulares del GL poplíteo de los ratones, donde el número de linfocitos endógenos del ratón es considerablemente más bajo que la de otros GL, se estudió el porcentaje de células infiltradas y la viabilidad de las células LLC fue analizada por citometría de flujo (Figura 35).

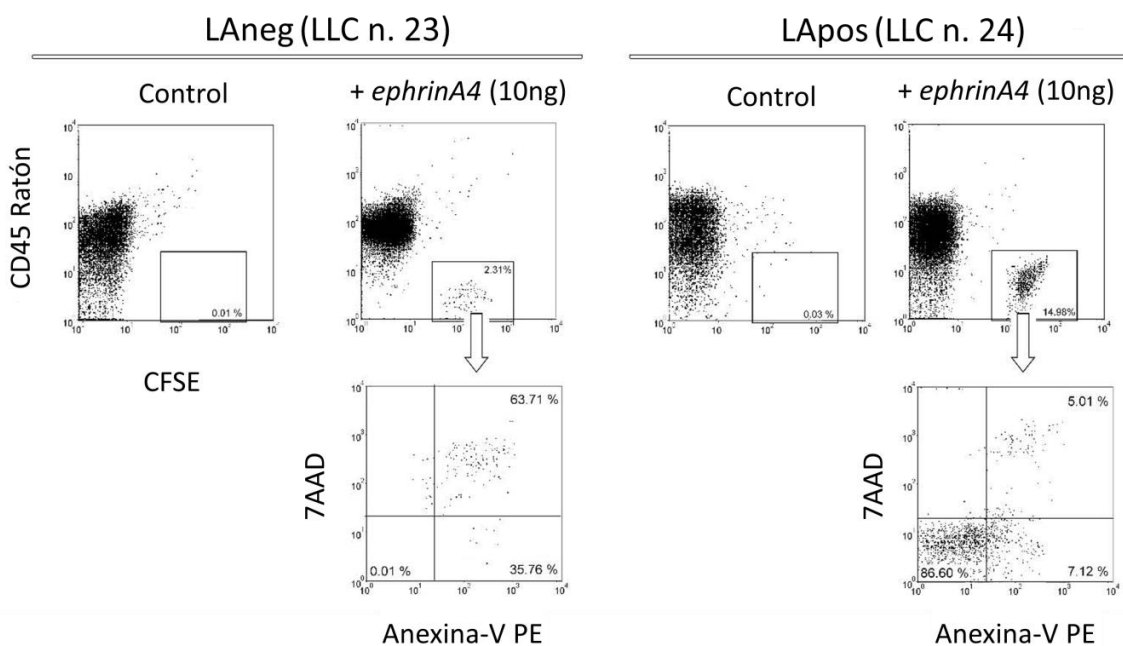


Figura 35. Análisis por citometría de flujo de células LLC humanas en ganglios linfáticos (GL) poplíteos de ratón.

Las suspensiones celulares obtenidas de los GL poplíteos removidos quirúrgicamente de los ratones inoculados fueron teñidas con anticuerpo conjugado a APC contra el antígeno CD45 de ratón (α -mCD45), Anexina-V PE y 7-AAD. Posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo. Las células LLC humanas fueron identificadas de acuerdo a la población CFSE⁺ y mCD45⁻ (*plots* superiores). El marcaje de Anexina-V PE/7-AAD fue analizada acotando la población de células LLC humanas (*plots* inferiores) en ambas condiciones clínicas estudiadas LANeg (izquierda) y LApos (derecha).

El análisis mediante citometría mostró que ephrinA4 produce un aumento dosis dependiente tanto en la proporción de células LLC infiltradas en el GL (Figura 36A, barras) como en la supervivencia (Figura 36A, líneas) de las células LLC humanas recuperadas de los GL de los ratones inoculados con muestras de LApos, sin embargo en el caso de las LANeg aunque si se observó una proporción dosis dependiente de ephrinA4 de células infiltradas (Figura 36B, barras) esta fue a una magnitud considerablemente menor que LApos, por otra parte tras analizar la viabilidad de las LANeg no se observaron efectos de supervivencia (Figura 36B, líneas).

Por lo tanto estos datos confirman nuestros resultados antes descritos, de tal manera que podemos decir que nuestro modelo de estudio *in vitro* es equivalente a lo observado en los ensayos *in vivo*.

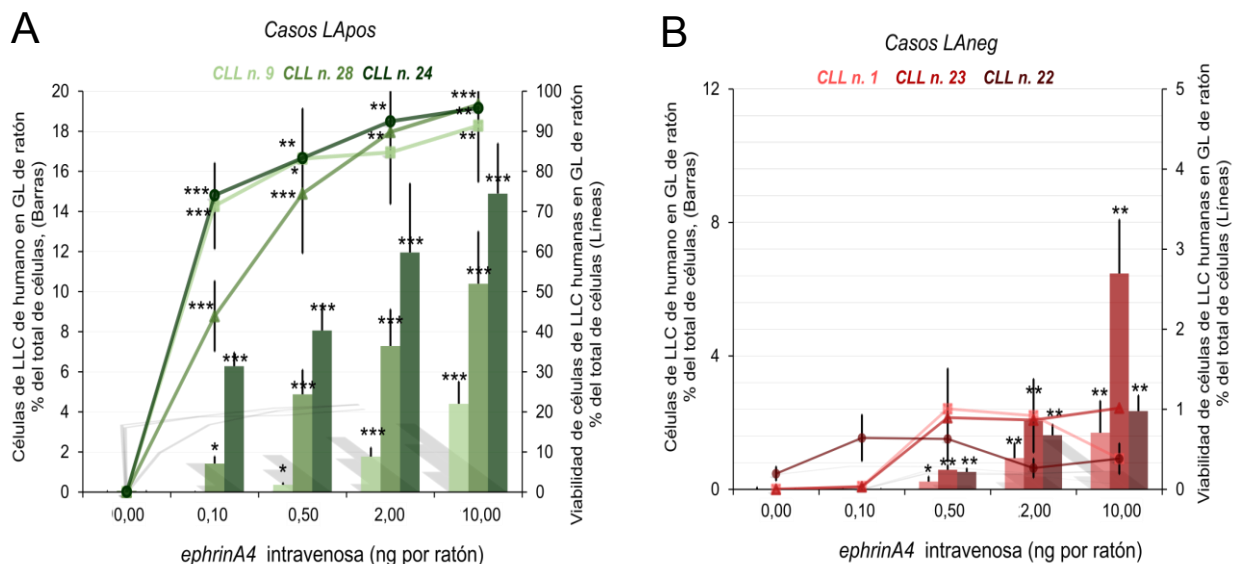


Figura 36. ephrinA4 soluble incrementa la infiltración y la viabilidad de las células LLC transferidas a ratones tras infiltrar los ganglio linfático (GL) en los casos LApos.

Estudio *in vivo* en Ratones Balbc los cuales fueron inoculados a través de la vena de la cola con LLC (20×10^6 células/ratón) previamente teñidas con CFSE ($5 \mu\text{M}$) conteniendo o no (control, 0,00 ng) diferentes concentraciones crecientes (0,10, 0,50, 2,00 y 10,00 ng /ratón) de ephrinA4 humana purificada de plasmas de pacientes. Los números absolutos (barras) y La viabilidad (líneas) de células LLC infiltradas a los GL fueron analizadas por citometría de flujo de la manera descrita anteriormente (Fig. 35) en suspensiones celulares obtenidas de los GL poplíteos removidos quirúrgicamente 24 horas después de la inoculación. Los datos fueron comparados con células LLC inyectadas en PBS1X carente de ephrinA4 soluble (0,00 ng, control). A) LApos muestran un aumento dosis dependiente en la infiltración (barras) y viabilidad (líneas) en los 3 casos analizados. B) LANeg presenta un aumento dosis dependiente en la infiltración pero no así en la viabilidad de las células LLC. 5 animales fueron usados por cada muestra y condición experimental. La significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

2. Estudio de la diseminación de las células LLC a través de endotelios linfáticos.

Para esta segunda y tercera parte de la presente tesis doctoral estudiamos 15 muestras de pacientes con LLC (Anexo 1, tabla 2) y 2 muestras de linfocitos B procedentes de donantes sanos. Se utilizaron para los experimentos señalados en cada apartado de resultados.

La mayoría de los estudios de TEM de las células LLC y linfocitos B han sido realizados a través de endotelios sanguíneos (HUVEC), pero poco se sabe del papel que juegan los endotelios linfáticos en la infiltración de las células leucémicas a los ganglios linfáticos. Para abordar este aspecto y estudiar el posible papel que pudieran jugar los endotelios linfáticos en la diseminación de la enfermedad a través de la linfa, utilizamos el mismo modelo *in vitro*, de modo similar al modelo clásicamente empleado para analizar procesos de migración trans-endotelial de linfocitos en endotelios vasculares sanguíneo. Para ello utilizamos células endoteliales linfáticas humanas HDLEC (*Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells*).

2.1 Las células LLC muestran una mayor capacidad de migración a través de HDLEC comparadas con HUVEC.

Como una primera aproximación estudiamos la capacidad de migración de las células LLC a través de endotelios linfáticos (HDLEC) y la comparamos con endotelios sanguíneos (HUVEC) mediante ensayos TEM sobre monocapas endoteliales previamente estimuladas con TNF- α . Los resultados mostraron en todas las muestras analizadas un mayor índice de migración a través de HDLEC comparadas con HUVEC (Figura 37).

Tras observar estos resultados pensamos que las moléculas de adhesión celular (CAMs) como ICAM-1 y VCAM-1 podrían jugar un papel determinante en estas diferencias entre endotelios. Para estudiar este aspecto células HDLEC y HUVEC fueron sembradas hasta alcanzar la confluencia y posteriormente estimuladas y no con distintas concentraciones de TNF- α . Las expresiones de ICAM-1 y VCAM-1 fueron analizadas por citometría de flujo (Figura 38A) y microscopía de fluorescencia (Figura 38B). Los resultados mostraron un incremento dosis dependiente de TNF- α en la expresión de ambas moléculas (ICAM-1 y VCAM-1) tanto en HDLEC como en HUVEC,

pero con claras diferencias en la expresión entre ambos tipos de endotelios, observando que HDLEC presenta una mayor expresión de ICAM-1 pero una menor expresión de VCAM-1 comparada con HUVEC (Figura 38A). Estudios por microscopía de fluorescencia confirmaron las expresiones observadas por citometría de flujo, comprobando un incremento en la expresión de ambas moléculas y en ambos endotelios tras el estímulo con TNF- α (Figura 38B), observando la mayor expresión de ICAM-1 (Figura 38B panel izquierdo) en los endotelios linfáticos (HDLEC) y la mayor expresión de VCAM-1 (Figura 38B panel derecho) en los endotelios sanguíneos (HUVEC).

Estos resultados en conjunto muestran que las células LLC tienen capacidad para migrar a través de endotelios linfáticos y que las diferencias en los índices de migración entre ambos tipos de endotelio pueden ser debidas en parte a las diferencias de expresión de ICAM-1 y VCAM-1.

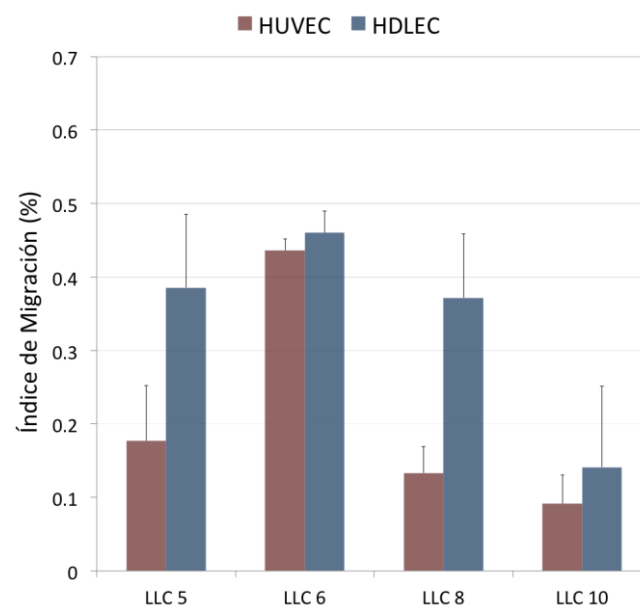


Figura 37. Ensayos de TEM a través de endotelios sanguíneos (HUVEC) y linfáticos (HDLEC).

Células HUVEC y HDLEC fueron sembradas a confluencia sobre filtros de las placas *transwell* de 96 pocillos y estimuladas con 10 ng/mL de TNF- α . Las células LLC fueron colocadas para su migración y después de 4 horas de cultivo se realizó el recuento de células LLC por citometría de flujo y se determinaron los índices de migración. Se observa una mayor migración a través de HDLEC (azul) comparadas con HUVEC (rojo). Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

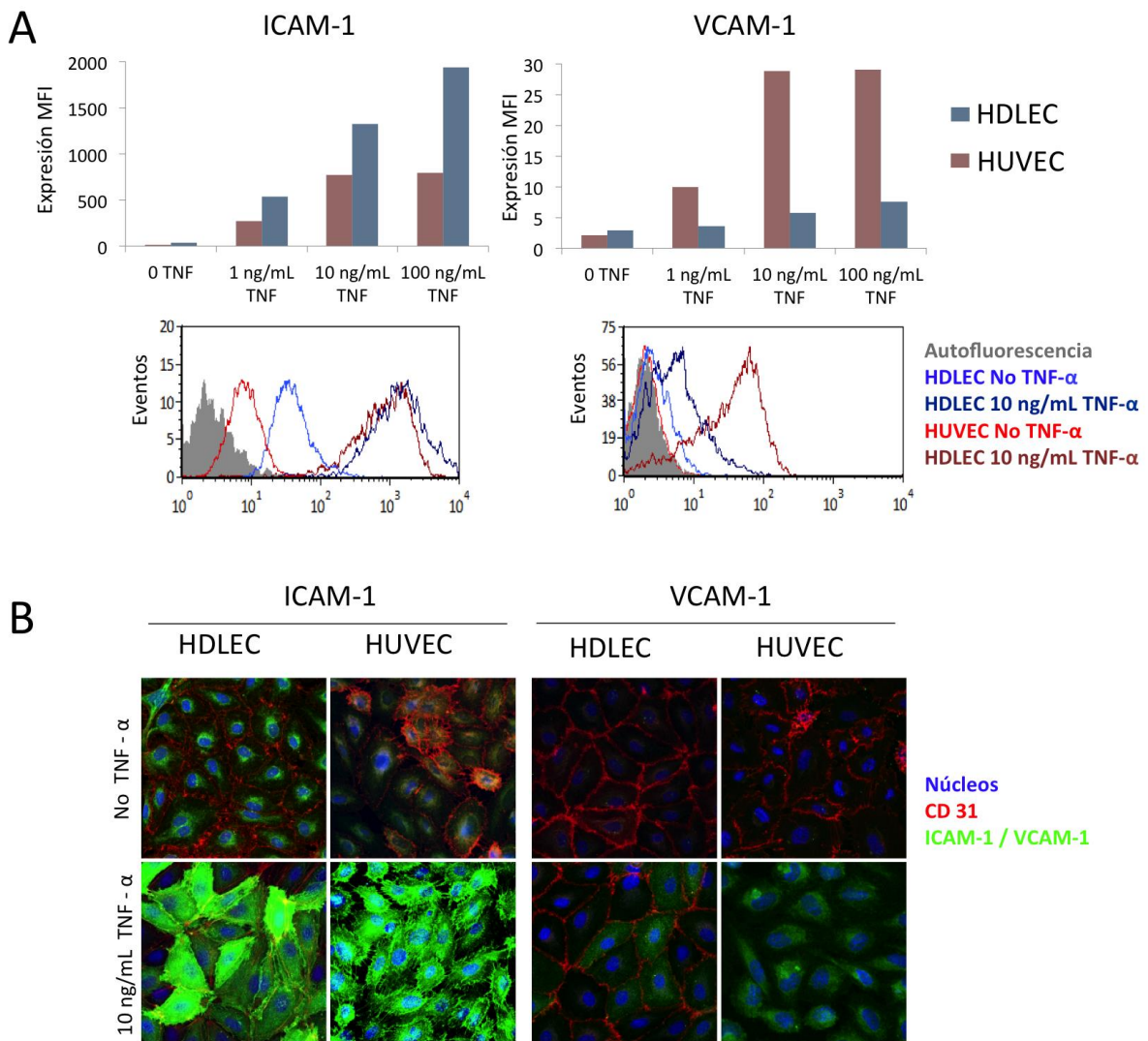


Figura 38. Los endotelios sanguíneos (HUVEC) y linfáticos (HDLEC) presentan diferentes niveles de expresión de las Moléculas de Adhesión celular (CAMs), ICAM-1 y VCAM-1.

A) Células HUVEC y HDLEC fueron sembradas a confluencia en flask de 75cm² y estimuladas y no con distintas concentraciones de TNF-α (0, 1, 10 y 100 ng/mL). Tras 4 horas de estímulo las células se recuperaron y se marcaron con anticuerpos anti-ICAM1 y anti-VCAM1 unidos a fluorocromos. El análisis de la expresión de por citometría de flujo mostró una mayor expresión de ICAM-1 en HDLEC (azul) pero menor expresión de VCAM-1 comparada con HUVEC (rojo). Los histogramas son representativos de la concentración de 10 ng/mL. B) Comprobación de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 por microscopía. Células HUVEC y HDLEC fueron sembradas a confluencia en portaobjetos multipocillos *shamber slide* y estimuladas y no con 10 ng/mL de TNF-α. Posteriormente se marcaron con anticuerpos unidos a fluorocromos anti-ICAM1 (panel izquierdo) y anti-VCAM1 (panel derecho) ambos en verde, anti-CD31 (rojo) y los núcleos fueron teñidos con *Hoechst* (Azul), comprobando las diferencias de expresión vistas por citometría de flujo. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 40X.

2.2 Las células LLC no responden a procesos quimiotácticos de CCL19 y CXCL12 a través de endotelios linfáticos activados con TNF- α (HDLEC-TNF), pero parecen quedar retenidas adheridas al endotelio.

Tras observar la capacidad TEM de las células LLC a través de HDLEC quisimos estudiar su respuesta a procesos quimiotácticos y compararla con linfocitos B sanos. Para ello realizamos ensayos de TEM a través de monocapas de endotelio linfático estimuladas con 10 ng/mL de TNF- α (HDLEC- TNF- α) en respuesta CCL19 y CXCL12 con linfocitos B de donantes sanos (LBP) y células leucémicas de pacientes de LLC. 100 ng/mL de CCL19 y CXCL12 de manera independiente fueron colocados en el pocillo inferior de la placa *transwell*. Tras comparar los índices de migración en respuesta CCL19 y CXCL12 respecto al control (no quimioquina) observamos que las células LLC presentaron una menor respuesta frente a ambas quimiocinas, observando índices de migración por debajo del control, mientras que los linfocitos B (LBP) si parecen responder, observando un índice de migración por encima del control (Figura 39, izquierda).

Para estudiar el efecto independiente del endotelio realizamos ensayos de migración de la misma manera descrita anteriormente pero en ausencia de endotelio (No Endotelio). Los resultados mostraron que tanto los linfocitos B como las células leucémicas responden al estímulo quimiotáctico tanto de CCL19 como de CXCL12 (Figura 39, derecha). Por tanto el bloqueo en la trans-migración en respuesta a CCL19 y CXCL12 observado en las células LLC pero no en los LBP en los ensayos TEM es provocado por el endotelio linfático inflamado (HDLEC-TNF- α), sugiriendo una posible retención en procesos quimiotácticos.

Cuando comparamos la trans-migración de las células leucémicas y los linfocitos B sanos en ausencia de quimiocinas, pudimos comprobar claramente que los índices de migración de las células LLC en todos los casos estudiados en comparación con los LBP eran menores (Figura 40). Estos resultados fueron corroborados por microscopía confocal mediante ensayos de co-cultivos en monocapas HDLEC-TNF- α con LBP y/o células LLC. Tras dos horas de cultivo pudimos comprobar que las células LLC son capaces de adherirse a los endotelios linfáticos (HDLEC-TNF- α), encontrando un gran número de células pegadas a la monocapa. Sin embargo, al compararlas con

los LBP mediante una reconstrucción 3D (Figura 41), pudimos observar que en los LBP existía un gran número de células envueltas por ICAM-1, indicando una marcada migración, mientras que la mayoría de las células LLC parecían estar solo adheridas sobre la monocapa sin llegar a estar del todo envueltas por ICAM-1 (Figura 41). Esto podría sugerir que las células LLC no presentan defecto en la adhesión a los endotelios linfáticos pero si en la capacidad de trans-migración en respuesta a quimiocinas a través de este tipo de endotelios en comparación con los linfocitos B sanos. Por tanto esto podría sugerir una retención de las células leucémicas en los vasos linfáticos.

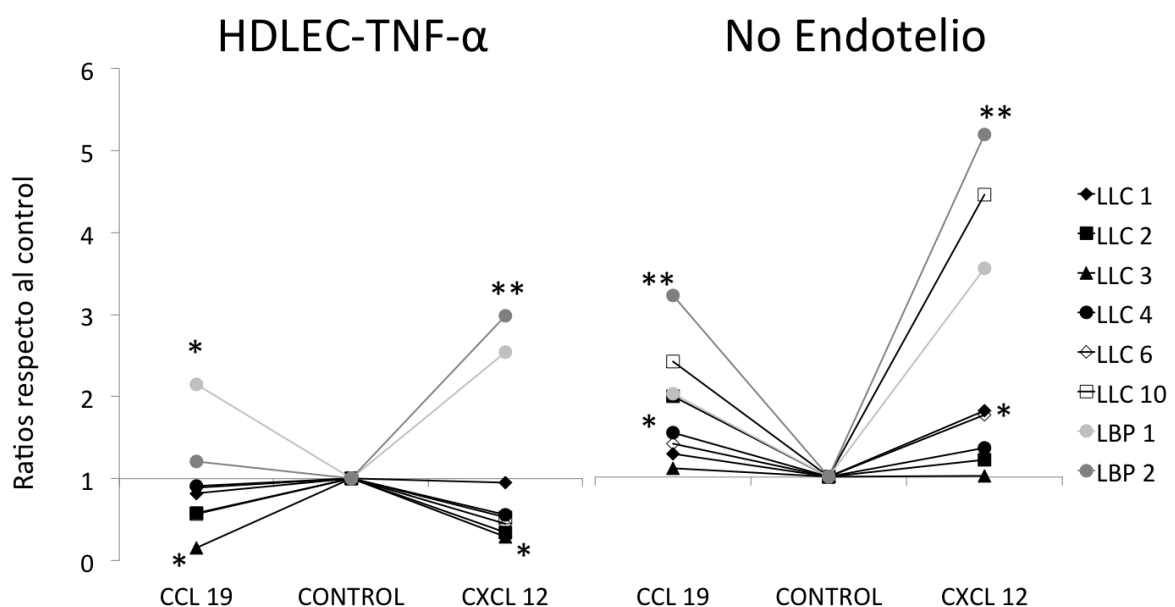


Figura 39. Las células LLC a diferencia de los linfocitos B sanos no responden a la quimiotaxis en respuesta a CCL19 y CXCL12 a través de endotelios linfáticos inflamados (HDLEC-TNF-α).

Células leucémicas (LLC) y linfocitos B sanos (LBP) fueron colocadas para su migración a través de monocapas HDLEC previamente estimuladas con TNF-α (Izquierda) y sobre filtros (derecha, No Endotelio) de la placa *transwell*. 100 ng/mL de CCL19 y CXCL 12 fueron colocados en el pocillo inferior de manera independiente. Después de 4 horas de cultivo se realizó el recuento por citometría de flujo de las células trans-migadas para determinar los índices de migración. Se observó una respuesta a la quimiotaxis a través de filtros (derecha) pero no a través de HDLEC-TNF (izquierda) El gráfico muestra los ratios referidos al control (No quimiocinas). Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

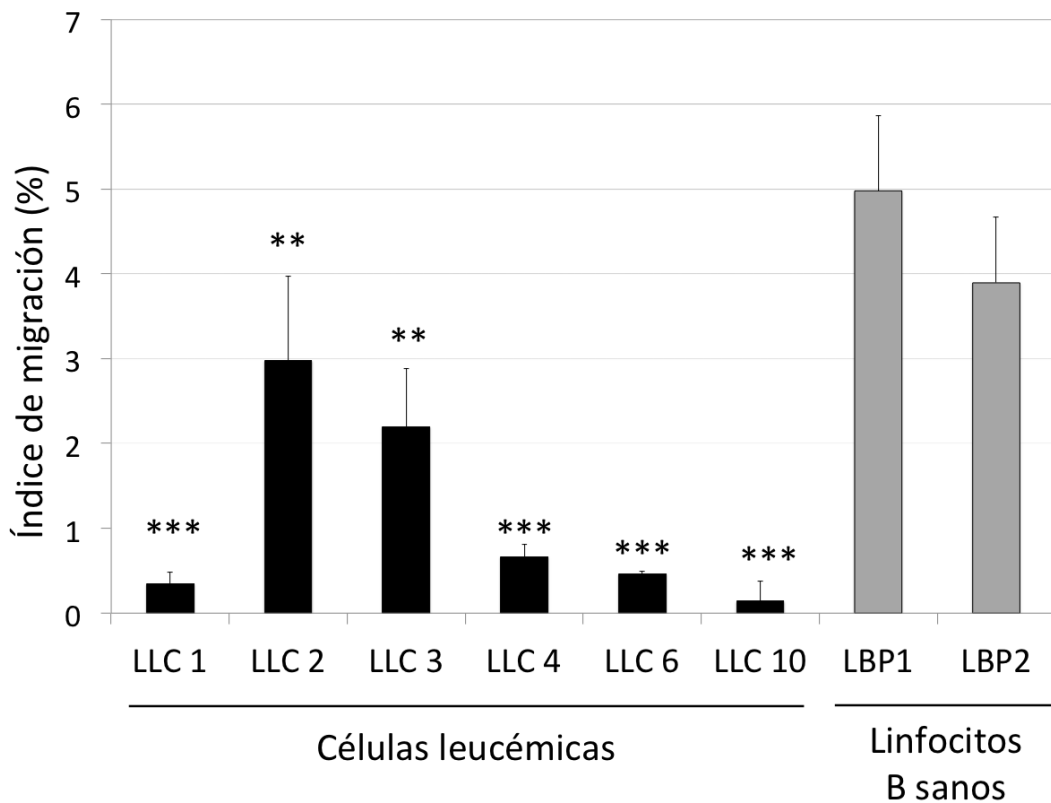


Figura 40. Las células LLC presentan una menor migración en comparación con los linfocitos B sanos a través de endotelios linfáticos inflamados (HDLEC-TNF- α).

Células leucémicas (LLC) y linfocitos B sanos (LBP) fueron colocadas para su migración a través de monocapas de HDLEC previamente estimuladas con TNF- α . Después de 4 horas de cultivo se realizó el recuento por citometría de flujo de las células trans-migradas para determinar los índices de migración observando en todas las muestras de LLC una disminución en la migración comparadas con los linfocitos B sano. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

Para indagar en este aspecto realizamos estudios por microscopía de fluorescencia en secciones de linfadenopatías de pacientes con LLC y ganglios reactivos “sanos” utilizando el marcador molecular Lyve1 para identificar los endotelios linfáticos. Observamos un gran número de células leucémicas acumuladas dentro de los vasos linfáticos en las linfadenopatías de los pacientes (Figura 41), a diferencia de los ganglios reactivos analizados donde no se observaron linfocitos B acumulados en dichos vasos (no mostrado). Sugiriendo como lo habíamos mencionado con anterioridad que las células leucémicas pueden quedar retenidas, adheridas en la parte luminal de la célula endotelial linfática dentro de los ganglios linfáticos infiltrados de pacientes con linfadenopatías.

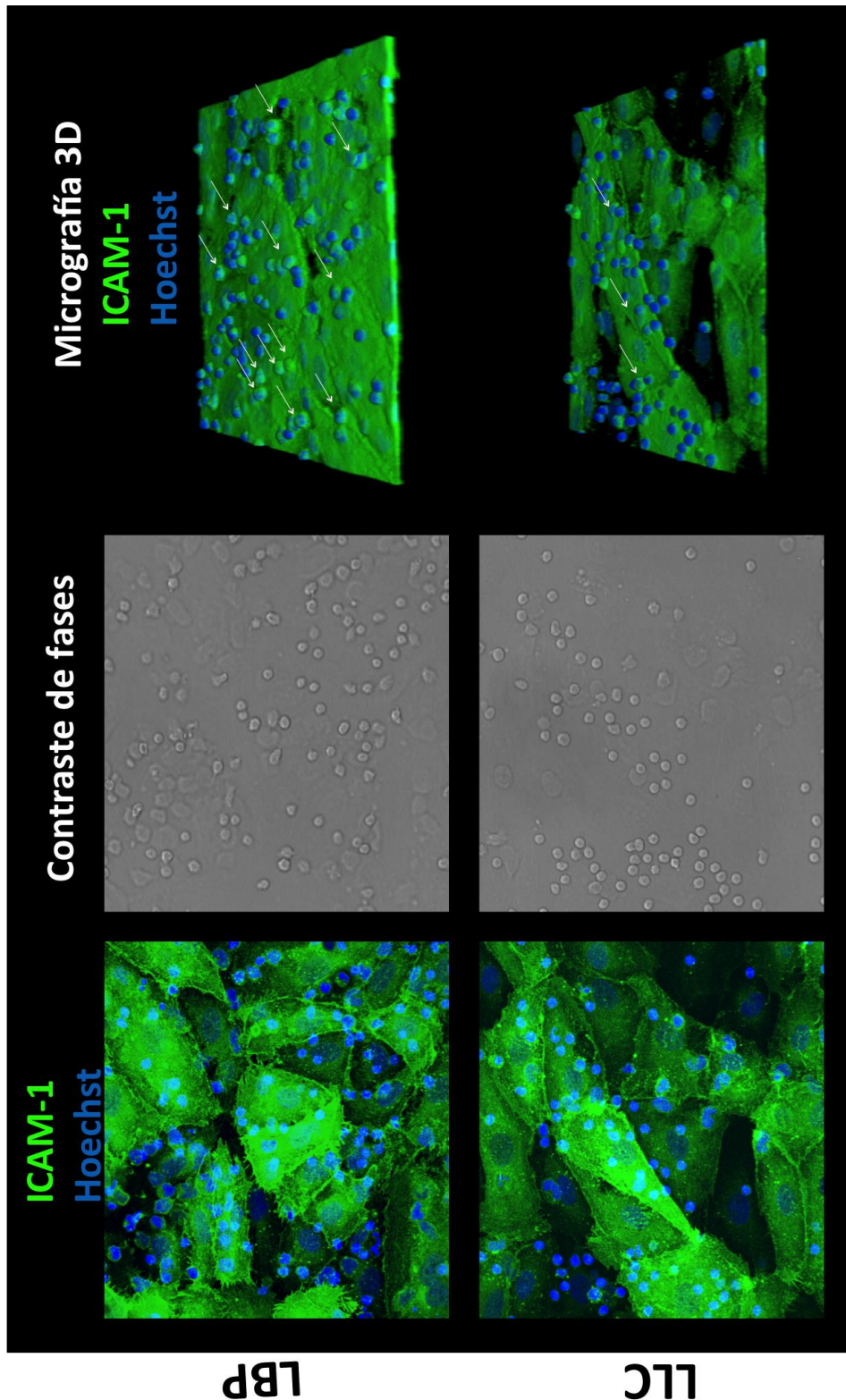


Figura 41. Co-cultivos de LBP y LLC sobre monocapas HDLEC-TNF- α .

Ensayos de co-cultivos de LBP (panel superior) y células LLC (panel inferior) sobre monocapas HDLEC pre-estimuladas con 10 ng/mL de TNF- α durante 12 horas, cultivadas en portaobjetos multipocillo *shamber slide*. Tras dos horas de incubación fueron fijadas con paraformaldehído y posteriormente teñidas con anti-ICAM-1 (verde) y *Hoechst* para los núcleos (azul), además se muestran las micrografías de contraste de fases y 3D. Las flechas blancas indican los LBP o LLC migrando a través de la monocapa. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal Leica a 40X de inmersión en aceite.

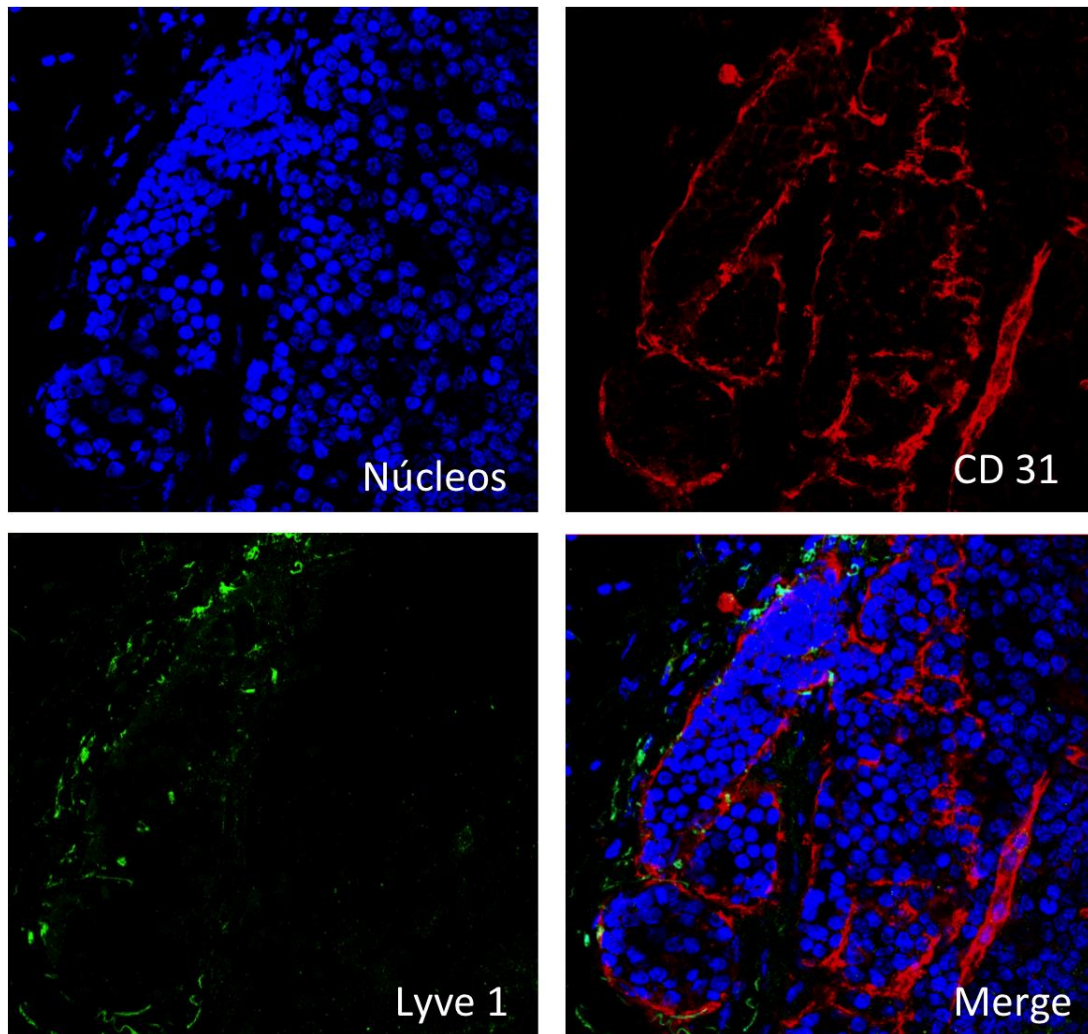


Figura 42. Las células LLC parecen quedar retenidas en los endotelios linfáticos de los GL de los pacientes con linfadenopatías.

Secciones de biopsias de linfadenopatía de paciente con LLC fueron teñidas con anticuerpos frente a endotelios (CD31, rojo), endotelios linfáticos (LYVE-1, verde) y Hoechst para los núcleos (azul). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio laser confocal (Leica) con un objetivo 40x de inmersión en aceite. Las imágenes muestran un gran numero de células LLC dentro de los vasos linfaticos

2.3 Las células LLC de pacientes LApos presentan una menor capacidad de trans migración que los casos LANeg, mientras que ambas condiciones de LA parecen recibir señales de supervivencia después de la diapédesis a través de endotelios linfáticos (HDLEC-TNF- α).

Siguiendo con nuestro estudio de diseminación a través de endotelios linfáticos y tras observar la posible retención, quisimos estudiar la viabilidad de las células leucémicas en este tipo de endotelios de la misma manera en que realizamos los ensayos con endotelios sanguíneos (HUVEC). Además agregamos a este estudio la

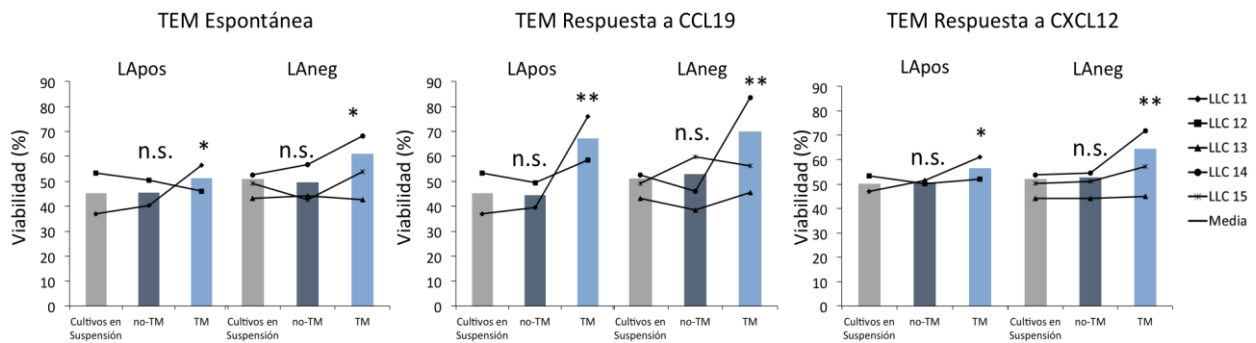
viabilidad en respuesta a las quimiocinas CCL19 y CXCL12. Para estos ensayos utilizamos dos muestras con linfadenopatía (LApos) y tres muestras sin presencia de linfadenopatía (LANeg). Los ensayos TEM se realizaron sobre monocapas de HDLEC pre estimuladas con TNF- α en presencia y ausencia de CCL19 y CXCL12 colocadas de manera independiente en el pocillo inferior. Tras 12 horas de cultivo se determinó la viabilidad por citometría de flujo tanto en la fracción trans-migrada (TM) como en la no trans-migrada (No-TM). Los resultados mostraron que en la TEM espontánea (no quimiocinas) en ambos casos de LA que la fracción TM presentó una mayor supervivencia respecto a los cultivos en suspensión (control), pero no así en las No-TM, (Figura 43A, izquierda). Los mismos efectos se observan en respuesta a CCL19 (Figura 43A, centro) y CXCL12 (Figura 43A, derecha). Tras analizar los índices de migración observamos que los casos LANeg presentan una mayor capacidad de migración que los casos LApos (Figura 43B), sugiriendo la probable retención de estas células en los ganglios linfáticos de pacientes con linfadenopatías como señalábamos en el apartado 2.2.

Además pudimos observar que ambas condiciones clínicas de LA responden a CCL19 y CXCL12, observando un mayor índice de migración respecto a la ausencia de quimioquina (espontánea). Estos datos son contrarios a los observados anteriormente en los ensayos TEM a 4 horas de cultivo (Figura 39). Por tanto podemos pensar que la respuesta quimiotáctica a CCL19 y CXCL12 a través de endotelios linfáticos a diferencia de los endotelios sanguíneos (HUVEC) requiere de un mayor tiempo para generar la respuesta, a debido en parte a la retención de las células leucémicas en la monocapa.

2.4 Los endotelios linfáticos expresan un gran número de receptores y ligandos de la familia Eph/ephrin, destacando la expresión de los receptores EphA2 y EphB4.

Una vez obtenidos los resultados anteriores en los ensayos TEM a través de HDLEC-TNF- α , pensamos que en este proceso podrían estar implicadas moléculas de la familia Eph/ephrin, como en el caso de la extravasación desde la sangre periférica, en la que previamente describimos el papel de la interacción EphA2-ephrinA4 en las células LLC con el endotelio HUVEC durante el proceso de TEM (Trinidad y cols. 2009).

A



B

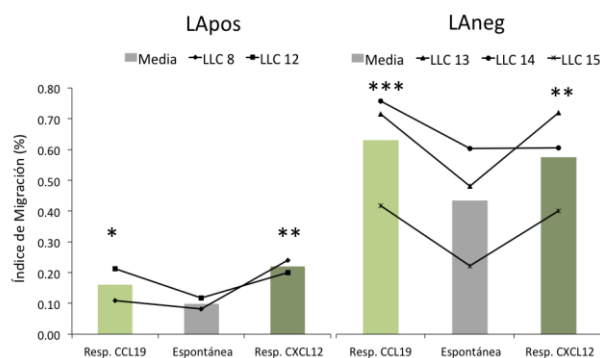


Figura 43. Las células LLC parecen recibir señales de supervivencia después de la diapédesis a través de endotelios linfáticos (HDLEC-TNF- α).

A) Células leucémicas (LLC) fueron usadas en ensayos TEM a través de monocapas de HDLEC previamente estimuladas con 10 ng/mL de TNF- α . 100 ng/mL de CCL19 y CXCL 12 fueron colocados en el pocillo inferior de manera independiente. Después de 12 horas de cultivo se determinó la viabilidad (Anexina V^{neg}/7AAD^{neg}) de la fracción trans-migrada (TM) y no trans-migrada (No-TM). Se observó un aumento en la viabilidad tanto en la migración espontánea como la respuesta a CCL19 y CXCL12. B) Los gráficos muestran los índices de migración aumentados en la respuesta a CCL19 y CXCL12 en los casos LApos pero marcadamente mayor en LANeg. Ambos determinados por citometría de flujo. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

Para ello, primero estudiamos la caracterización de la expresión de los miembros de la familia Eph/ephrin en las HDLEC. A través de cultivos celulares en los que células HDLEC fueron sembradas hasta lograr la confluencia formando una monocapa a fin de mimetizar in vitro la condición de endotelios linfáticos. Los cultivos de HDLEC fueron analizados en condiciones no inflamatorias (no- TNF- α) e inflamatorias (10 ng/mL TNF- α).

El análisis se realizó mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) (Figura 44A) en donde se determinó la cantidad relativa de ARNm. Tras analizar los resultados, observamos que el tratamiento con 10 ng/mL de TNF- α provocaba una disminución en la expresión de cada uno de los miembros al compararlos con las células no tratadas (Figura 44A), destacando la mayor expresión de los receptores EphA2 y EphB4.

El análisis mediante citometría de flujo (Figura 44 B) permitió validar a nivel proteico las variaciones de expresión encontradas a nivel de ARNm de la mayoría de los miembros analizados. Observamos que a nivel proteico de la expresión de membrana, estos receptores y ligandos también disminuyen la expresión con tratamiento de TNF- α (Figura 44 B), confirmando lo observado en el ARNm (Figura 44A). De igual manera, se destaca la expresión del receptor EphA2 previamente estudiado por nuestro laboratorio en endotelios sanguíneos y el alto nivel de expresión del receptor EphB4.

Tras detectar la alta expresión del receptor EphB4, analizamos la expresión de sus ligandos de la familia de ephrinB en las células LLC. Los estudios por citometría de flujo no detectaron la expresión de ephrinB1 ni de ephrinB3 pero si se pudo observar la expresión de ephrinB2 ligando principal de receptor EphB4. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los casos LApos y LANeg (Figura 44C).

2.5 La ausencia de la interacción EphA2/ephrinA4 y la señal *reverse* a través de ephrinB2 provee de señales de supervivencia a las células LLC durante la TEM a través de endotelios linfáticos (HDLEC-TNF- α).

Una vez confirmada la expresión de los miembros de la familia de Eph/ephrin, estudiamos el posible papel de estas moléculas en la viabilidad y trans-migración de las células LLC a través de endotelios linfáticos (HDLEC), de la misma manera en que se estudiaron en los ensayos TEM a través de HUVEC. En este sentido estudiamos la interacción EphA2/ephrinA4 y añadimos al estudio la interacción EphB4/ephrinB2 debido a la alta expresión de este receptor en las células HDLEC así como también la respuesta quimiotáctica frente a CCL19 y CXCL12.

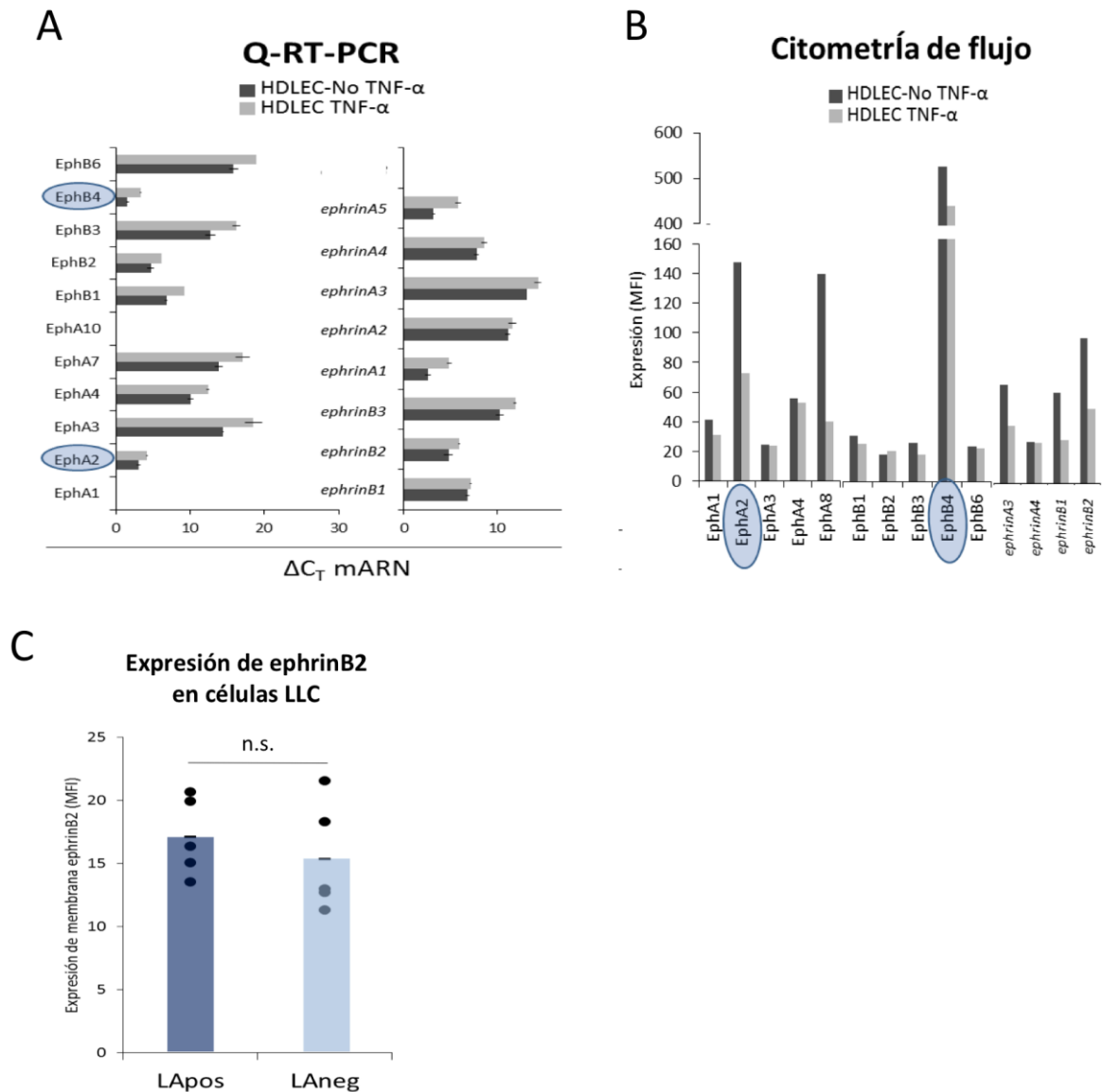


Figura 44. Los endotelios linfáticos expresan un gran número de receptores y ligandos de la familia Eph/ephrin, destacando la expresión de los receptores EphA2 y EphB4.

A-B) Células linfáticas (HDLEC) cultivadas fueron llevadas a confluencia, posteriormente fueron tratadas con y sin TNF- α durante 12 horas. A) estudio de la expresión mediante q-RT-PCR con y sin TNF- α (10 ng/mL), los gráficos muestran los ΔC_T utilizando β -Actina como control. Se resalta la mayor expresión de EphA2 y EphB4 (ovalo azul). B) Estudio de la expresión de membrana mediante citometría de flujo con y sin TNF- α (10 ng/mL), el gráfico muestran la intensidad media de fluorescencia (MFI), comprobando la alta expresión de EphA2 y EphB4 (ovalo azul). C) Estudio por citometría de flujo de la expresión de membrana de ephrinB2 en células LLC de pacientes con (LApos) y sin (LANeg) linfadenopatía. El gráfico muestra la expresión de ephrinB2 en intensidad media de fluorescencia sin cambios significativos en los niveles de expresión entre LApos y LANeg. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos

Para este fin realizamos ensayos TEM sobre monocapas HDLEC sembradas en parte superior del filtro de la placa *transwell* y estimuladas previamente con 10 ng/mL de TNF- α . El ensayo se realizó en ausencia de quimiocinas (espontánea) y en respuesta a CCL19 y CXCL12. Previo a los ensayos se aplicaron los tratamientos durante treinta minutos incubando la monocapa de células HDLEC de forma independiente con *ephrinA4*-Fc y/o *ephrinB2*-Fc mientras que las células LLC se incubaron con EphA2-Fc y/o EphB4-Fc. De esta manera, la interacción no tiene lugar durante el ensayo, mientras que las proteínas recombinantes unidas al tipo celular respectivo pueden, en algunos casos, mantener la señalización como se describe en el apartado de material y métodos (Figura 9).

Tras 12 horas de incubación y referir el porcentaje de viabilidad de las células tratadas respecto al control (HDLEC y/o células LLC sin tratamientos) observamos que el tratamiento con *ephrinA4*-Fc en los casos LApos contrario a lo observado a través de endotelios HUVEC anteriormente descritos, provocó una disminución en la viabilidad de la fracción No-TM incluso en presencia de quimiocinas, mientras que en la fracción TM los efectos quimiotácticos revierten la disminución de la viabilidad provocada por el tratamiento (Figura 45A), destacando el aumento de la supervivencia en respuesta a CXCL12. Por otro lado en los casos LANeg no se observaron efectos significativos (Figura 45A).

El tratamiento con *ephrinB2*-Fc en los casos LApos generó una disminución en la viabilidad en la fracción TM, mientras que en los casos LANeg la inhibición de la señal provocó un aumento en la viabilidad de la fracción No-TM, pero no así en las células TM donde se observó una disminución en la supervivencia (Figura 45 B). En ninguno de los dos casos clínicos de LA se observaron efectos en la viabilidad como consecuencia del estímulo quimiotáctico (Figura 45 B).

Por otro lado el bloqueo de las señales *reverse* a través del tratamiento con EphA2-Fc y EphB4-Fc mostraron que EphA2-Fc en los casos LApos provocó una disminución en la fracción No-TM y un marcado aumento en la viabilidad de las células LLC TM en respuesta a CXCL12 (Figura 45 C), al igual que el tratamiento con *ephrinA4*-Fc anteriormente descrito. En los casos LANeg no se observaron cambios significativos (Figura 45 C).

Con el tratamiento de EphB4-Fc en los casos LApos CXCL12 también revierte la apoptosis provocada por la ausencia de la señal en las células TM (Figura 45 D). En los casos LANeg ambas quimiocinas generan una mayor viabilidad junto con el tratamiento de EphB4-Fc en las células TM (Figura 45 D).

En conjunto estos resultados muestran que la inhibición de la interacción de la señal *forward* a través de EphA2 en el endotelio y la señal *reverse* a través de la ephrinA4 en las células LLC, proveen de señales de supervivencia mediante la señal generada por el receptor CXCR4. Mientras que la inhibición de la señal *reverse* generada por la interacción ephrinB2/EphB4 junto con la señal a través de CXCR4, proveen de señales de supervivencia a las células leucémicas durante la TEM a través de HDLEC-TNF- α .

Posteriormente estudiamos los efectos de estas interacciones en los índices de migración. En los casos LApos, los tratamientos con EphrinA4-Fc y EphA2-Fc provocaron un aumento en la migración (Figura 46A), observando los mismos efectos en respuesta a CCL19 pero en mayor magnitud. Sin embargo, frente a CXCL12 los tratamientos parecen impedir la migración de las células leucémicas (Figura 46A). Contrario a los casos LApos, en las muestras LANeg ambas señales disminuyen la migración tanto en ausencia de quimiocinas (TEM espontánea) como en respuesta a CXCL12, solo el tratamiento con EphA2-Fc frente a CCL19 parece generar una mayor migración (Figura 46A). Por tanto estos resultados muestran que las señales generadas por la interacción EphA2/ephrinA4 promueven una mayor migración a través de endotelios linfáticos inflamados en pacientes con linfadenopatías pero no así en pacientes que carecen de ellas. Mientras que las señales quimiotácticas provocadas a través del receptor CCR7 magnifican el efecto con el tratamiento de EphA2-Fc en ambos casos clínicos de LA, en tanto que la interacción con la señal a través de CXCR4 bloquean la migración.

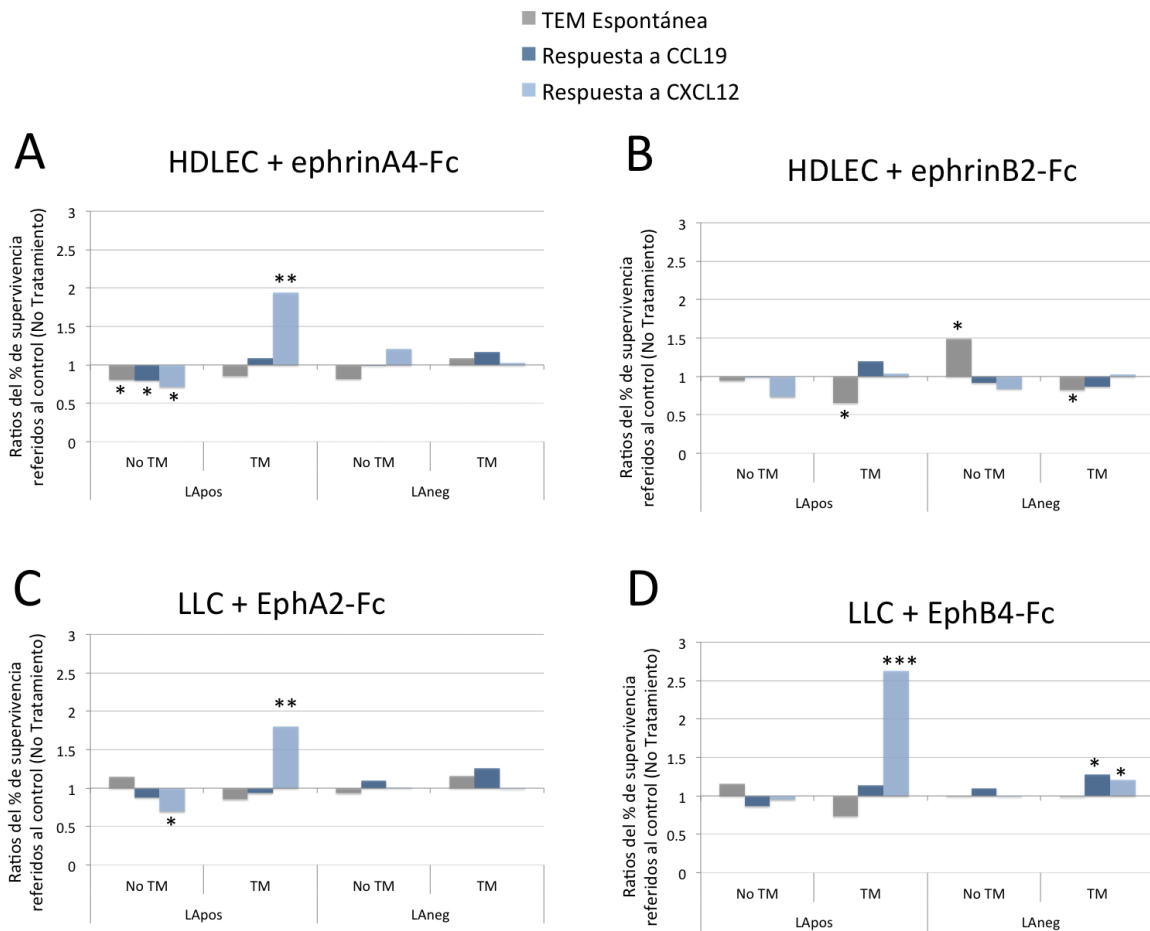


Figura 45. La ausencia de la interacción EphA2/ephrinA4 y la señal *reverse* a través de ephrinB2 provee de señales de supervivencia a las células LLC durante la TEM a través de endotelios linfáticos (HDLEC-TNF- α).

A-D) Células leucémicas (LLC) fueron colocadas para su migración a través de monocapas de HDLEC previamente estimuladas con 10 ng/mL de TNF- α . 100 ng/mL de CCL19 y CXCL 12 fueron colocados en el pocillo inferior de manera independiente. Los tratamientos de ephrinA4-Fc (A) y ephrinB2-Fc (B) fueron colocados a HDLEC, mientras que EphA2-Fc (C) y EphB4-Fc (D) fueron colocados a las células LLC. Después de 12 horas de cultivo se determinó la viabilidad (Anexina V^{neg}/7AAD^{neg}) de la fracción trans-migrada (TM) y no trans-migrada (No-TM). Los gráficos muestran los ratios del % de viabilidad referido al control (HDLEC/células LLC no tratadas). Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; La ausencia de * no presenta significancia.

Por otro lado los tratamientos con ephrinB2-Fc generan una mayor migración en ambas condiciones clínicas de LA, mientras que EphB4-Fc solo lo hace en los casos LApos (Figura 46B). En respuesta a CCL19 y CXCL12 los tratamientos con ephrinB2-Fc y EphB4-Fc no generaron cambios concluyentes observando un comportamiento muestra dependiente en ambas condiciones clínicas de LA (Figura 46B). Estos resultados indican que aunque ambas señales provocan una mayor migración, el tratamiento de EphB4-Fc no genera un aumento en la migración en los casos LANeg,

por tanto podríamos pensar que esta señal pudiera estar implicada en la infiltración de los ganglios linfáticos a través de la linfa aunado al marcado efecto provocado en el aumento de la supervivencia en los casos LApos.

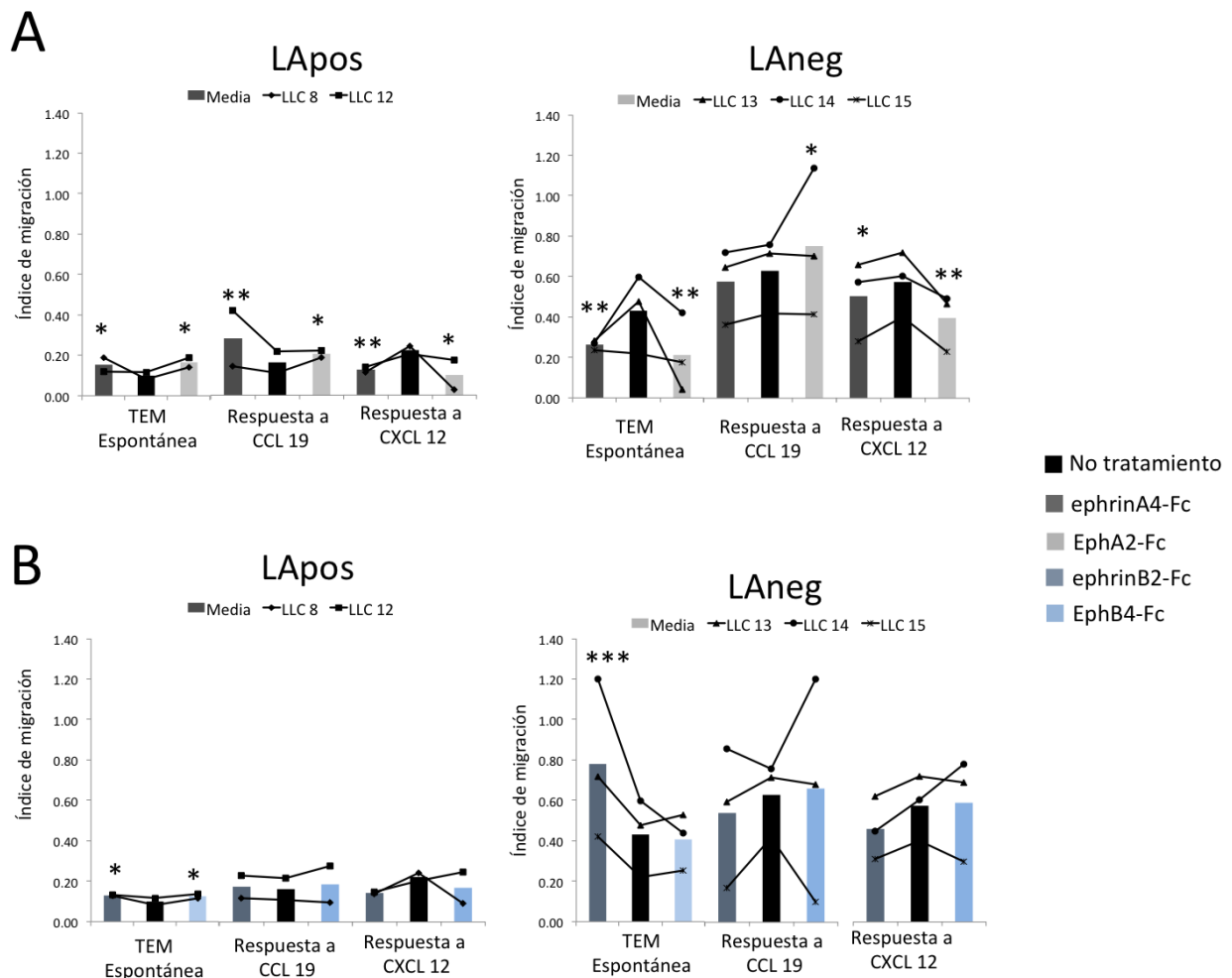


Figura 46. La ausencia de la interacción EphA2/ephrinA4 y la señal *reverse* a través de ephrinB2 provee de señales de supervivencia a las células LLC durante la TEM a través de endotelios linfáticos (HDLEC-TNF- α).

A-B) Células leucémicas (LLC) fueron colocadas para su migración a través de monocapas de HDLEC previamente estimuladas con 10 ng/mL de TNF- α . 100 ng/mL de CCL19 y CXCL 12 fueron colocados en el pocillo inferior de manera independiente. Los tratamientos de ephrinA4-Fc (A) y ephrinB2-Fc (B) fueron colocados a HDLEC, mientras que EphA2-Fc (A) y EphB4-Fc (B) fueron colocados a las células LLC. Después de 12 horas de cultivo se determinaron los porcentajes del índice de migración. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; La ausencia de * no presenta significancia.

3. Estudio de la salida de las células LLC desde los GL hacia los vasos sanguíneos (HUVEC) y linfáticos (HDLEC).

Estudios han demostrado que los linfocitos salen desde los ganglios linfáticos (GL) hacia la circulación a través de los vasos linfáticos eferentes en respuesta a un

gradiente de concentración de S1P presente en altas concentraciones en linfa y sangre y baja en tejidos (Yopp y cols. 2005, Lee y cols. 2007, Pappu y cols. 2007). Pese a los grandes avances en los últimos años, en la LLC existe poca o nula evidencia del estudio de los mecanismos de salida de las LLC (Borge y cols. 2014, Patrussi y cols. 2015, Till y cols. 2015). Estudios han demostrado la posible participación en leucocitos de los receptores quimiotácticos CCR7 y CXCR4 con el receptor S1PR1, mediante un mecanismo de competencia en la migración (Yopp y cols. 2004, Yopp y cols. 2005, Cyster y Schwab 2012).

3.1 Las células LLC presentan una menor expresión de S1PR1 comparadas con los LBP pero mantienen la capacidad para responder a S1P.

Los linfocitos en circulación internalizan S1PR1 debido a las altas concentraciones de S1P en sangre y linfa (Pappu R. 2007) por lo que para su estudio, se requiere recircular el receptor hacia la membrana. Para ello los linfocitos B de donantes sanos (LBP) y las células de pacientes de LLC fueron incubadas durante 12 y 24 horas en medio libre de suero (medio completo BSA, anexo 2). La expresión de membrana de S1PR1 fue medida por citometría de flujo, observando una mayor expresión a las 12 horas tanto en los LBP como en las células LLC (Figura 47A). Por ello para estudios posteriores utilizaremos este tiempo de incubación para recircular el receptor hacia la membrana. Además observamos que la expresión del receptor S1PR1 está significativamente disminuida en las células LLC comparadas con los LBP (Figura 47B), en concordancia con reportes previos (Capitani y cols. 2012). Aunque recientemente ensayos in vitro han demostrado que las células LLC son capaces de migrar en respuesta a S1P (Capitani y cols. 2012), quisimos analizar si esta disminución en la expresión de S1PR1 en las células LLC es capaz de generar una respuesta a S1P. Para ello realizamos ensayos de migración a través de filtros en placas *transwell* en respuesta a distintas concentraciones de S1P (no mostrado) observando una mejor respuesta a 100nM (Figura 47C) comparada con el control, por lo tanto esta concentración será utilizada en estudios posteriores. Sin embargo cabe señalar que la magnitud de la respuesta no es directamente proporcional a los niveles de expresión

de S1PR1, lo que nos hace sospechar que la respuesta a S1P no solo dependa de la señalización hacia S1PR1 si no que esta señal probablemente esté ligada a la de otros receptores.

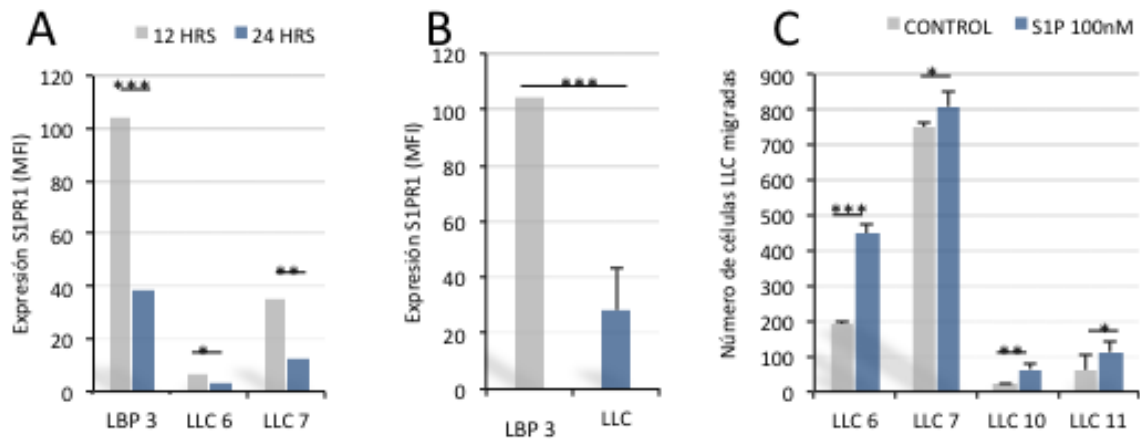


Figura 47. Las células LLC presentan una menor expresión de S1PR1 comparadas con los LBP pero mantienen la capacidad para responder a S1P.

A-B) Análisis por citometría de flujo de la expresión de S1PR1. Las células se marcaron con anticuerpo primario mouse α -S1PR1 y se reveló con α -mouse Alexa 488. A) Para recircular hacia la membrana celular el receptor S1PR1, linfocitos B purificados de donantes sanos (LBP) y de pacientes de LLC de sangre periférica (SP) fueron incubadas por 12 y 24 Hrs en medio completo-BSA (Anexo 2). B) Comparación de la expresión en membrana de S1PR1 entre LBP (n=1) y células LLC (n = 5) tras 12 horas de incubación en medio completo-BSA, las barras representan la media de las muestras y la desviación estándar (LLC). C) Ensayos de migración en respuesta a S1P. Células LLC migraron a través de filtros en placas *transwell*, 100 nM de S1P fue colocado en el pocillo inferior de la placa, tras 4 horas de incubación el número de células migradas fue contabilizado por citometría de flujo. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

3.2 Las células LLC de pacientes LApos presentan una menor capacidad de TEM (basal-apical) en comparación con los casos LANeg, las cuales responde a la señal de S1P a través de HDLEC pero no por HUVEC, adquiriendo en ambas condiciones clínicas señales de supervivencia tras la TEM.

Una vez comprobada la expresión del receptor S1PR1 en las células LLC y la respuesta a su ligando S1P en ensayos de migración, estudiamos el papel del endotelio sanguíneo (HUVE) y linfático (HDLEC) mediante ensayos TEM a través de una diapédesis realizada desde la parte basal de la célula endotelial hacia la parte apical, tal

como ocurre en procesos in vivo dentro del GL. Para abordar este aspecto células endoteliales HUVEC y HDLEC fueron sembradas en la parte inferior de la placa transwell hasta lograr la confluencia. Las monocapas fueron estimuladas previamente con 10 ng/mL de TNF- α y 100 nM de S1P fue colocado en el pocillo inferior.

Los índices de migración mostraron que los casos LANeg presentan una mayor capacidad de migración en ambos tipos de endotelio y en respuesta a S1P en comparación a los casos LAPos en los que se observaron bajos índices de migración (Figura 48A). Además se observó que las células LLC en ambas condiciones clínicas de LA responden a S1P a través de HDLEC pero no así a través de HUVEC (Figura 48A). Cuando analizamos la viabilidad en este proceso (TEM dirección basal-apical) observamos que tanto la fracción No-TM y a mayor magnitud la fracción TM en todas las muestras analizadas, mostraron un aumento en la viabilidad en comparación con las células leucémicas que no se sometieron a este proceso (cultivos en suspensión) en ambos tipos de endotelio (Figura 48B, izquierda). Resultados similares se observaron en respuesta a S1P (Figura 48B, derecha).

En conjunto estos resultados muestran que las células de LAPos parecen tener una menor capacidad para migrar en procesos de salida, lo que pudiera explicar al menos de manera parcial el acúmulo de estas células dentro de los GL ya que en pacientes LANeg se observó una mayor migración. Por otro lado la respuesta a S1P se ve más favorecida a través de endotelios linfáticos (HDLEC) por lo que probablemente sea la ruta más utilizada por las células LLC para salir del GL.

3.3 La interacción S1PR1-CCR7 y S1PR1-CXCR4 bloquean la salida de las células de LLC en ensayos *in vitro* a través de endotelios linfáticos y sanguíneos.

Estudios en leucocitos han demostrado la posible participación de CCR7 y CXCR4 con S1PR1 mediante un mecanismo de competencia entre la retención y la migración (Yopp y cols. 2004, Yopp y cols. 2005, Pham y cols. 2008, Cyster y Schwab 2012). Por ello, una vez analizados los procesos de salida de las células LLC a través del receptor S1PR1 mediante endotelios HUVEC y HDLEC quisimos estudiar la posible interacción de S1PR1 en las células leucémicas con los receptores CCR7 y CXCR4 involucrados en procesos de infiltración al GL.

Para estudiar estas posibles interacciones en las células LLC estudiamos el papel de S1P y su interacción con las quimiocinas CCL19 y CXCL12 a través de la señalización de sus receptores en el proceso de trans-migración en condiciones simuladas de salida desde el GL. Para ello realizamos ensayos *in vitro* de TEM en placas *transwell*, con monocapas de HUVEC y HDLEC sembradas por la parte inferior del filtro, colocando de manera independiente CCL19 y CXCL12 (100µg/mL de c/u) en el pocillo superior (PS) y S1P (100nM) en el pocillo inferior (PI), como se describe en el apartado de material y métodos (Figura 8D).

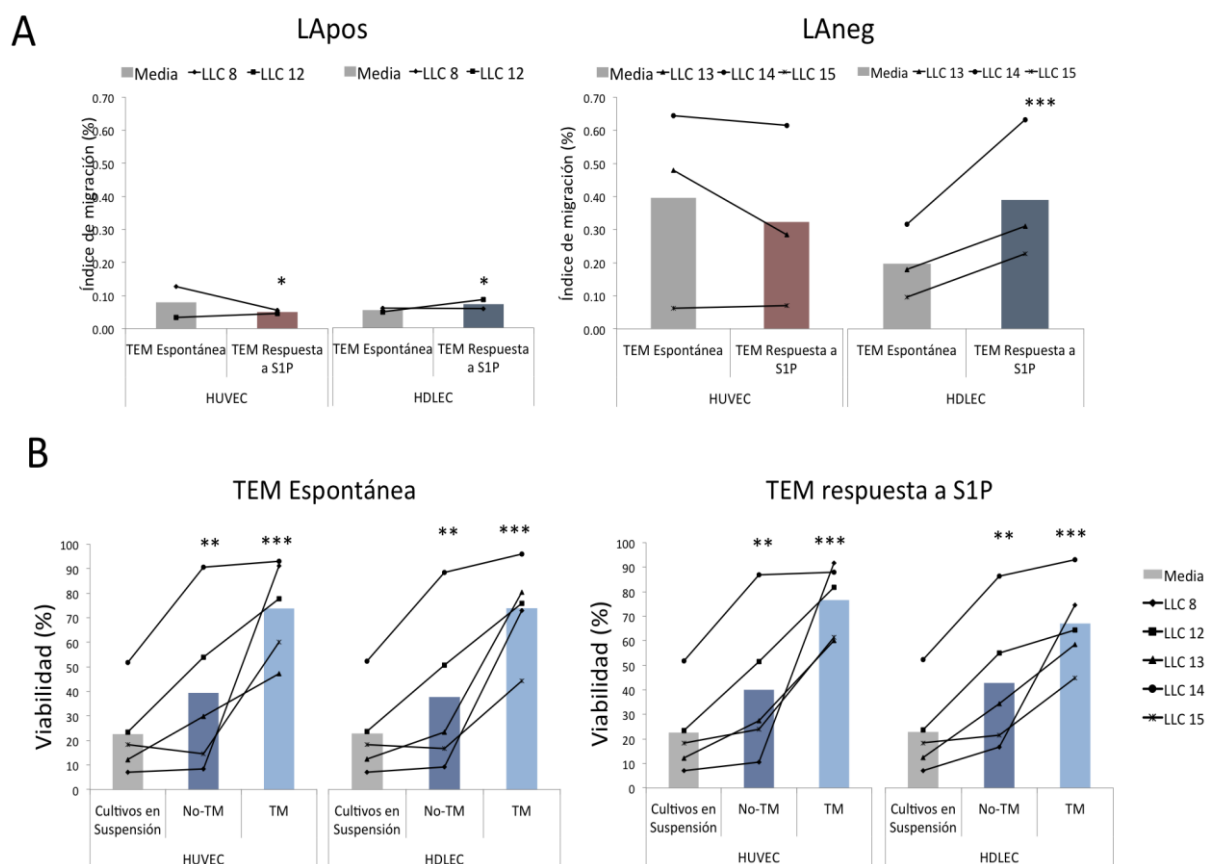


Figura 48. Las células LLC de pacientes Lapos presentan una menor capacidad de TEM (basal-apical) en comparación con LANeg, las cuales responde a la señal de S1P a través de HDLEC pero no por HUVEC, adquiriendo en ambas condiciones clínicas señales de supervivencia tras la TEM.

A-B) Células leucémicas (LLC) fueron colocadas para su migración a través de monocapas de HDLEC y HUVEC sembradas por la parte inferior del filtro de la placa *transwell* previamente estimuladas con 10 ng/mL de TNF- α . 100 nM de S1P fue colocado en el pocillo inferior. Después de 12 horas de cultivo se determinaron los porcentajes del índice de migración y la viabilidad de ambas fracciones de la TEM (No-TM y TM). Los cultivos en suspensión representan el control de las células LLC que no sufrieron el proceso de TEM ya que fueron colocadas en el pocillo inferior de placa de cultivo. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; La ausencia de * no presenta significancia.

Los resultados mostraron que los estímulos de CCL19 y CXCL12 en respuesta a S1P generaron un bloqueo en la TEM observándose un índice de migración más bajo en comparación con la respuesta a S1P usada como control (-, S1P) en ambos tipos de endotelios (Figura 49A). Por tanto creemos que las señales de CCR7 y CXCR4 en las células LLC podrían estar generando un bloqueo en la señalización de S1PR1 impidiendo su TEM en respuesta a S1P o que probablemente los estímulos de quimiocinas podrían estar generando una respuesta al endotelio que impida su trans migración.

Para indagar en estos aspectos estudiamos las señales independientes de CCR7 y CXCR4 provocados por los estímulos quimiotácticos en ausencia de S1P. Observando que los estímulos de CCL19 y CXCL12 comparados con el control (-, -), mostraron que, CCL19 no generó un cambio significativo en la TEM tanto en HUVEC como en HDLEC, pero si CXCL12, provocando un aumento en la TEM en HDLEC y a mayor grado en HUVEC comparado con la ausencia de estímulo (-, -) (Figura 49B).

Tras observar que los estímulos quimiotácticos no intervenían en el bloqueo previamente observado en respuesta a S1P, si no por el contrario parecía que CXCL12 promovía una mayor TEM, creemos, que el efecto de bloqueo en la TEM proviene de señales propias del endotelio. Para analizar este aspecto realizamos ensayos de migración en condiciones de salida antes descritas pero en ausencia de endotelios. Los resultados mostraron una mayor migración a S1P respecto al control (-, -) (Figura 49 C) como lo habíamos observado con anterioridad (Figura 47 C). Sin embargo el estímulo en las células LLC en respuesta a S1P generaron de manera significativa, tanto con CXCL12 y a mayor magnitud con CCL19, un aumento en el índice de migración comparada con la respuesta independiente de S1P (-, S1P) (Figura 49 C). Por tanto el bloqueo observado en la TEM a través de HUVEC y HDLEC (Figura 49A) es debido en gran parte a señales propias del endotelio generadas por S1P.

Cuando analizamos los efectos independientes de los estímulos en la migración a través de filtros en ausencia de S1P, observamos que la internalización de los receptores CCR7 y CXCR4 disminuyen la migración de las células LLC (Figura 49 D).

Estos resultados en conjunto muestran que la señalización a través de CCR7 y CXCR4 disminuyen la migración potenciando la retención de las células LLC, sin embargo estas señales potencian la respuesta de S1PR1 generando una mayor

migración en respuesta a S1P a través de filtros. Por tanto como habíamos mencionado el endotelio tienen una función esencial en el proceso TEM pues al parecer puede impedir la trans-migración de las células LLC en presencia de CCL19 y CXCL12 en respuesta a S1P. Es decir, estas interacciones promueven la migración (filtros) pero no la TEM (Endotelios).

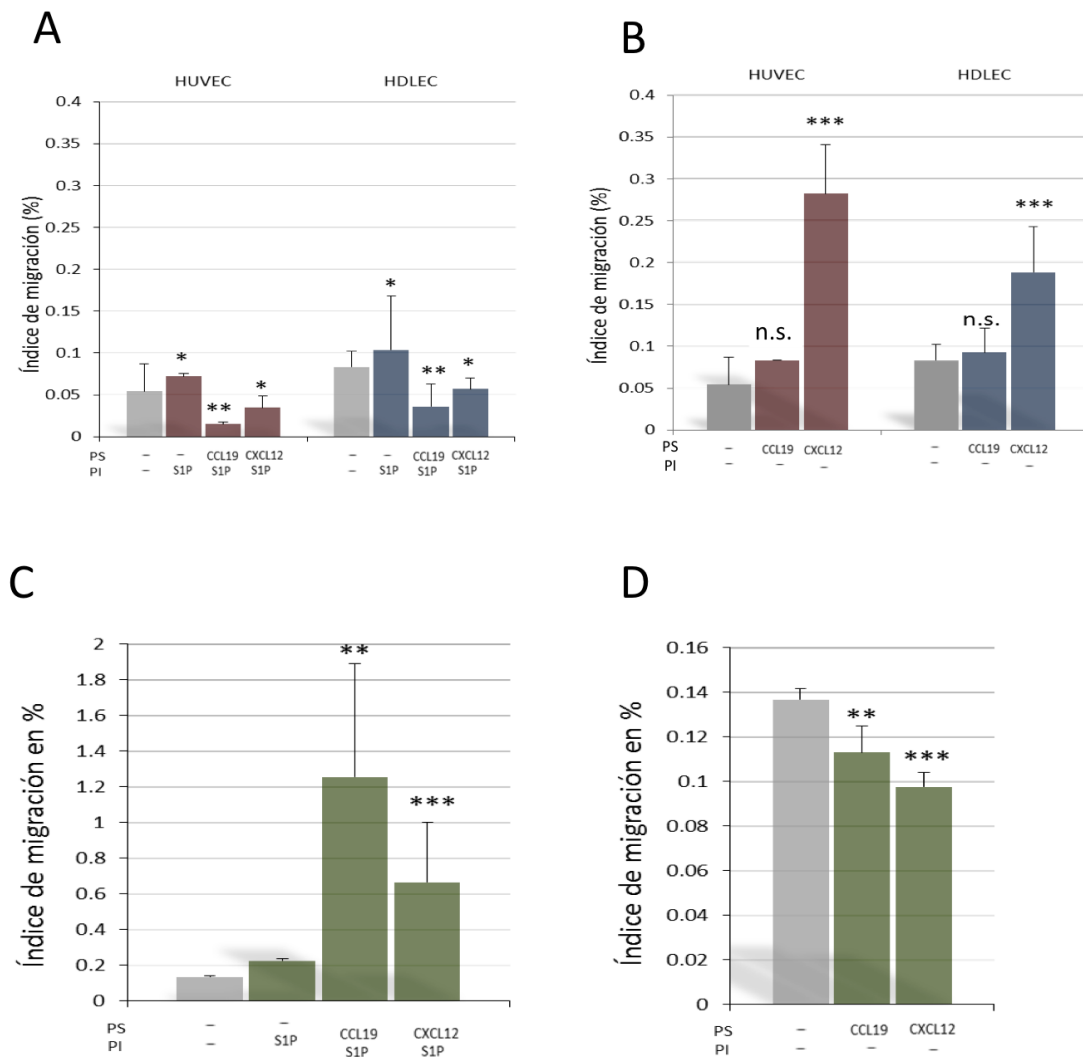


Figura 49. La interacción S1PR1-CCR7 y S1PR1-CXCR4 bloquean la salida de las células LLC en ensayos *in vitro* a través de endotelios linfáticos y sanguíneos.

A-B) Ensayos TEM (Basal-Apical) de células LLC (n=2) en procesos de simulación de salida del ganglio linfático (GL). Células HUVEC y HDLEC fueron sembradas a confluencia por la parte inferior del filtro de las placas *transwell*, estimuladas previamente con 10ng/mL de TNF- α . C-D) Ensayos de migración realizados de la misma manera descrita anteriormente pero en ausencia de endotelio a través de filtros de placas *transwell*. A y C) 100nM de S1P fue colocado en el pocillo inferior (PI) mientras que 100ng/mL de CCL19 y CXCL12 de manera independiente fueron colocados en el pocillo superior (PS). B y D) Efecto de los estímulos CCL19 y CXCL12 en ausencia de S1P. 100ng/mL de CCL19 y CXCL12 de manera independiente fueron colocados en el pocillo superior (PS). Los gráficos muestran los índices de migración y trans-migración en porcentajes, el signo (-) significa ausencia de estímulo y/o de respuesta a S1P. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

Para indagar un poco más en la interacción de estos receptores, medimos por citometría de flujo la expresión de S1PR1 en las células leucémicas después de ser estimuladas durante 30 minutos con CCL19 y CXCL12. Los resultados mostraron que ambos estímulos en todas las muestras analizadas incrementan los niveles de expresión de membrana de S1PR1 comparados con células no estimuladas (Figura 50), confirmando así que este aumento de los niveles de expresión del receptor genera una mayor migración en respuesta a S1P.

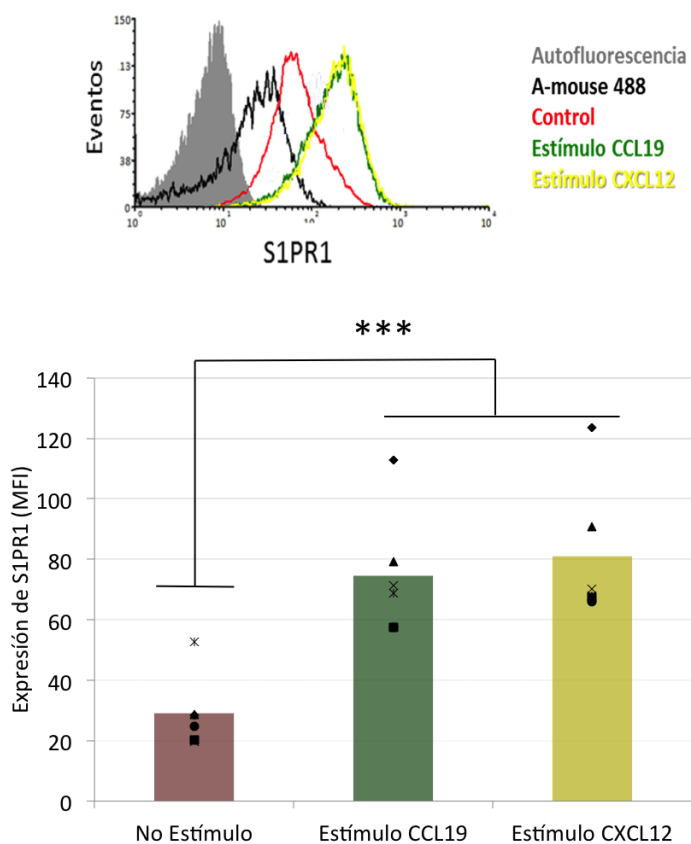


Figura 50. Los estímulos con las quimiocinas CCL19 y CXCL12 generan un aumento en la expresión de S1PR1.

Células LLC fueron incubadas durante 30 minutos con 100 ng/mL de CCL19 y CXCL12 de manera independiente, tras la incubación se realizó el marcaje con anti-S1PR1 durante 30 minutos, tras un lavado se agregó un anticuerpo contra ratón unido a AlexaFluor 488. Los niveles de expresión se midieron por citometría de flujo. Se presentan los histogramas de una muestra representativa (parte superior) y el gráfico de la expresión de membrana de S1PR1 en intensidad media de fluorescencia (MFI). Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.

3.4 Las señales *forward* y *reverse* de las Eph/ephrin en la interacción S1PR1-CCR7 y S1PR1-CXCR4 promueven una mayor TEM (Basal-Apical) en la salida de las células LLC a través de endotelios sanguíneos y linfáticos.

Una vez observado el papel que juegan ambos endotelios en procesos de salida a través de las señales de S1P en conjunto con CCL19 y CXCL12, en los que al parecer las señales de S1P impiden su trans-migración, pensamos que probablemente los

receptores Eph y sus ligandos ephrin podrían intervenir en estas interacciones dentro de los procesos TEM, como habíamos señalado en los estudios anteriores.

Para indagar en este aspecto realizamos ensayos de salida a través de la TEM (Basal-Apical) como se describieron anteriormente añadiendo tratamientos Eph/ephrin. Las monocapas de endotelios HUVEC y HDLEC sembradas por la parte inferior del filtro de la placa *transwell* se pre-estimularon y no con 10 ng/mL de TNF. De manera independiente cantidades saturantes de EphA2-Fc y EphB4-Fc fueron pegadas a las células LLC mientras que ephrinA4-Fc y ephrinB2-Fc fueron pegadas a los endotelios.

Tras comparar los efectos con la condición carente de tratamientos de Eph/ephrin usada como control, observamos que de manera general el bloqueo en la interacción de las células LLC y los endotelios a través de ephrinA4-Fc- EphA2-Fc y ephrinB2-Fc-EphB4-Fc promueven una mayor trans-migración a través de HUVEC y HDLEC en endotelios estimulados y no con TNF- α , bajo el estímulo de CCL19 (Figura 51A) y en mayor medida con CXCL12 (Figura 51 B). Estos datos en conjunto muestran que probablemente se generen señales *forward* y *reverse* provocados por los tratamientos de Eph/ephrin. Por tanto estas señales son necesarias en los procesos de salida, TEM (Basal-Apical) de las células LLC para efectuar su trans-migración, sobre todo en conjunto con la interacción de las señales generadas por CXCR4 y S1PR1, donde parece tener una mayor participación.

Para abordar de una manera un poco más específica el papel de las Eph/ephrin en estos procesos de interacción entre los receptores S1PR1 con CCR7 y CXCR4 y comprobar si estos efectos eran dependientes o independientes de la interacción con el endotelio, realizamos ensayos de migración a través de filtros en condiciones de salida cómo se describieron anteriormente pero en ausencia de endotelio, para estudiar estas señales en las propias células leucémicas. Las proteínas recombinantes fueron pegadas a los filtros de la placa *transwell*. Los resultados de la migración comparados con la ausencia de tratamientos de Eph/ephrin (Control), mostraron, que bajo el estímulo de CCL19 (Figura 52A) ephrinA4-Fc y ephrinB2-Fc provocaron un ligero bloqueo en la migración, mientras que con EphA2-Fc y EphB4-Fc el bloqueo fue significativamente mayor. Esto es contrario a lo observado con CXCL12 (Figura 52 B),

donde se observó una mayor migración tanto con los receptores Eph y a mayor magnitud con los ligandos ephrin.

Estos resultados en conjunto muestran que en la interacción S1PR1-CXCR4, la señales *reverse* a través de ephrinA4 y ephrinB2 así como las señales *forward* a través de EphA2 y EphB4 potencializan la migración de las células LLC, mientras que en la interacción S1PR1-CCR7 estas señales parecen bloquear el efecto antes observado con endotelios (Figura 51A). Por tanto en esta interacción el endotelio juega un papel indispensable para promover la TEM. Además podemos concluir que los mecanismos de interacción de Eph/ephrin en respuesta a S1P son diferentes en CCR7 y CXCR4.

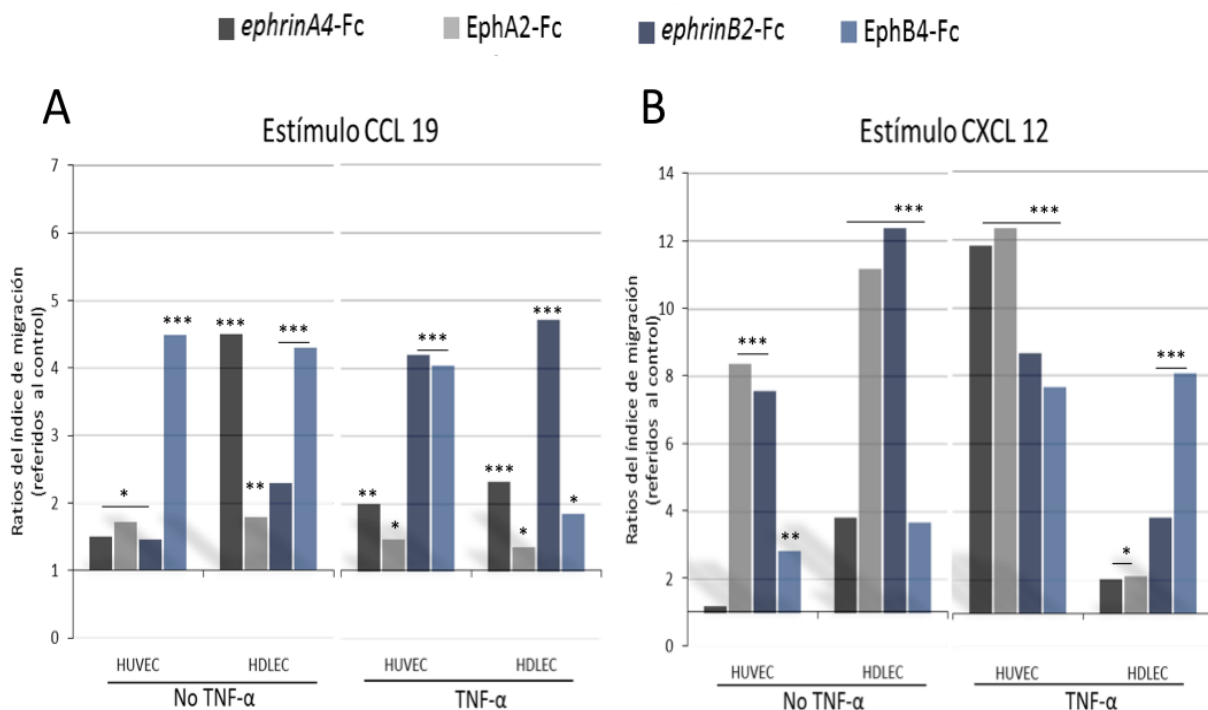


Figura 51. Las señales *forward* y *reverse* de las Eph/ephrin en la interacción S1PR1-CCR7 y S1PR1-CXCR4 promueven una mayor TEM (Basal-Apical) de las células LLC a través de endotelios sanguíneos y linfáticos.

(A-B) Ensayos de transmigración de LLC (n=2) en procesos de simulación de salida del ganglio linfático (GL), células HUVEC y HDLEC fueron sembradas a confluencia por la parte inferior del filtro de las placas *transwell*, con y sin tratamiento de TNF- α (10ng/mL). Los tratamientos de ephrinA4-Fc y ephrinB2-Fc fueran pegadas a los endotelios mientras que los tratamientos de EphA2-Fc y EphB4-Fc fueron pegados a las células LLC. 100nM de S1P se colocaron en el pocillo inferior mientras que 100ng/mL de CCL19 y CXCL12 de manera independiente fueron colocados en el pocillo superior. Los gráficos muestran los ratios del índice de migración referidos al control (No tratamientos). **A)** Efectos provocados por Eph/ephrin bajo el estímulo de CCL19. **B)** efectos provocados por Eph/ephrin bajo el estímulo de CXCL12. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

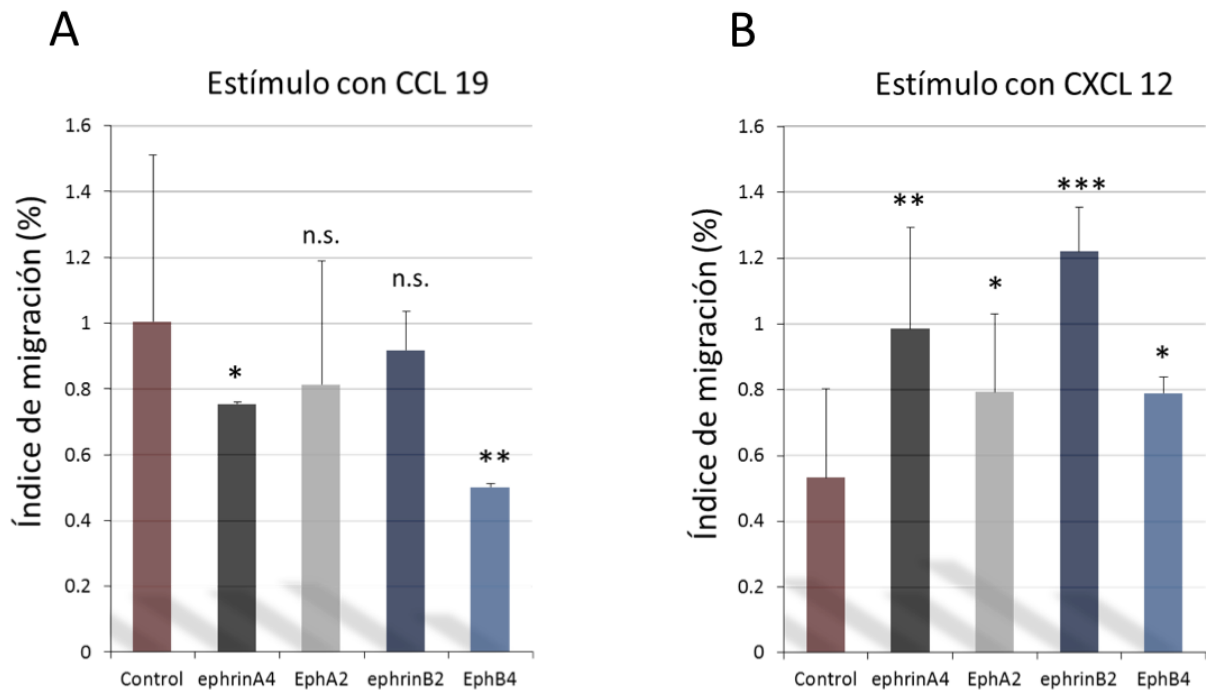


Figura 52. Las señales de Eph/ephrin potencian la interacción de S1PR1-CXCR4 generando una mayor migración mientras que en la interacción S1PR1-CCR7 la impiden.

A-B) Ensayos de migración a través de filtros de placas *transwell* en células LLC (n=2). Cantidades saturantes de proteínas recombinantes de ephrinA4-Fc, EphA2-Fc, ephrinB2-Fc y EphB4-Fc fueron pegadas durante 1 hora a temperatura ambiente en los filtros de la placa, 100nM de S1P se colocaron en el pocillo inferior (PI) mientras que 100ng/mL de CCL19 y CXCL12 de manera independiente fueron colocados en el pocillo superior (PS). Los gráficos muestran el índice de migración tras 4 horas de incubación. El control indica la ausencia de proteína recombinante pegada al filtro. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

Tras observar que al parecer las Eph/ephrin impedían la migración bajo el estímulo de CCL19 en respuesta a S1P pero la promovían con el estímulo de CXCL12, quisimos estudiar los efectos independientes de cada estímulo para entender la participación de las señales *forward* y *reverse* en el linfocito. Para ello realizamos ensayos de migración pegando las proteínas recombinantes a los filtros de la placa *transwell*. Los ensayos se realizaron en ausencia de estímulos (no estímulo) y con estímulos de CCL19 y CXCL12 las cuales fueron colocadas en el pocillo superior y S1P colocado en el pocillo inferior, todas ellas de manera independiente.

Tras analizar los resultados observamos que las señales *forward* y *reverse* en el linfocito, generan mayor migración comparada con la ausencia de tratamiento de Eph/ephrin (Fig. 53, No estímulos), mientras que con los estímulos de CCL19 y CXCL12 los efectos de aumento en la migración se mantienen pero considerablemente a una menor magnitud comparados con la ausencia de ellos (No estímulos) (Figura 53). Por otra parte en respuesta a S1P los tratamientos con ephrinA4-Fc y ephrinB2-Fc promueven significativamente una mayor migración mientras que los receptores EphA2-Fc y EphB4-Fc la magnitud de la respuesta es menor pero sin embargo aumentan ligeramente la migración (Figura 53).

En conjunto estos resultados muestran que las señales generadas en las células LLC por las Eph/ephrin inducen una mayor migración la cual se ve disminuida con la internalización de CCR7 y CXCR4, pero potencializada en respuesta a S1P a través de las señales *reverse*, principalmente a través de las señales *forward*.

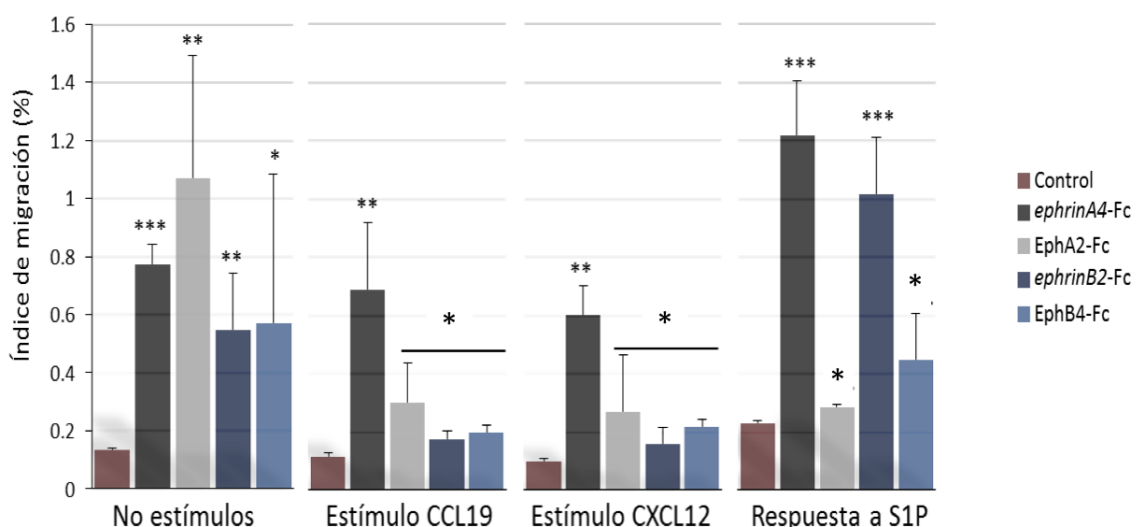


Figura 53. Estudio del papel de Eph/ephrin en la interacción con CCR7, CXCR4 y S1PR1 en la migración de las células LLC.

Ensayos de migración a través de filtros de placas *transwell* en muestras de LLC (n=2). Cantidades saturantes de proteínas recombinantes de *ephrinA4-Fc*, *EphA2-Fc*, *ephrinB2-Fc* y *EphB4-Fc* fueron pegadas durante 1 hora a temperatura ambiente en los filtros de la placa. De manera independiente 100nM de S1P se colocaron en el pocillo inferior (PI) mientras que 100ng/mL de CCL19 y CXCL12 de forma separada fueron colocados en el pocillo superior (PS). Los gráficos muestran el índice de migración tras 4 horas de incubación. El control indica la ausencia de proteína recombinante pegada al filtro. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

Por otro lado cuando colocamos las Eph/ephrin solubles para inducir un bloqueo, observamos que efectivamente los tratamientos con EphA2-Fc y EphB4-Fc generaban una disminución en la migración, tanto en la migración espontánea (Figura 54A) como en respuesta a S1P (Figura 54B), contrario a lo observado cuando fueron pegadas a los filtros de la placa (Figura 53). Sin embargo, ephrinA4-Fc y ephrinB2-Fc generaban una señalización promoviendo una mayor migración de manera espontánea (Figura 54A) y a mayor magnitud en respuesta a S1P (Figura 54B), coincidiendo con los resultados cuando fueron pegadas a filtro (Figura 53). Por tanto la señal *reverse* en las células LLC es necesaria para la respuesta a S1P, mientras que las fracciones solubles potencian la migración.

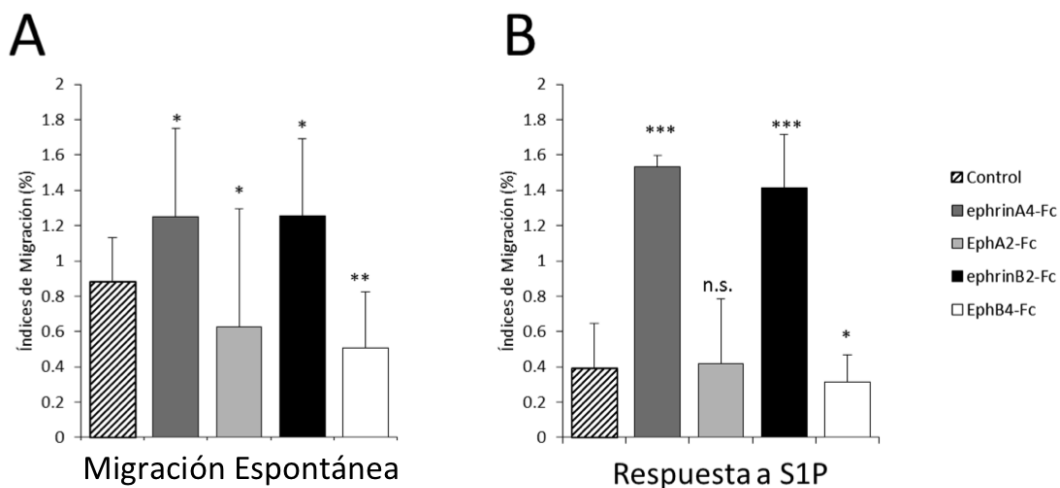


Figura 54. La señal *reverse* generada en las células LLC impide la respuesta a S1P mientras que las fracciones solubles potencian respuesta en la migración.

A-B) Ensayos de migración a través de filtros de placas *transwell* en células LLC (n=2). Cantidades saturantes de proteínas recombinantes de *ephrinA4-Fc*, *EphA2-Fc*, *ephrinB2-Fc* y *EphB4-Fc* fueron colocadas de manera soluble en el pocillo superior (PS) junto con las células LLC. A) Migración de células LLC en ausencia de S1P (Control). B) Migración de células LLC en respuesta a 100nM de S1P colocado en el pocillo inferior (PI). Los gráficos muestran el índice de migración tras 4 horas de incubación. El control indica la ausencia de proteína recombinante. Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001; n.s. no significativa.

Tras observar estos resultados pensamos que ambas señales podrían estar generando en las células leucémicas un incremento en los niveles de expresión de S1PR1. Para abordar este aspecto medimos los niveles de expresión del receptor S1PR1 después de ser estimulados con las proteínas recombinantes Eph/ephrin. Para ello se realizaron ensayos con las proteínas recombinantes pegadas a la placa de

cultivo y por otro lado de manera independiente se añadieron de manera soluble. Tras 30 minutos de incubación se midió la expresión de S1PR1 y se comparó con la expresión de células LLC en ausencia de tratamientos (control). Los resultados mostraron en todas las muestras analizadas que tanto la señal a través de las proteínas solubles (Figura 55A) como las proteínas pegadas a placa (Figura 55B), generan una señal provocando como resultado una mayor expresión de S1PR1 comparadas con el control (Figura 55 A-B).

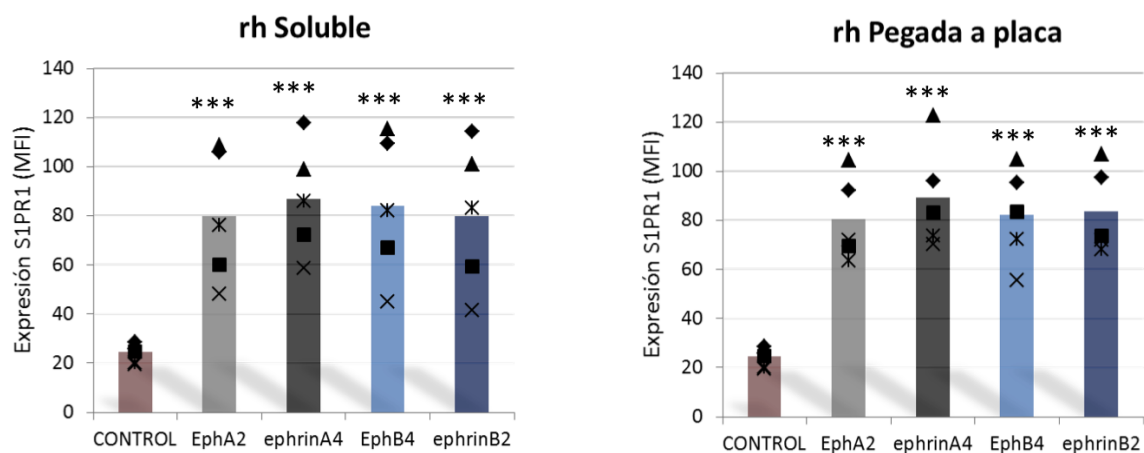


Figura 55. Los estímulos y señalizaciones con Eph/ephrin generan en las células LLC un aumento en la expresión de S1PR1.

Células LLC fueron incubadas durante 30 minutos con $0.5\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células de proteínas recombinantes (rh) EphA2-Fc, ephrinA4-Fc, EphB4-Fc y ephrinB2-Fc pegadas a placa previamente durante una hora y de manera soluble añadida al cultivo. Tras la incubación las células se recuperaron tras un lavado con PBS-EDTA y se realizó el marcaje con anti-S1PR1 durante 30 minutos, tras un lavado se agregó un anticuerpo contra ratón unido a AlexaFluor 488. Los niveles de expresión se midieron por citometría de flujo. Los gráficos muestran la expresión de membrana de S1PR1 en intensidad media de fluorescencia (MFI). Las significancias estadísticas fueron determinadas por la prueba de *t-student* pareada de dos colas. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. no significativa.



Discusión

DISCUSIÓN

El agravamiento clínico de los pacientes de LLC se da en gran medida por la infiltración de las células leucémicas a los órganos linfoides secundarios como los GL, además de la infiltración a la MO, sin embargo esta infiltración solo se da en cierto tipo de pacientes cuyos mecanismos a pesar de los grandes avances en los últimos años aún son del todo impredecibles. Por lo tanto la prevención de la infiltración a GL para evitar la diseminación y la presencia de linfadenopatías es un aspecto clínico de interés.

En el presente trabajo mostramos evidencia por primera vez, que durante la extravasación los contactos físicos que establecen las células LLC con el endotelio pueden resultar en una disminución de su viabilidad. Sin embargo contrario a esto, las células LLC de pacientes con presencia de linfadenopatías (LApos) tras realizar la diapédesis son capaces de captar señales de supervivencia a través de las cadenas de integrinas $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ y $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ tras la unión con sus ligandos ICAM-1 y VCAM-1 respectivamente, resultando en una mejora de la supervivencia. En este proceso la forma soluble de ephrinA4 que se acumula en el plasma de pacientes con presencia de linfadenopatías (Alonso-Colmenar y cols. 2009) juega un papel fundamental. En estos pacientes la unión de ephrinA4 soluble con el receptor EphA2 en el lado luminal (apical) de la célula endotelial facilita la adhesión y trans-migración de las células LLC a través de los vasos endoteliales dentro de los tejidos linfoides, mejorando la TEM y las señales de supervivencia. Por lo tanto los presentes resultados amplían nuestros estudios previos del papel de la isoforma soluble de ephrinA4 en la adhesión y TEM de las células LLC (Alonso-Colmenar y cols. 2009, Trinidad y cols. 2009) añadiendo a esto su relación con la supervivencia de las células LLC y la presencia de linfadenopatías.

En el desarrollo de estas linfadenopatías pueden estar implicados en general dos procesos que involucran la entrada o salida de las células leucémicas hacia y desde los GL. Por un lado como se describe en la presente tesis doctoral, la mejora de la capacidad TEM de las células LLC para infiltrar los GL en los casos de pacientes con

LApos mediada por el posible papel de ephrinA4 y por otro la retención de estas células dentro del GL, que puede ser debida en gran medida al daño en la expresión de S1PR1 (Capitani y cols. 2012).

Por lo tanto en la presente tesis doctoral además estudiamos por primera vez, el estudio *in vitro* del proceso de trans-migración de células LLC a través de endotelios linfáticos y el posible papel en la diseminación de la enfermedad a través de linfa, en la cual las interacciones Eph/ephrin previamente descritas por nuestro laboratorio (Trinidad y cols. 2009) intervienen en la misma. Además mostramos por primera vez, evidencias preliminares del estudio *in vitro* de las células LLC en procesos de salida desde el GL a través de endotelios linfáticos y sanguíneos en respuesta a S1P mediada por su recetor S1PR1 (Pappu y cols. 2007, Capitani y cols. 2012, Cyster y Schwab 2012) y su posible interacción con los receptores de quimiocinas CCR7 y CXCR4 (Yopp y cols. 2005, Patrussi y cols. 2015) en procesos de regulación de salida de las células LLC, así como el papel que juegan la interacciones Eph/ephrin en dicho proceso.

1. Papel de ephrinA4 en la supervivencia de las células LLC durante la TEM y su relación con la presencia de linfadenopatías en pacientes de LLC.

Los presentes resultados muestran un nuevo panorama del papel de la célula endotelial en la LLC. En el presente trabajo hemos demostrado y de acuerdo con estudios previos (Carman y Springer 2004, Millan y cols. 2006, Muller 2009, Buggins y cols. 2010, Badoux y cols. 2011, Maffei y cols. 2012), que la célula endotelial puede probablemente proporcionar señales de supervivencia a las células leucémicas dentro de los tejidos infiltrados, mediada en gran parte por la liberación de factores solubles. Esta supervivencia depende también de los contactos físicos entre ambos tipos celulares (CLL-endotelio) tras un tiempo prolongado de interacción. En apoyo a esta hipótesis, demostramos que en cultivos a largo plazo cuando utilizamos endotelio fijado con paraformaldehído no se observan estos efectos de supervivencia, mientras que con HUVEC vivas y medio condicionado procedente de cultivos a largo plazo se protege ampliamente a las células LLC de la apoptosis espontánea y de la apoptosis mediada por HUVEC-TNF en los cultivos de 12 horas. Por el contrario a tiempos más cortos como en el proceso de extravasación (Schnoor y cols. 2015) se ve impedida la capacidad de las células endoteliales de producir estos factores solubles sin embargo

las señales apoptóticas se reciben principalmente a través de los contactos físicos. Esto es apoyado por el incremento de la apoptosis en las células LLC de la fracción no-TM que puede posiblemente llevarse a cabo 2 horas después del contacto físico como se ha demostrado en los co-cultivos. Bajo condiciones fisiológicas de flujo las células LLC no adheridas podrían probablemente escapar de estas señales apoptóticas iniciales que hemos observamos en estos ensayos bajo condiciones estáticas de TEM, aunque serían necesarios ensayos TEM bajo condiciones de flujo para confirmar esta conclusión (Till y cols. 2002, Mionnet y cols. 2011). Durante la diapédesis las LLC pueden ser rescatadas de las señales apoptóticas recibidas al inicio de la TEM como ocurre en los casos LApos. Además no se puede descartar que las células LLC migradas reciban otras señales de supervivencia una vez dentro del parénquima de los GL, aunque nuestro estudio en secciones de adenopatía mostraron numerosas células apoptóticas cerca de las HEV. Estos datos sugieren que un gran número de células recientemente migradas mueren sin infiltrar el tejido y especialmente cuando migran a través de HEV carentes de ephrinA4 como en las observadas en las regiones exteriores de la LA.

Nuestros resultados además confirman un papel crítico de las integrinas en la patología de la enfermedad (Lagneaux y cols. 1999, Plate y cols. 2000, Till y cols. 2002, Burger 2013), destacando que estas establecen una relación entre la extravasación y la supervivencia de las células leucémicas. Un alto nivel de expresión de CD49d ($\alpha 4$) es indicativo de un peor pronóstico en los casos no mutados (IgHV) y CD38⁺ (Walsby y cols. 2014) lo cual se asocia con la presencia de linfadenopatías (Slattery y Dong 2003, Till y cols. 2005, Hartmann y cols. 2009), $\alpha 4$ juega un papel crítico en la extravasación de linfocitos sanos en asociación con $\beta 1$ mediando la unión a VCAM-1, en LLC ha sido relacionada con $\alpha L\beta 2$ que se adhiere a ICAM-1 durante la migración trans-endotelial (Burger 2013). Incluso, las células LLC de pacientes sin linfadenopatía (LANeg) muestran un defecto de la motilidad y la TEM dependiente de $\alpha L\beta 2$, que es en parte corregida por la expresión de $\alpha 4\beta 1$ en los pacientes que presentan adenopatías (LApos) (Till y cols. 2008, Burger 2013). Esto probablemente explique en los casos LANeg la falta de capacidad para recibir señales de supervivencia durante TEM o cuando se cultivaron sobre ICAM-1 o VCAM-1, enfatizándose una mayor supervivencia

cuando la expresión de $\alpha 4$ esta incrementada como en los casos LApos. De acuerdo con estudios previos en los que se destaca un papel crítico de $\alpha 4$ en la supervivencia de las células LLC mediada por el endotelio (Vincent y cols. 1996, Till y cols. 2008, Zucchetto y cols. 2009, Maffei y cols. 2012) hemos demostrado, además, que esto es especialmente relevante en los casos con presencia de linfadenopatía. Por el contrario, el hallazgo de las señales apoptóticas mediadas por estas y otras integrinas en las células LLC cuando fueron cultivadas sobre diferentes ligandos de matrices extracelulares (ECM) o que se observaron en los ensayos TEM fueron completamente inesperados. Por lo tanto encontramos que las integrinas tienen un efecto dual en la viabilidad celular de las células LLC, intercambiando respuestas de apoptosis o supervivencia, que ya han sido encontrados en otros tipos celulares incluyendo células tumorales hematopoyéticas (Eksioglu-Demiralp y cols. 1996, Lagneaux y cols. 1998, Gattei y cols. 2008, Fiorcari y cols. 2014). Mecanismos de apoptosis mediados por integrinas han sido relacionados con adhesiones firmes y prolongadas (Eksioglu-Demiralp y cols. 1996) o a través de integrinas no adheridas (Gattei y cols. 2008). Su estado de activación antes de la unión al ligando proporciona además un efecto dual a través del reclutamiento de caspasas (Gattei y cols. 2008) y/o de ERK en lugar de AKT kinasa (Fiorcari y cols. 2014). En conjunto estos mecanismos y/o algunos desconocidos pueden contribuir a los resultados de apoptosis observados cuando se adhieren al endotelio inflamado a través de sus ligandos ICAM-1 o VCAM-1. En este sentido no se puede excluir, de cualquier manera, la posible existencia de mecanismos apoptóticos adicionales indirectamente regulados por la adhesión de integrinas, incluyendo aquellas mediadas por Fas o TRAIL-Rs, que son expresados por las células LLC (Saito y cols. 2009)(40) y cuyos ligandos han sido descritos bajo estímulos inflamatorios en la célula endotelial (Whitlock y cols. 2000, Stupack y cols. 2001).

En la viabilidad dependiente de integrinas en las células LLC, la expresión en la superficie celular de ephrinA4 surge como un mediador crítico para contrarrestar la apoptosis en los pasos iniciales de la adhesión, por lo menos observado en los casos LApos durante la diapédesis. Las señales repulsivas debidas a la expresión de la isoforma de membrana, como previamente habíamos mostrado (Trinidad y cols. 2009), junto con el flujo sanguíneo, podrían posiblemente contribuir a desprender las

células LLC de los vasos sanguíneos evitándoles así las señales apoptóticas provenientes de la adhesión. En contraste con esto, en pacientes con LApos, la baja expresión de membrana de ephrinA4 es necesaria para la firme adhesión al endotelio a través de las integrinas $\alpha 4$ y αL (Alonso-Colmenar y cols. 2009, Trinidad y cols. 2009) y posteriormente efectuar la diapédesis. De cualquier manera, mostramos que ephrinA4 es capaz de inhibir la alta afinidad de estados conformacionales de las integrinas a través del secuestro físico en la superficie celular en lugar de su internalización. En apoyo a este mecanismo, además mostramos una mejora en la adhesión de células leucémicas al endotelio en células LLC con ephrinA4 silenciada. Los ensayos de silenciamiento demostraron que la ausencia de la señal *reverse* pero no de ephrinA4 por sí misma es necesaria para continuar con la diapédesis pero no para captar señales de supervivencia vía integrinas en las muestras Lapos. La asociación inversa entre las moléculas ephrinA4 y $\alpha 4$ resalta aún más la posible existencia de mecanismos comunes para regular su expresión en las células LLC y asegurar la extravasación.

Por consiguiente, basándonos en que la unión de la ephrinA4 soluble al endotelio a través de EphA2, surge como un mecanismo fundamental que promueve la TEM y la supervivencia en los casos de LApos. El hallazgo de células LLC apoptóticas cerca de la HEV carentes de ephrinA4 dentro de las linfadenopatías, también apoya de manera indirecta que este proceso posiblemente suceda *in vivo*. Además, esto fue confirmado en ensayos realizados en ratón, aunque no fisiológicamente del todo, representa un buen protocolo experimental para estudiar *in vivo* la capacidad de las células LLC para establecerse en el ganglio linfático o medula ósea (Stupack 2005, Hartmann y cols. 2009). Además se muestra que la ephrinA4 soluble podría promover una ruta trans-celular (TC) en la TEM de las células LLC, como se concluyó con las tinciones de VE-Cadherina y caveolina-1, mediante la inducción de agujeros en las monocapas HUVEC, tal como se observó en otros estudios endoteliales de permeabilidad utilizando ephrinA1 en lugar de ephrinA4 (Larson y cols. 2008). Se ha descrito que Caveolin-1 media la ruta TC de la TEM en conjunto con ICAM-1 y VCAM-1 (Davids y Burger 2012) de manera similar a lo que hemos observado en los casos de la internalización de EphA2 mediada por ephrinA4 (Trinidad y cols. 2009). De cualquier manera EphA2 puede físicamente interactúa con caveolin-1 como efectivamente se ha

demostrado a nivel bioquímico (Martinez-Moreno y cols. 2015). En conjunto estos datos pueden adicionalmente aportar una nueva alternativa a la eterna pregunta respecto a la importancia de la ruta TC respecto a la PC de la TEM (Vihanto y cols. 2006, Davids y Burger 2012, Schnoor y cols. 2015).

Dentro de este contexto, ephrinA4 podría desempeñar un papel fundamental para garantizar la supervivencia de las células LLC relacionadas con la extravasación y linfadenopatías. Es importante resaltar que a pesar del bajo número de casos de trisomía 12 y deleción del 11q incluidas en el presente estudio, la mayoría de ellos muestran niveles bajos de expresión de ephrinA4 en la superficie celular, un hallazgo que podría estar relacionado con el aumento de la tendencia a desarrollar linfadenopatías en estos pacientes. En contraste, estos casos de citogenética tenían niveles variables de ephrinA4 en suero sugiriendo que mecanismos diferentes podrían estar regulando la expresión de ambas isoformas.

Un resumen de nuestros hallazgos se representa en la figura 56. A través de la expresión de la isoforma de membrana, las interacciones de integrinas en las células LLC son contrarrestadas contribuyendo a su desprendimiento del endotelio, escapando así de las señales apoptóticas probablemente facilitado por el flujo sanguíneo. Este mecanismo es más probable que se lleve a cabo en pacientes sin la presencia de adenopatías y bajos niveles de ephrinA4 soluble. En pacientes con adenopatías la ephrinA4 soluble en plasma junto con la expresión de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ se unen para mejorar la TEM aunada a las señales de supervivencia durante la extravasación. Queda por demostrar de manera definitiva si el paso trans-celular representa una ruta de supervivencia en la TEM y/o en otros tipos celulares de poblaciones normales y leucémicas.

En conclusión, nuestros resultados proporcionan nuevos datos en los mecanismos de supervivencia empleados por la células LLC *in vivo*, demostrando que la extravasación podría representar un evento desfavorable que debe ser explorado para prevenir la diseminación ganglionar de la enfermedad.

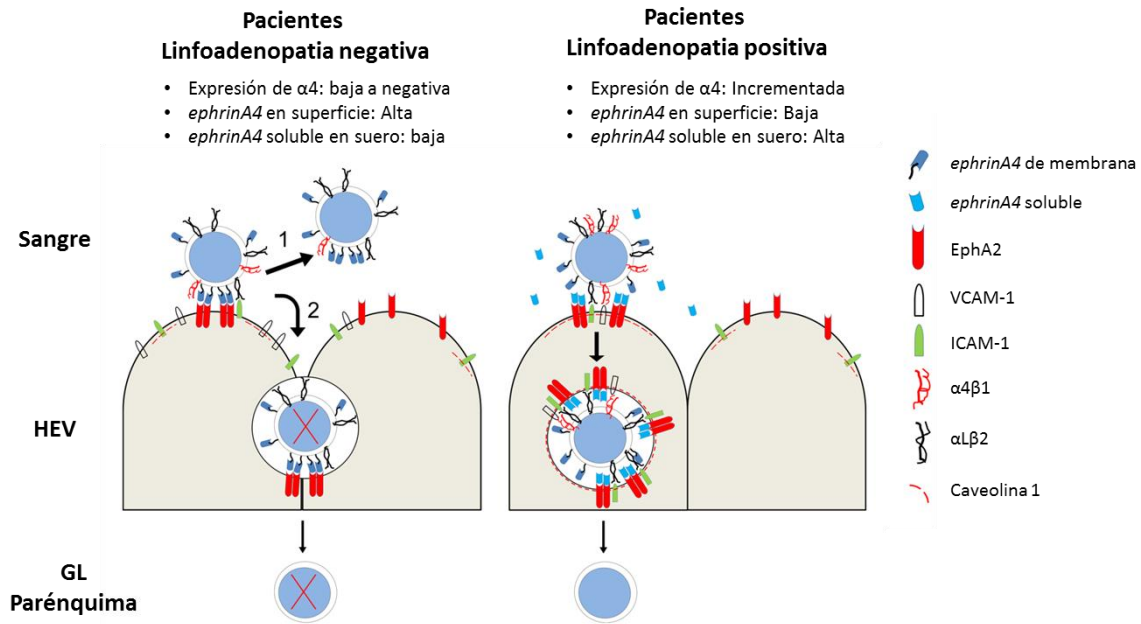


Figura 56. Esquema representativo de la extravasación y supervivencia de las células LLC de acuerdo a la condición de linfadenopatía determinada por mecanismos moleculares de integrinas y ephrinA4.

En pacientes sin adenopatía (LANeg, izquierda), células LLC con bajos niveles de expresión de la integrina $\alpha 4$ afecta su extravasación pero no su adhesión al endotelio probablemente se de a través de $\alpha L\beta 2$. En estas condiciones, una baja frecuencia de células LLC migran entre las uniones adyacentes de las células endoteliales (ruta paracelular de la TEM) sin recibir señales de supervivencia que finalmente las lleva a la muerte (2). De cualquier manera la mayoría de las células LLC se separan del endotelio como resultado de la expresión de ephrinA4 en la superficie celular lo que les permite seguir fluyendo dentro del torrente sanguíneo (1). Los niveles en suero de ephrinA4 soluble de pacientes LANeg no son suficientemente altos para contrarrestar la unión de la ephrinA4 de membrana con la EphA2 del endotelio y evitar el desprendimiento de las células LLC.

En pacientes con linfadenopatía (LApos, derecha) la expresión de la integrina $\alpha 4$ es suficientemente alta para continuar la extravasación. En estos pacientes, la adhesión de las células LLC al endotelio es facilitada por la baja expresión de ephrinA4 en su superficie y los niveles altos de la isoforma soluble en suero el cual se une a la EphA2 de la célula endotelial. Como resultado, la adhesión al endotelio se lleva acabo facilitando las señales apoptóticas que, sin embargo, son contrarrestadas en las células LLC que se unen eficientemente a ICAM-1 y VCAM-1 inducida por la agregación de EphA2. Un mecanismo de acoplamiento de EphA2 a Caveolina-1 podría promover la ruta transcelular (TC) de la TEM.

2. Estudio de la TEM de las células LLC través de endotelio linfático (HDLEC)

El papel que juegan los endotelios linfáticos en la diseminación de la enfermedad no había sido estudiado hasta ahora. La presencia de adenopatías dentro de la misma cadena ganglionar en los pacientes nos hace pensar que la linfa podría jugar un importante papel en la diseminación de la enfermedad. En este aspecto,

encontramos que las células LLC pero no los LBP pueden quedar retenidas en los endotelios linfáticos inflamados bloqueando la trans-migración en respuesta a CCL19 y CXCL12, probablemente debido a una mayor adhesión en los casos LApos, pero no así en LANeg. Como mostraron los análisis de co-cultivos mediante microscopía, en los casos LApos este efecto probablemente puede ser causado por una mayor retención de las células LLC en los endotelios linfáticos estimulados, además los análisis de microscopía confocal en secciones de biopsias de linfadenopatías de pacientes con LLC mostraron un gran acumulo de células leucémicas en vasos linfáticos, sugiriendo, por tanto, que el proceso de diapédesis propiamente dicho está alterado en las células LLC pero no en su adhesión en este tipo de endotelios donde parecen quedar retenidas. De cualquier manera para poder afianzar estos hechos debemos aumentar un mayor número de pacientes debido al comportamiento tan heterogéneo de la enfermedad, además de nuevos experimentos que nos permitan afianzar esta conclusión.

El bloqueo en la TEM (4 horas) en respuesta a CCL19 y CXCL12 a través de HUVEC-TNF no había sido observado en estudios previos por nuestro laboratorio (Trinidad y cols. 2009) como sucedió en HDLEC-TNF, por lo que pensamos que estas diferencias entre endotelios pudieran darse por las moléculas implicadas en dicho proceso. El estudio de las moléculas de adhesión en las células HDLEC, reveló que la respuesta de las células endoteliales linfáticas a condiciones inflamatorias es semejante a la descrita para los endotelios sanguíneos, al menos en lo que se refiere a la inducción de expresión de ICAM-1. No obstante, la expresión de VCAM-1 es bastante débil si la comparamos con la de endotelios sanguíneos. VCAM-1 juega un papel crítico en la diapédesis de linfocitos a través de vasos sanguíneos por lo que su baja expresión en linfáticos podría representar una característica diferencial entre uno y otro tipo celular que, o bien, podría afectar a su capacidad para sustentar la TEM o, en su caso, otras moléculas podrían desempeñar ese papel.

De manera interesante en los ensayos TEM a 12 horas para estudiar la viabilidad se observó una respuesta favorable a los procesos quimiotácticos frente a CCL19 y CXCL12 tanto en los casos LApos y marcadamente mayor en LANeg sugiriendo

que la señal quimiotáctica a través de endotelios linfáticos requiera de más tiempo ya que los ensayos TEM a 4 horas no mostraron estos resultados. Además comprobamos, como lo habíamos mencionado que en pacientes con LApos las células LLC tienen más dificultad para trans-migrar, mientras que los casos LANeg parecen hacerlo de manera más eficaz evitando el acumulo de células leucémicas dentro de los vasos linfáticos.

Por otro lado también pudimos observar que en ambos casos de LA las células LLC de la fracción TM adquirirían señales de supervivencia mientras que en la fracción No-TM no se presentaron efectos sugiriendo que los endotelios linfáticos proporcionan viabilidad a las células LLC cuando atraviesan la monocapa.

Tras observar las diferencias en la TEM a través de HDLEC-TNF entre los casos LApos y LANeg, pensamos que la expresión de membrana de ephrinA4 probablemente juegue un importante papel como lo describimos en la presente tesis doctoral y con anterioridad a través de endotelios sanguíneos (Trinidad y cols. 2009). La expresión de los miembros de la familia de Eph/ephrin observada en las células endoteliales linfáticas (HDLEC) manifestó una gran semejanza a la previamente descrita en endoteliales sanguíneas (Alonso-Colmenar y cols. 2009, Trinidad y cols. 2009). Entre los miembros encontrados, cabe destacar una expresión considerable de EphA2 y EphB4 por lo que creemos que ephrinA4 expresada en las células LLC pudiera interactuar con este receptor en los endotelios linfáticos como lo hace en los endotelios sanguíneos previamente establecido por nuestro laboratorio (Trinidad y cols. 2009) y comprobado en la presente tesis doctoral en procesos TEM y de supervivencia de las células LLC. Mientras que para la interacción con EphB4 la expresión de ephrinB2 como posible ligando fue encontrada con niveles semejantes de expresión en ambos tipos de condición LA

En el estudio de las interacciones Eph/Ephrin describimos por primera vez como el bloqueo de los ligados con las proteínas recombinantes EphA-Fc2 y EphB4-Fc en las células LLC generaron una mayor viabilidad en las células tras-migradas de los casos LApos pero no así en LANeg en respuesta a CXCL12 por tanto el impedimento de la interacción célula LLC-Endotelio a través de ephrinA4 y ephrinB2 provee de señales de supervivencia, sugiriendo que las señales *reverse* a través de ephrinA4 y ephrinB2 en las células leucémicas intervienen con la señal a través de CXCR4 aportando una mayor viabilidad.

3. Estudio del papel de S1PR1 y su interacción con Eph/ephrin

Los mecanismos de salida de los linfocitos B desde los GL se centran en el estudio que involucra al receptor 1 de esfingosina fosfato (S1PR1) y su respuesta a S1P, presente en altas concentraciones en sangre y linfa pero bajas en tejidos linfoides (Yopp y cols. 2004, Schwab y cols. 2005, Lee y cols. 2007), sin embargo en la células LLC son pocos los estudios que se han centrado en la respuesta a S1P (Capitani y cols. 2012, Borge y cols. 2014, Sic y cols. 2014, Patrussi y cols. 2015, Till y cols. 2015).

Nuestros resultados corroboraron los resultados previos, que respecto a los LBP las células LLC muestran niveles bajos de expresión de S1PR1, pero son capaces de responder a S1P (Capitani y cols. 2012, Borge y cols. 2014, Patrussi y cols. 2015, Till y cols. 2015), sin embargo observamos que esta respuesta no es directamente proporcional a los niveles de expresión del receptor lo que nos hace pensar que existen otros mecanismos que junto con S1PR1 intervienen en su migración. Aunque estudios previos de TEM han descrito una correlación entre el índice de migración y la expresión de S1PR1, esto solo ocurrió con el tratamiento previo de inhibidores de quinasas (PI3 kinasa) pero no así en aquellas que no fueron sometidas al tratamiento (Till y cols. 2015). De cualquier manera tras estudiar la respuesta a S1P a través de monocapas de endotelio sanguíneo (HUVEC) y linfático (HDLEC) en ensayos de salida TEM (Basal-Apical), observamos, que las células LLC no responden a través de HUVEC en ambas condiciones de LA, pero si en HDLEC, magnificando su respuesta en los casos LANeg y cuando este se estimuló previamente con TNF- α . Estudios realizados de células LLC en respuesta a S1P no habían sido realizados a través de monocapas, pues solo uno había empleado HUVEC (Till y cols. 2015) en las que señalaban una ligera respuesta de las células LLC a S1P. Sin embargo a diferencia de nuestro estudio, ellos realizan la TEM (Apical-Basal) que simula un proceso de extravasación y no de salida como en el caso nuestro. Se ha demostrado que la señalización de S1P en HUVEC refuerza las uniones adherentes entre célula-célula manteniendo la integridad vascular del endotelio (Lee y cols. 1998), probablemente esta sea una de las causas de las diferencias observadas en los ensayos TEM (Apical-Basal) entre HUVEC y HDLEC. Además nuestros estudios muestran por primera vez el efecto en la supervivencia en ensayos *in vitro* donde observamos un aumento en las células LLC no-TM y

marcadamente mayor en las células TM, en HUVEC y HDLEC tanto en presencia y no de S1P por tanto podríamos pensar que los endotelios desde la parte basal de la célula aportan señales que favorecen la viabilidad de las células LLC.

Tras observar que ambas ephrin, A4 y B2 logran potenciar el efecto en la migración en respuesta a S1P, podríamos pensar que las señales *forward* generada en la células LLC a través de Eph, A2 y B4 podrían intervenir con la señal de S1PR1. Al realizar los ensayos con endotelios (TEM Basal – Apical) pudimos observar que las señales *forward* y *reverse a través de EphA2 y ephrinA4* potencian la respuesta a S1P a través de HUVEC-TNF pero no por HDLEC-TNF sin embargo cabe destacar que la señal *reverse* generada a través de *ephrinB2* en las células LLC potencializa la respuesta a S1P tanto en HUVEC-TNF y a mayor magnitud en HDLEC-TNF. Si bien, estudios han relacionado que la expresión de ephrinB2 en el endotelio promueve la migración de monocitos a través de EphB2 (Pfaff y cols. 2008), La interacción ephrinB2-EphB4 no había sido relacionada con el tráfico linfocitario. Actualmente se han desarrollado agentes terapéuticos actuando como inhibidores de *kinasas* como diana terapéutica, provocando una movilización de las células LLC desde el ganglio linfático hacia la sangre periférica, produciéndose una rápida linfocitosis y disminución de adenopatías en este tipo de paciente (Friedberg y cols. 2010, Hoellenriegel y cols. 2011, Advani y cols. 2013). Por lo tanto podríamos pensar que *EphrinB2* podría abrir una nueva vía de estudio en esta señalización como diana terapéutica para evitar la acumulación de estas células en los GL. Sin embargo estos estudios apenas son una aproximación temprana que requiere de un estudio más profundo.

4. Estudio de la interacción de S1PR1 con los receptores de quimiocinas CCR7 y CXCR4 y el papel de las señales Eph/ephrin

Tras observar que la respuesta de las células LLC a S1P no está directamente relacionada con los niveles de expresión de S1PR1, pensamos que los receptores de quimiocinas responsables de la infiltración y retención de las células LLC como CCR7 y/o CXCR4 (Burger y cols. 1999, Till y cols. 2002, Lopez-Giral y cols. 2004) pudieran jugar un papel de competencia junto con S1PR1 entre la retención y la salida del GL como lo han mencionado algunos autores en el estudio de linfocitos T (Yopp y cols. 2004, Yopp y cols. 2005, Cyster y Schwab 2012), la interacción entre estos dos tipos de

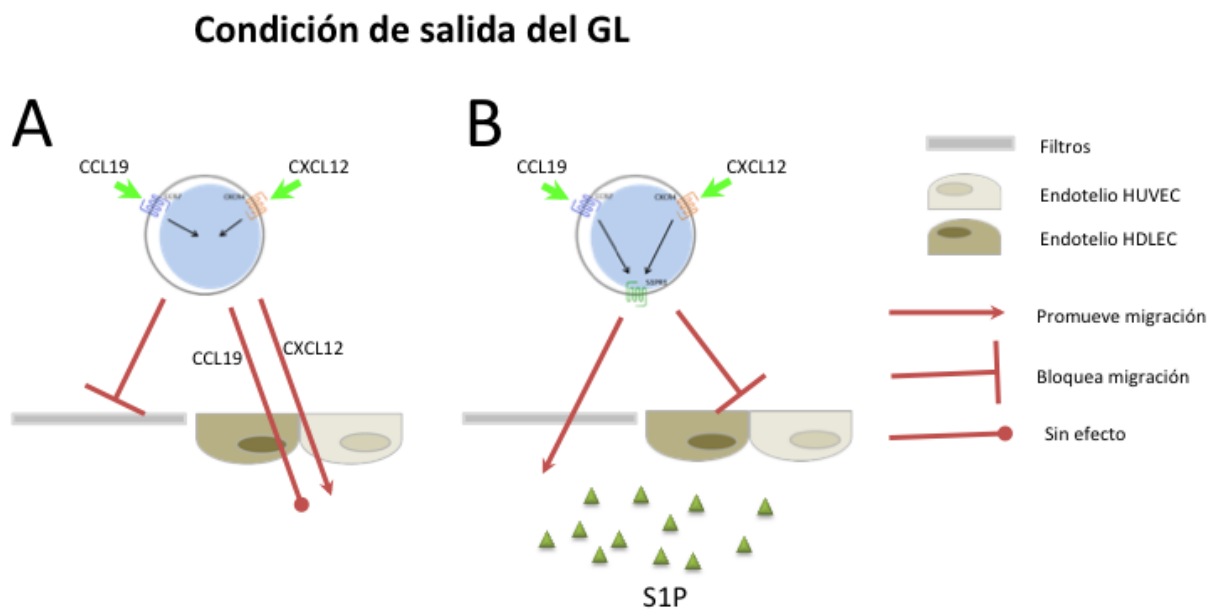
receptores GPCR aún no es del todo conocida. De cualquier manera hasta el momento no existen estudios de este tipo en la LLC.

En el estudio *in vitro* de simulación de salida del GL, los estímulos quimiotácticos con CCL19 y CXCL12 generaron una mayor respuesta a S1P, por lo tanto la internalización de CXCR4 y a mayor grado CCR7 aunque no son necesarias para que las células LLC respondan a S1P si magnifican de manera significativa la señal de S1PR1 en las células leucémicas. Estos resultados coinciden en la interacción entre estos receptores en ensayos similares realizados en linfocitos T cuando usaban S1P para estimular y migraban en respuesta a quimiocinas, demostrando la interacción de S1PR1 con ambos receptores quimiotácticos, además de señalar que linfocitos T procedentes de diferentes tejidos respondían de manera distinta a la quimiotaxis previamente estimulados con S1P (Yopp y cols. 2005).

Cuando estudiamos estas condiciones en ensayos TEM a través de endotelios HUVEC y HDLEC (Basal-Apical) observamos que no son del todo reproducibles con lo observado en filtros. En el estudio de salida la internalización de CCR7 y CXCR4 genera un bloqueo en la TEM en HUVEC y HDLEC en respuesta a S1P interfiriendo probablemente con la señal hacia S1PR1. Esto nos llevó a descubrir que los estímulos con las quimiocinas generaban una mayor adhesión coincidiendo con una mayor TEM en ambos tipos de endotelio. Sin embargo tras comparar esta adhesión con la generada por la respuesta a S1P bajo los estímulos señalados (no mostrado) observamos que la adhesión fue menor, por lo tanto podríamos pensar que la interacción de CCR7-S1PR1 y CXCR4-S1PR1 generen una repulsión provocando un defecto en la adhesión de las células LLC, por tanto podemos deducir que la señal de S1P generada en el endotelio impide la adhesión de las células LLC y por tanto su TEM.

Aunque estudios previos con linfocitos T señalaban que estos estímulos se comportan de manera muy similar a través de filtros y TEM (basal-Apical) difiriendo solo en la magnitud pero no en los efectos generados (Yopp y cols. 2005) nuestros resultados con LLC parecen no comportarse de la misma manera, cabe señalar que a diferencia de ellos nosotros dejamos el estímulo en el pocillo superior mientras que ellos lo retiraron tras un lavado, por lo tanto probablemente el dejar las quimiocinas CCL19 y CXCL12 podrían estar provocando señales en los endotelios que interfieran

con la de S1P, a pesar de ello consideramos adecuado no retirarlas pues en condiciones fisiológicas las concentraciones de CCL19 y CXCL12 son altas en el tejido linfóide mientras que la concentración de S1P está más elevada en la sangre periférica y la linfa. Un resumen de estos hallazgos se explican en la figura 57 A-B.



57. Efectos de la interacción de S1PR1 con los receptores de quimiocinas CCR7 y CXCR4 en las condiciones simuladas de salida desde el GL.

A-B) Migración y TEM a través de filtros y endotelios estimulados con TNF- α . Condiciones de salida en migración espontánea (A) y en respuesta a S1P(B). A) La internalización de CCR7 y CXCR4 provocaron una retención de las células LLC a través de filtros impidiendo su migración pero con endotelios HUVEC y HDLEC el estímulo con CXCL12 provocó una mayor TEM, no así CCL19 la cual no generó efecto. B) La internalización de CCR7 y CXCR4 intervienen con el receptor S1PR1 promoviendo una mayor migración a través de filtros, pero la bloquean con ambos tipos de endotelio. Los símbolos utilizados se describen en la parte derecha de la imagen.

También en estos resultados demostramos la interacción entre los receptores CCR7-S1PR1 y CXCR4-S1PR1, ya que los análisis por citometría de flujo mostraron un aumento en la expresión de S1PR1 en las células LLC cuando estas fueron estimuladas con CCL19 y CXCL12

En este sentido las señales de las interacciones EphA2-ephrinA4 y EphB4-ephrinB2 promueven una mayor migración en respuesta a S1P a través de filtros tras la internalización de CXCR4 pero no así con CCR7. De manera interesante nuestros resultados demuestran el importante papel de las señalizaciones de EphA2-ephrinA4 y EphB4-ephrinB2 ya que parecen revertir los efectos del bloqueo en la TEM por las

interacciones S1PR1 con CCR7 y CXCR4 antes descritos en los procesos de salida, provocando una mayor TEM. Tanto las señales *forward* y *reverse* parecen participar más directamente con la señal de CXCR4 que con CCR7. Sin embargo cabe destacar claras diferencias entre endotelios HUVEC y HDLEC, sobre todo en su intervención con CXCR4, en HUVEC existe una mayor participación de la señal *forward* en el endotelio a través de EphA2, mientras que por HDLEC la señal *reverse* en las células LLC a través de *ephrinB2* parece ser mayor. Un resumen de estos hallazgos se explican en la figura 58 A-B.

Efectos de Eph/ephrin en condición simulada de salida del GL

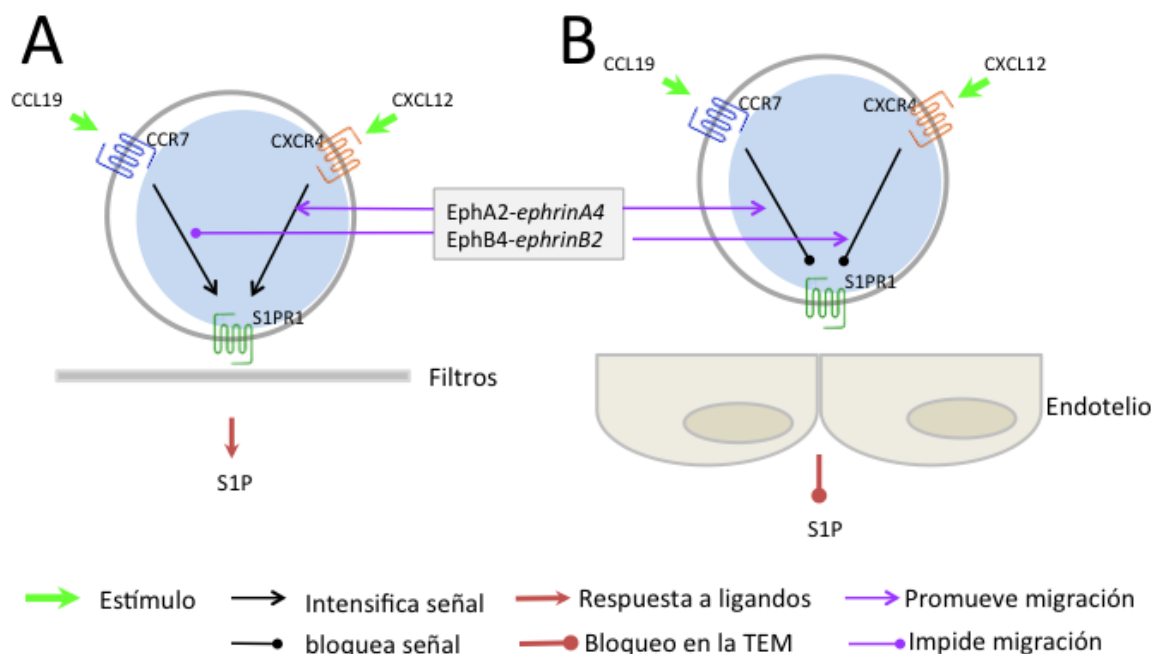


Figura 58. Esquema representativo de la interacción de S1PR1 con los receptores de quimiocinas CCR7 y CXCR4 y los efectos provocados por las señalizaciones de Eph/ephrin en condiciones simuladas de salida desde el GL.

A-B) Efecto de los estímulos de CCL19, CXCL12 en respuesta a S1P en la migración (A) y TEM (Basal-Apical) (B) de las células LLC. A) La internalización de los receptores CCR7 y CXCR4 tras el estímulo con su respectiva quimioquina genera una señal que intensifica la generada por S1PR1 por si solo y aumentan la migración en respuesta a S1P. Las señales de EphA2-ephrinA4 y EphB4-ephrinB2 intervienen, por un lado promoviendo una mayor migración al interactuar con la señal generada por CXCR4 y por otro inhibiendo la señal generada por CCR7. B) Efectos de los estímulos de CCL19 y CXCL12 en condiciones de salida a través de HUVEC y HDLEC. La internalización de CCR7 y CXCR4 provocaron un bloqueo en la TEM en condiciones de salida en respuesta a S1P. En este procesos la señalización *forward* y *reverse* a través de Eph/ephrin en ambos endotelios interviene revirtiendo los efectos del bloqueo, promoviendo una mayor TEM de las células LLC en condiciones de salida con efecto marcadamente mayor a través de CXCR4.

Por tanto en conjunto estos resultados mostraron que las señales EphA2-ephrinA4 y EphB4-ephrinB2 junto con la internalización de CCR7 y en mayor medida de CXCR4 generan en S1PR1 una ventaja en la respuesta a su ligando en procesos de salida de las células LLC. Sin embargo, es importante reconocer y señalar que estas son apenas unas aproximaciones en las que se deberá profundizar más para el buen entendimiento de los mecanismos involucrados.

A pesar de que los estudios de la diseminación de las células LLC a través de endotelios linfáticos y los procesos simulados *in vitro* de salida desde el GL a través de endotelios linfáticos y sanguíneos son preliminares, podemos observar que los resultados muestran que la fosforilación provocada por las señales de Eph/ephrin aunque no del todo claras, intervienen de alguna manera en los mecanismos de interacción entre esta familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) como CCR7-S1PR1 y CXCR4-S1PR1. Por lo que abre una nueva alternativa de estudio que pudiera ayudar primero, a entender la biología de estos mecanismos y segundo la prevención de la presencia de linfadenopatías en pacientes de LLC que pudieran afectar su calidad de vida e incluso llevarlos a la muerte. Aún queda mucho por hacer al respecto con experimentos que nos permitan obtener datos más concretos respecto a estos mecanismos de interacción.



Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Las células LLC pero no los linfocitos B sanos, pueden sufrir apoptosis a través de los contactos físicos con endotelios estimulados con TNF- α durante la migración trans-endotelial (TEM) a través de endotelios sanguíneos.
2. Células LLC de pacientes con adenopatía (LApos) presentan una mayor supervivencia durante la TEM mediada por las cadenas de integrinas $\alpha 4$ y αL estableciendo una relación entre la extravasación y la supervivencia de las células leucémicas.
3. La expresión de la isoforma de membrana de *ephrinA4* en las células LLC contrarresta las interacciones de integrinas escapando de las señales apoptóticas, mientras que la fracción soluble de la *ephrinA4* unida al endotelio potencializa la supervivencia de las células LLC en los casos LApos mediante la inducción de la TEM a través de la ruta trans-celular.
4. La unión de la *ephrinA4* soluble al endotelio a través de EphA2, surge como un mecanismo fundamental que promueve la TEM y la supervivencia en los casos de LApos en la que *ephrinA4* es capaz de inhibir la alta afinidad de estados conformacionales de las integrinas a través del secuestro físico en la superficie celular en lugar de su internalización.
5. Células LLC de pacientes LApos presentan una menor capacidad de trans-migración que los casos LANeg, mientras que ambas condiciones de LA parecen recibir señales de supervivencia después de la diapédesis a través de endotelios linfáticos (HDLEC-TNF- α).
6. Los estímulos quimiotácticos de CCL19 y CXCL12 junto con las señales bidireccionales de las Eph/ephrin provocan una mayor expresión de S1PR1 y por siguiente una mayor trans-migración (basal-Apical) a través de HUVEC-TNF y HDLEC-TNF.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

(1997). "Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee." *Cell* 90(3): 403-404.

Aasheim, H. C., E. Munthe, S. Funderud, E. B. Smeland, K. Beiske y T. Logtenberg (2000). "A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes." *Blood* 95(1): 221-230.

Advani, R. H., J. J. Buggy, J. P. Sharman, S. M. Smith, T. E. Boyd, B. Grant, K. S. Kolibaba, R. R. Furman, S. Rodriguez, B. Y. Chang, J. Sukbuntherng, R. Izumi, A. Hamdy, E. Hedrick y N. H. Fowler (2013). "Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Has Significant Activity in Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies." *Journal of Clinical Oncology* 31(1): 88-94.

Alonso, C. L., E. M. Trinidad, B. De Garcillan, M. Ballesteros, M. Castellanos, I. Cotillo, J. J. Munoz y A. G. Zapata (2009). "Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells." *Leuk Res* 33(3): 395-406.

Alonso-Colmenar, L. M., E. M. Trinidad, B. De Garcillan, M. Ballesteros, M. Castellanos, I. Cotillo, J. J. Munoz y A. G. Zapata (2009). "Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells." *Leuk Res* 33(3): 395-406.

Astin, J. W., J. Batson, S. Kadir, J. Charlet, R. A. Persad, D. Gillatt, J. D. Oxley y C. D. Nobes (2010). "Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells." *Nat Cell Biol* 12(12): 1194-1204.

Badoux, X., C. Bueso-Ramos, D. Harris, P. Li, Z. Liu, J. Burger, S. O'brien, A. Ferrajoli, M. J. Keating y Z. Estrov (2011). "Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and bone marrow endothelial cells: role of signal transducer and activator of transcription 3." *Hum Pathol* 42(12): 1989-2000.

Baeyens, A., V. Fang, C. Chen y S. R. Schwab (2015). "Exit Strategies: S1P Signaling and T Cell Migration." *Trends Immunol* 36(12): 778-787.

Battle, E., J. Bacani, H. Begthel, S. Jonkheer, A. Gregorieff, M. Van De Born, N. Malats, E. Sancho, E. Boon, T. Pawson, S. Gallinger, S. Pals y H. Clevers (2005). "EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression." *Nature* 435(7045): 1126-1130.

Beckmann, M. P., D. P. Cerretti, P. Baum, T. Vanden Bos, L. James, T. Farrah, C. Kozlosky, T. Hollingsworth, H. Shilling, E. Maraskovsky y Et Al. (1994). "Molecular characterization of a family of ligands for eph-related tyrosine kinase receptors." *EMBO J* 13(16): 3757-3762.

Binet, J. L., A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Pigué, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M. T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbès y F. Gremy (1981). "A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis." *Cancer* 48(1): 198-206.

Bono, M. R., R. Elgueta, D. Sauma, K. Pino, F. Osorio, P. Michea, A. Fierro y M. Roseblatt (2007). "The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing." *Cytokine Growth Factor Rev* 18(1-2): 33-43.

Borge, M., F. R. Lenicov, P. R. Nannini, M. M. D. Alicandu, E. Podaza, A. Ceballos, H. F. Grecco, M. Cabrejo, R. F. Bezares, P. E. Morande, P. Oppezio, M. Giordano y R. Gamberale (2014). "The Expression of Sphingosine-1 Phosphate Receptor-1 in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Impaired by Tumor Microenvironmental Signals and Enhanced by Piceatannol and R406." *Journal of Immunology* 193(6): 3165-3174.

Borthwick, N. J., A. A. Akbar, C. Buckley, D. Pilling, M. Salmon, A. P. Jewell y K. L. Yong (2003). "Transendothelial migration confers a survival advantage to activated T lymphocytes: role of LFA-1/ICAM-1 interactions." *Clin Exp Immunol* 134(2): 246-252.

Boyd, A. W., P. F. Bartlett y M. Lackmann (2014). "Therapeutic targeting of EPH receptors and their ligands." *Nature Reviews Drug Discovery* 13(1): 39-62.

Buggins, A. G., C. Pepper, P. E. Patten, S. Hewamana, S. Gohil, J. Moorhead, N. Folarin, D. Yallop, N. S. Thomas, G. J. Mufti, C. Fegan y S. Devereux (2010). "Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription." *Cancer Res* 70(19): 7523-7533.

Burger, J. A. (2011). "Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 96-103.

Burger, J. A. (2012). "Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape." *Curr Opin Oncol* 24(6): 643-649.

Burger, J. A. (2013). "The CLL cell microenvironment." *Adv Exp Med Biol* 792: 25-45.

Burger, J. A., M. Burger y T. J. Kipps (1999). "Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells." *Blood* 94(11): 3658-3667.

Burger, J. A. y J. G. Gribben (2014). "The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: Insight into disease biology and new targeted therapies." *Seminars in Cancer Biology* 24: 71-81.

Campbell, T. N., A. Davy, Y. Liu, M. Arcellana-Panlilio y S. M. Robbins (2008). "Distinct membrane compartmentalization and signaling of ephrin-A5 and ephrin-B1." *Biochem Biophys Res Commun* 375(3): 362-366.

Capitani, N., L. Patrussi, L. Trentin, O. M. Lucherini, E. Cannizzaro, E. Migliaccio, F. Frezzato, C. Gattazzo, F. Forconi, P. Pelicci, G. Semenzato y C. T. Baldari (2012). "S1P1 expression is controlled by the pro-oxidant activity of p66Shc and is impaired in B-CLL patients with unfavorable prognosis." *Blood* 120(22): 4391-4399.

- Carman, C. V. y T. A. Springer** (2004). "A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them." *J Cell Biol* 167(2): 377-388.
- Castano, J., V. Davalos, S. Schwartz, Jr. y D. Arango** (2008). "EPH receptors in cancer." *Histol Histopathol* 23(8): 1011-1023.
- Charmsaz, S., K. Beckett, F. M. Smith, C. Bruedigam, A. S. Moore, F. Al-Ejeh, S. W. Lane y A. W. Boyd** (2015). "EphA2 Is a Therapy Target in EphA2-Positive Leukemias but Is Not Essential for Normal Hematopoiesis or Leukemia." *Plos One* 10(6).
- Crespo, M., F. Bosch, N. Villamor, B. Bellosillo, D. Colomer, M. Rozman, S. Marce, A. Lopez-Guillermo, E. Campo y E. Montserrat** (2003). "ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia." *New England Journal of Medicine* 348(18): 1764-1775.
- Cyster, J. G. y S. R. Schwab** (2012). "Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs." *Annual Review of Immunology*, Vol 30 30: 69-94.
- D'arena, G., N. Di Renzo, M. Brugiattelli, M. L. Vigliotti y M. J. Keating** (2003). "Biological and clinical heterogeneity of B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Leuk Lymphoma* 44(2): 223-228.
- Damle, R. N., T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S. L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, S. M. Lichtman, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, K. R. Rai, M. Ferrarini y N. Chiorazzi** (1999). "Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 94(6): 1840-1847.
- Dauids, M. S. y J. R. Brown** (2012). "Targeting the B cell receptor pathway in chronic lymphocytic leukemia." *Leuk Lymphoma* 53(12): 2362-2370.
- Dauids, M. S. y J. A. Burger** (2012). "Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Open J Hematol* 3(S1).
- Davy, A. y P. Soriano** (2005). "Ephrin signaling in vivo: look both ways." *Dev Dyn* 232(1): 1-10.
- Dohner, H., S. Stilgenbauer, K. Dohner, M. Bentz y P. Lichter** (1999). "Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis." *J Mol Med (Berl)* 77(2): 266-281.
- Dunne, P. D., S. Dasgupta, J. K. Blayney, D. G. Mcart, K. L. Redmond, J. A. Weir, C. A. Bradley, T. Sasazuki, S. Shirasawa, T. T. Wang, S. Srivastava, C. W. Ong, K. Arthur, M. Salto-Tellez, R. H. Wilson, P. G. Johnston y S. Van Schaeybroeck** (2016). "EphA2 Expression Is a Key Driver of Migration and Invasion and a Poor Prognostic Marker in Colorectal Cancer." *Clinical Cancer Research* 22(1): 230-242.
- Eksioglu-Demiralp, E., O. Alpdogan, M. Aktan, T. Firatli, A. Ozturk, T. Budak, M. Bayik y T. Akoglu** (1996). "Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages." *Leukemia* 10(8): 1331-1339.

Ferrero, E., D. Belloni, P. Contini, C. Foglieni, M. E. Ferrero, M. Fabbri, A. Poggi y M. R. Zocchi (2003). "Transendothelial migration leads to protection from starvation-induced apoptosis in CD34+CD14+ circulating precursors: evidence for PECAM-1 involvement through Akt/PKB activation." *Blood* 101(1): 186-193.

Fiorcari, S., W. S. Brown, B. W. McIntyre, Z. Estrov, R. Maffei, S. O'brien, M. Sivina, J. Hoellenriegel, W. G. Wierda, M. J. Keating, W. Ding, N. E. Kay, B. J. Lannutti, R. Marasca y J. A. Burger (2014). "The PI3-kinase delta inhibitor idelalisib (GS-1101) targets integrin-mediated adhesion of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell to endothelial and marrow stromal cells." *PLoS One* 8(12): e83830.

Friedberg, J. W., J. Sharman, J. Sweetenham, P. B. Johnston, J. M. Vose, A. Lacasce, J. Schaefer-Cuttillo, S. De Vos, R. Sinha, J. P. Leonard, L. D. Cripe, S. A. Gregory, M. P. Sterba, A. M. Lowe, R. Levy y M. A. Shipp (2010). "Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 115(13): 2578-2585.

Gale, N. W., S. J. Holland, D. M. Valenzuela, A. Flenniken, L. Pan, T. E. Ryan, M. Henkemeyer, K. Strebhardt, H. Hirai, D. G. Wilkinson, T. Pawson, S. Davis y G. D. Yancopoulos (1996). "Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis." *Neuron* 17(1): 9-19.

Garcia-Bernal, D., J. Redondo-Munoz, A. Dios-Esponera, R. Chevre, E. Bailon, M. Garayoa, N. Arellano-Sanchez, N. C. Gutierrez, A. Hidalgo, A. Garcia-Pardo y J. Teixido (2013). "Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving alpha4beta1 integrin function." *J Pathol* 229(1): 36-48.

Gattei, V., P. Bulian, M. I. Del Principe, A. Zucchetto, L. Maurillo, F. Buccisano, R. Bomben, M. Dal-Bo, F. Luciano, F. M. Rossi, M. Degan, S. Amadori y G. Del Poeta (2008). "Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 111(2): 865-873.

Ghia, P. y F. Caligaris-Cappio (2000). "The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms." *Adv Cancer Res* 79: 157-173.

Ghia, P., N. Chiorazzi y K. Stamatopoulos (2008). "Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation." *J Intern Med* 264(6): 549-562.

Hallek, M. (2015). "Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment." *Am J Hematol* 90(5): 446-460.

Hamblin, T. (2002). "Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two?" *Ann Hematol* 81(6): 299-303.

Hamblin, T. J., Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier y F. K. Stevenson (1999). "Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 94(6): 1848-1854.

Hartmann, T. N., V. Grabovsky, W. Wang, P. Desch, G. Rubenzer, S. Wollner, I. Binsky, A. Vallon-Eberhard, A. Sapoznikov, M. Burger, I. Shachar, M. Haran, M. Honczarenko, R. Greil y R. Alon (2009). "Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow." *Cancer Res* 69(7): 3121-3130.

- Hoellenriegel, J., S. A. Meadows, M. Sivina, W. G. Wierda, H. Kantarjian, M. J. Keating, N. Giese, S. O'Brien, A. Yu, L. L. Miller, B. J. Lannutti y J. A. Burger** (2011). "The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 118(13): 3603-3612.
- Hordijk, P. L.** (2016). "Recent insights into endothelial control of leukocyte extravasation." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(8): 1591-1608.
- Husa, A. M., A. A. Magi, M. Larsson, T. Fornander y G. Perez-Tenorio** (2016). "EPH/ephrin profile and EPHB2 expression predicts patient survival in breast cancer." *Oncotarget*.
- Huusko, P., D. Ponciano-Jackson, M. Wolf, J. A. Kiefer, D. O. Azorsa, S. Tuzmen, D. Weaver, C. Robbins, T. Moses, M. Allinen, S. Hautaniemi, Y. Chen, A. Elkahloun, M. Basik, G. S. Bova, L. Bubendorf, A. Lugli, G. Sauter, J. Schleutker, H. Ozcelik, S. Elowe, T. Pawson, J. M. Trent, J. D. Carpten, O. P. Kallioniemi y S. Mousnes** (2004). "Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer." *Nat Genet* 36(9): 979-983.
- Kabashima, K., N. M. Haynes, Y. Xu, S. L. Nutt, M. L. Allende, R. L. Proia y J. G. Cyster** (2006). "Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism." *J Exp Med* 203(12): 2683-2690.
- Kania, A. y R. Klein** (2016). "Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(4): 240-256.
- Keating, M. J., N. Chiorazzi, B. Messmer, R. N. Damle, S. L. Allen, K. R. Rai, M. Ferrarini y T. J. Kipps** (2003). "Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 153-175.
- Kehrl, J. H., I. Y. Hwang y C. Park** (2009). "Chemoattract receptor signaling and its role in lymphocyte motility and trafficking." *Curr Top Microbiol Immunol* 334: 107-127.
- Kertesz, N., V. Krasnoperov, R. Reddy, L. Leshanski, S. R. Kumar, S. Zozulya y P. S. Gill** (2006). "The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth." *Blood* 107(6): 2330-2338.
- Kullander, K., S. J. Butt, J. M. Le Bret, L. Lundfald, C. E. Restrepo, A. Rydstrom, R. Klein y O. Kiehn** (2003). "Role of EphA4 and EphrinB3 in local neuronal circuits that control walking." *Science* 299(5614): 1889-1892.
- Kullander, K., S. D. Croll, M. Zimmer, L. Pan, J. McClain, V. Hughes, S. Zabski, T. M. Dechiara, R. Klein, G. D. Yancopoulos y N. W. Gale** (2001). "Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control." *Genes Dev* 15(7): 877-888.
- Kullander, K. y R. Klein** (2002). "Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(7): 475-486.
- Lagneaux, L., A. Delforge, D. Bron, C. De Bruyn y P. Stryckmans** (1998). "Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells." *Blood* 91(7): 2387-2396.
- Lagneaux, L., A. Delforge, C. De Bruyn, M. Bernier y D. Bron** (1999). "Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells." *Leuk Lymphoma* 35(5-6): 445-453.

Larson, J., S. Schomberg, W. Schroeder y T. C. Carpenter (2008). "Endothelial EphA receptor stimulation increases lung vascular permeability." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295(3): L431-439.

Ledgerwood, L. G., G. Lal, N. Zhang, A. Garin, S. J. Esses, F. Ginhoux, M. Merad, H. Peche, S. A. Lira, Y. Z. Ding, Y. Yang, X. X. He, E. H. Schuchman, M. L. Allende, J. C. Ochando y J. S. Bromberg (2008). "The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics." *Nature Immunology* 9(1): 42-53.

Lee, M. J., J. R. Van Brocklyn, S. Thangada, C. H. Liu, A. R. Hand, R. Menzeleev, S. Spiegel y T. Hla (1998). "Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein coupled receptor EDG-1." *Science* 279(5356): 1552-1555.

Lee, Y. M., K. Venkataraman, S. I. Hwang, D. K. Han y T. Hla (2007). "A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC)." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 84(3-4): 154-162.

Li, S., Z. Wu, Y. Chen, Z. Kang, H. Wang, P. He, X. Zhang, T. Hu, Q. Zhang, Y. Cai, X. Xu y M. Guan (2015). "Diagnostic and prognostic value of tissue and circulating levels of Ephrin-A2 in prostate cancer." *Tumour Biol* 37(4): 5365-5374.

Long, B. W., P. L. Witte, G. N. Abraham, S. A. Gregory y J. M. Plate (1995). "Apoptosis and interleukin 7 gene expression in chronic B-lymphocytic leukemia cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5): 1416-1420.

Lopez-Giral, S., N. E. Quintana, M. Cabrerizo, M. Alfonso-Perez, M. Sala-Valdes, V. G. De Soria, J. M. Fernandez-Ranada, E. Fernandez-Ruiz y C. Munoz (2004). "Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination." *J Leukoc Biol* 76(2): 462-471.

Lv, J., Q. Xia, J. Wang, Q. Shen, J. Zhang y X. Zhou (2016). "EphB4 promotes the proliferation, invasion, and angiogenesis of human colorectal cancer." *Exp Mol Pathol* 100(3): 402-408.

Maffei, R., S. Fiorcari, J. Bulgarelli, S. Martinelli, I. Castelli, S. Deaglio, G. Debbia, M. Fontana, V. Coluccio, G. Bonacorsi, P. Zucchini, F. Narni, G. Torelli, M. Luppi y R. Marasca (2012). "Physical contact with endothelial cells through beta(1)- and beta(2)- integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells." *Haematologica-the Hematology Journal* 97(6): 952-960.

Martinez-Moreno, M., M. Leiva, N. Aguilera-Montilla, S. Sevilla-Movilla, S. Isern De Val, N. Arellano-Sanchez, N. C. Gutierrez, R. Maldonado, J. Martinez-Lopez, I. Buno, J. A. Garcia-Marco, P. Sanchez-Mateos, A. Hidalgo, A. Garcia-Pardo y J. Teixido (2015). "In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins." *Leukemia*.

Matloubian, M., C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia y J. G. Cyster (2004). "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." *Nature* 427(6972): 355-360.

- Mcgettrick, H. M., J. M. Lord, K. Q. Wang, G. E. Rainger, C. D. Buckley y G. B. Nash** (2006). "Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium." *J Leukoc Biol* 79(4): 779-788.
- Merlos-Suarez, A. y E. Batlle** (2008). "Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer." *Curr Opin Cell Biol* 20(2): 194-200.
- Miao, B. C., Z. Y. Ji, L. Tan, M. Taylor, J. M. Zhang, H. G. Choi, D. T. Frederick, R. Kumar, J. A. Wargo, K. T. Flaherty, N. S. Gray y H. Tsao** (2015). "EPHA2 Is a Mediator of Vemurafenib Resistance and a Novel Therapeutic Target in Melanoma." *Cancer Discovery* 5(3): 274-287.
- Miao, H. y B. Wang** (2011). "EphA receptor signaling--complexity and emerging themes." *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 16-25.
- Millan, J., L. Hewlett, M. Glyn, D. Toomre, P. Clark y A. J. Ridley** (2006). "Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains." *Nat Cell Biol* 8(2): 113-123.
- Mionnet, C., S. L. Sanos, I. Mondor, A. Jorquera, J. P. Laugier, R. N. Germain y M. Bajenoff** (2011). "High endothelial venules as traffic control points maintaining lymphocyte population homeostasis in lymph nodes." *Blood* 118(23): 6115-6122.
- Miyasaka, M. y T. Tanaka** (2004). "Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas." *Nat Rev Immunol* 4(5): 360-370.
- Moreno, A., M. L. Villar, C. Camara, R. Luque, C. Cespon, P. Gonzalez-Porque, G. Roy, J. Lopez-Jimenez, A. Bootello y E. R. Santiago** (2001). "Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells." *Blood* 97(1): 242-249.
- Moreno, C. y E. Montserrat** (2008). "New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia." *Blood Rev* 22(4): 211-219.
- Muller, W. A.** (2009). "Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes." *Circ Res* 105(3): 223-230.
- Muller, W. A. y F. W. Luscinskas** (2008). "Assays of transendothelial migration in vitro." *Methods Enzymol* 443: 155-176.
- Munk Pedersen, I. y J. Reed** (2004). "Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells." *Leuk Lymphoma* 45(12): 2365-2372.
- Munoz, J. J., D. Alfaro, J. Garcia-Ceca, C. L. Alonso, E. Jimenez y A. Zapata** (2006). "Thymic alterations in EphA4-deficient mice." *J Immunol* 177(2): 804-813.
- Munoz, J. J., C. L. Alonso, R. Sacedon, T. Crompton, A. Vicente, E. Jimenez, A. Varas y A. G. Zapata** (2002). "Expression and function of the Eph A receptors and their ligands ephrins A in the rat thymus." *J Immunol* 169(1): 177-184.
- Noren, N. K. y E. B. Pasquale** (2007). "Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer." *Cancer Res* 67(9): 3994-3997.

O'brien, S. y N. E. Kay "Maintenance therapy for B-chronic lymphocytic leukemia." *Clin Adv Hematol Oncol* 9(1): 22-31.

Pappu, R., S. R. Schwab, I. Cornelissen, J. P. Pereira, J. B. Regard, Y. Xu, E. Camerer, Y. W. Zheng, Y. Huang, J. G. Cyster y S. R. Coughlin (2007). "Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate." *Science* 316(5822): 295-298.

Pasquale, E. B. (2008). "Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease." *Cell* 133(1): 38-52.

Pasquale, E. B. (2010). "Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond." *Nat Rev Cancer* 10(3): 165-180.

Patrussi, L., N. Capitani, V. Martini, M. Pizzi, V. Trimarco, F. Frezzato, F. Marino, G. Semenzato, L. Trentin y C. T. Baldari (2015). "Enhanced Chemokine Receptor Recycling and Impaired S1P1 Expression Promote Leukemic Cell Infiltration of Lymph Nodes in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Cancer Res* 75(19): 4153-4163.

Peng, J., Q. Wang, H. Liu, M. Ye, X. Wu y L. Guo (2016). "EPHA3 regulates the multidrug resistance of small cell lung cancer via the PI3K/BMX/STAT3 signaling pathway." *Tumour Biol.*

Pfaff, D., M. Heroult, M. Riedel, Y. Reiss, R. Kirmse, T. Ludwig, T. Korff, M. Hecker y H. G. Augustin (2008). "Involvement of endothelial ephrin-B2 in adhesion and transmigration of EphB-receptor-expressing monocytes." *Journal of Cell Science* 121(22): 3842-3850.

Pham, T. H., T. Okada, M. Matloubian, C. G. Lo y J. G. Cyster (2008). "S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress." *Immunity* 28(1): 122-133.

Plate, J. M., B. W. Long y S. B. Kelkar (2000). "Role of beta2 integrins in the prevention of apoptosis induction in chronic lymphocytic leukemia B cells." *Leukemia* 14(1): 34-39.

Rai, K. R., A. Sawitsky, E. P. Cronkite, A. D. Chanana, R. N. Levy y B. S. Pasternack (1975). "Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 46(2): 219-234.

Rivera, J., R. L. Proia y A. Olivera (2008). "The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity." *Nat Rev Immunol* 8(10): 753-763.

Saito, Y., T. Owaki, T. Matsunaga, M. Saze, S. Miura, M. Maeda, M. Eguchi, R. Tanaka, J. Taira, H. Kodama, S. Goto, Y. Niitsu, H. Terada y F. Fukai (2009). "Apoptotic death of hematopoietic tumor cells through potentiated and sustained adhesion to fibronectin via VLA-4." *J Biol Chem* 285(10): 7006-7015.

Schnoor, M., P. Alcaide, M. B. Voisin y J. D. Van Buul (2015). "Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation." *Mediators Inflamm* 2015: 946509.

Schwab, S. R., J. P. Pereira, M. Matloubian, Y. Xu, Y. Huang y J. G. Cyster (2005). "Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients." *Science* 309(5741): 1735-1739.

Sic, H., H. Kraus, J. Madl, K. A. Flittner, A. L. Von Munchow, K. Pieper, M. Rizzi, A. K. Kienzler, K. Ayata, S. Rauer, B. Kleuser, U. Salzer, M. Burger, K. Zirlik, V. Lougaris, A. Plebani, W. Romer, C. Loeffler, S. Scaramuzza, A. Villa, E. Noguchi, B. Grimbacher y H. Eibel (2014). "Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134(2): 420-+.

Slattery, M. J. y C. Dong (2003). "Neutrophils influence melanoma adhesion and migration under flow conditions." *Int J Cancer* 106(5): 713-722.

Steube, K. G., C. Meyer, S. Habig, C. C. Uphoff y H. G. Drexler (1999). "Expression of receptor tyrosine kinase HTK (hepatoma transmembrane kinase) and HTK ligand by human leukemia-lymphoma cell lines." *Leuk Lymphoma* 33(3-4): 371-376.

Stupack, D. G. (2005). "Integrins as a distinct subtype of dependence receptors." *Cell Death Differ* 12(8): 1021-1030.

Stupack, D. G., X. S. Puente, S. Boutsaboualoy, C. M. Storgard y D. A. Cheresh (2001). "Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins." *J Cell Biol* 155(3): 459-470.

Takahashi, Y., M. Itoh, N. Nara y S. Tohda (2014). "Effect of EPH-ephrin signaling on the growth of human leukemia cells." *Anticancer Res* 34(6): 2913-2918.

Ten Hacken, E. y J. A. Burger (2016). "Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment." *Biochim Biophys Acta* 1863(3): 401-413.

Till, K. J., R. J. Harris, A. Linford, D. G. Spiller, M. Zuzel y J. C. Cawley (2008). "Cell motility in chronic lymphocytic leukemia: defective Rap1 and alpha4beta2 activation by chemokine." *Cancer Res* 68(20): 8429-8436.

Till, K. J., K. Lin, M. Zuzel y J. C. Cawley (2002). "The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes." *Blood* 99(8): 2977-2984.

Till, K. J., A. R. Pettitt y J. R. Slupsky (2015). "Expression of Functional Sphingosine-1 Phosphate Receptor-1 Is Reduced by B Cell Receptor Signaling and Increased by Inhibition of PI3 Kinase delta but Not SYK or BTK in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells." *Journal of Immunology* 194(5): 2439-2446.

Till, K. J., D. G. Spiller, R. J. Harris, H. Chen, M. Zuzel y J. C. Cawley (2005). "CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium." *Blood* 105(12): 4813-4819.

Trinidad, E. M., M. Ballesteros, J. Zuloaga, A. Zapata y L. M. Alonso-Colmenar (2009). "An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression." *Blood* 114(24): 5081-5090.

Trinidad, E. M., A. G. Zapata y L. M. Alonso-Colmenar (2010). "Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration." *Cell Adh Migr* 4(3): 363-367.

Van Dongen, J. J., A. W. Langerak, M. Bruggemann, P. A. Evans, M. Hummel, F. L. Lavender, E. Delabesse, F. Davi, E. Schuurig, R. Garcia-Sanz, J. H. Van Krieken, J. Droese, D. Gonzalez, C. Bastard, H. E. White, M. Spaargaren, M. Gonzalez, A. Parreira, J. L. Smith, G. J. Morgan, M. Kneba y E. A. Macintyre (2003). "Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936." *Leukemia* 17(12): 2257-2317.

Vihanto, M. M., C. Vindis, V. Djonov, D. P. Cerretti y U. Huynh-Do (2006). "Caveolin-1 is required for signaling and membrane targeting of EphB1 receptor tyrosine kinase." *J Cell Sci* 119(Pt 11): 2299-2309.

Vincent, A. M., J. C. Cawley y J. Burthem (1996). "Integrin function in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 87(11): 4780-4788.

Walsby, E., A. Buggins, S. Devereux, C. Jones, G. Pratt, P. Brennan, C. Fegan y C. Pepper (2014). "Development and characterization of a physiologically relevant model of lymphocyte migration in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 123(23): 3607-3617.

Whitlock, B. B., S. Gardai, V. Fadok, D. Bratton y P. M. Henson (2000). "Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms." *J Cell Biol* 151(6): 1305-1320.

Wiestner, A., A. Rosenwald, T. S. Barry, G. Wright, R. E. Davis, S. E. Henrickson, H. Zhao, R. E. Ibbotson, J. A. Orchard, Z. Davis, M. Stetler-Stevenson, M. Raffeld, D. C. Arthur, G. E. Marti, W. H. Wilson, T. J. Hamblin, D. G. Oscier y L. M. Staudt (2003). "ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile." *Blood* 101(12): 4944-4951.

Xi, H. Q., X. S. Wu, B. Wei y L. Chen (2012). "Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16(12): 2894-2909.

Xu, D., L. Yuan, X. Liu, M. Li, F. Zhang, X. Gu, D. Zhang, Y. Yang, B. Cui, J. Tong, J. Zhou y Z. Yu (2016). "EphB6 overexpression and Apc mutation together promote colorectal cancer." *Oncotarget*.

Yopp, A. C., S. Fu, S. M. Honig, G. J. Randolph, Y. Z. Ding, N. R. Krieger y J. S. Bromberg (2004). "FTY720-Enhanced T cell homing is dependent on CCR2, CCR5, CCR7, and CXCR4: Evidence for distinct chemokine compartments." *Journal of Immunology* 173(2): 855-865.

Yopp, A. C., J. C. Ochando, M. W. Mao, L. Ledgerwood, Y. Z. Ding y J. S. Bromberg (2005). "Sphingosine 1-phosphate receptors regulate chemokine-driven transendothelial migration of lymph node but not splenic T cells." *Journal of Immunology* 175(5): 2913-2924.

Yu, G., H. Luo, Y. Wu y J. Wu (2004). "EphrinB1 is essential in T-cell-T-cell co-operation during T-cell activation." *J Biol Chem* 279(53): 55531-55539.

Zogopoulos, G., C. Jorgensen, J. Bacani, A. Montpetit, P. Lepage, V. Ferretti, L. Chad, S. Selvarajah, B. Zanke, T. J. Hudson, T. Pawson y S. Gallinger (2008). "Germline EPHB2 receptor variants in familial colorectal cancer." *PLoS One* 3(8): e2885.

Zucchetto, A., D. Benedetti, C. Tripodo, R. Bomben, M. Dal Bo, D. Marconi, F. Bossi, D. Lorenzon, M. Degan, F. M. Rossi, D. Rossi, P. Bulian, V. Franco, G. Del Poeta, S. Deaglio, G. Gaidano, F. Tedesco, F. Malavasi y V. Gattei (2009). "CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival." *Cancer Res* 69(9): 4001-4009.



Resumen

Estudio de los mecanismos de diseminación en Leucemia Linfática Crónica: Papel Eph/ephrin

INTRODUCCIÓN

La Leucemia linfocítica/linfática crónica (LLC) es un síndrome linfoproliferativo crónico (SLPC) de linfocitos B que expresan el antígeno CD5, propio de linfocitos T. Afecta a personas de edad avanzada, principalmente entre los 67 y los 72 años, y más frecuentemente en hombres que en mujeres (1,7:1) [1].

Actualmente, la LLC es considerada una enfermedad incurable por lo que se hace necesario un mejor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de su patobiología. Parámetros clínicos descritos por Rai [2] y Binet [3] ayudan a clasificar la enfermedad. Actualmente se están investigando nuevos marcadores moleculares tales como expresión de CD38 [4] y ZAP70 [5, 6], el estado mutacional de los genes que codifican para la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas (IgHV) [4, 7] y la presencia de deleciones (d13q, d11q y d17p) y trisomía 12 (Tri12) [8].

Un aspecto crítico de esta enfermedad es la colonización de ganglios linfáticos (GL) por las células leucémicas (LLC), ya que es responsable del desarrollo de alteraciones inmunológicas que, junto a las hematológicas derivadas de la disfunción de la médula ósea (MO), tienen lugar en los casos más graves de la enfermedad [9-12]. Ensayos *in vitro* de co-cultivos han demostrado que las células endoteliales protegen a las células LLC de la apoptosis espontánea a través de factores solubles o contactos físicos [13]. Por otra parte, en otros estudios se observó que la unión de las células LLC a monocapas de células endoteliales protegía de la apoptosis espontánea a través de los contactos célula-célula [14], sugiriendo que podrían tener efectos similares *in vivo* dentro de los tejidos infiltrados algo que, sin embargo, no está del todo demostrado [10, 13-18].

Se ha considerado que la extravasación de las células LLC en GL podría tener lugar a través de las HEV de modo similar al proceso descrito para linfocitos en la condición sana si bien este extremo aún no ha sido del todo demostrado. Por otra

parte, la existencia de algunos trabajos indicando un posible efecto de la migración trans-endotelial (TEM) en la supervivencia de diferentes tipos celulares como granulocitos [19], linfocitos T [20] o precursores de monocitos CD34⁺CD14⁺[21], sugería que el contacto físico de las células LLC con los endotelios durante la extravasación podría tener un papel en la supervivencia de estas células contribuyendo a la infiltración de los GL. La capacidad de TEM de las células LLC está ampliamente relacionada con la expresión de la integrina $\alpha 4$ (CD49d) que junto con αL (CD11a) contribuyen a una TEM incrementada en pacientes con adenopatías [22-26]. Por otra parte, la integrina $\alpha 4$ también puede mediar la supervivencia de las células LLC dependiente de contactos célula-célula dentro del microambiente tumoral [17, 27]. Estas evidencias sugieren ampliamente que la extravasación dependiente de integrinas puede estar fuertemente vinculada a una mayor supervivencia, la cual necesita ser comprobada.

Por otra parte, las interacciones Eph/ephrin podrían regular la TEM de leucocitos y células cancerígenas [28]. En este sentido, nuestro laboratorio ha encontrado que las interacciones EphA2/ephrinA4 juegan un papel crucial en los procesos de migración trans-endotelial a través de endotelios vasculares en la leucemia linfocítica crónica [27, 29].

Ensayos TEM han demostrado que las células LLC muestran una capacidad de TEM menor que los linfocitos B sanos [22-26]. Esto es debido en parte a la sobreexpresión de ephrinA4, ligando de los receptores Eph, que se encuentra unido a la membrana y como isoforma soluble en las células LLC y linfocitos B sanos [30, 31]. La señal *reverse* de la isoforma expresada en membrana inducida por la unión con su receptor EphA2 en la superficie de la célula endotelial inhibe la adhesión mediada por integrinas de las células LLC al endotelio [26, 32] probablemente afectando la extravasación. En contraste, en ensayos *in vitro* se ha demostrado que la isoforma soluble mejora la TEM de las LLC cuando se une a la célula endotelial en un mecanismo poco caracterizado, involucrando el secuestro de EphA2 y reclutamiento de ICAM-1 y VCAM-1 [27]. Un aspecto interesante observado en pacientes con adenopatías es la

baja expresión de la isoforma de membrana de ephrinA4 y los niveles aumentados de la isoforma soluble en suero [31], sugiriendo que esta condición es necesaria para facilitar la diseminación ganglionar.

Estos pacientes con adenopatías pueden presentar varios GL infiltrados dentro de la misma cadena ganglionar, lo que podría relacionarse con diseminación via circulación linfática. Este aspecto, no obstante, no ha sido estudiado dentro de la patología de la LLC si bien podría considerarse una ruta alternativa a la sanguínea y donde, de manera similar a esta última, las interacciones Eph/ephrin podrían jugar un papel primordial [27].

La extravasación de los linfocitos hacia los tejidos linfáticos está ampliamente estudiada, sin embargo los mecanismos de salida desde los mismos no están del todo descritos. Este proceso de salida está principalmente regulado por gradientes de esfingosina-1-fosfato (S1P) y su unión al receptor 1 de esfingosina-1-fosfato (S1PR1)[33]. La mayoría de estos estudios han sido realizados en linfocitos T [34, 35], mientras que son escasos los de linfocitos B y en mucho menor grado dentro de la patología de la LLC [36-40].

Estudios en procesos cancerígenos y en células de mieloma múltiple han demostrado que la adhesión y migración de estas células por la actividad en conjunto de CXCL12 y S1P podría tener importantes consecuencias en la progresión de la enfermedad [41], mientras que en células LLC el estímulo con CXCL12 inhibe la migración en respuesta a S1P [37]. Estudios de histoquímica en linfadenopatías de pacientes de LLC comparadas con GL reactivos (sanos), muestran que la expresión de CXCR4 y CCR7 se mantienen altas, promoviendo un acúmulo de estas células en el GL que junto con la deficiencia en la expresión de S1PR1, podrían generar un desequilibrio que promueva la acumulación en GL y la formación de linfadenopatías [40].

Estos datos en conjunto revelan, que, aunque en los últimos años ha habido grandes avances en el estudio de infiltración y salida de los linfocitos hacia y desde el GL a través de endotelios sanguíneos y linfáticos, aún no está del todo esclarecido el cómo interactúan y se modulan estos dos sistemas, sobretodo en la patobiología de la LLC. Por tanto, es necesario un mayor conocimiento de estos mecanismos que puedan

ayudar a evitar la diseminación ganglionar de la enfermedad y, consiguientemente, su agravamiento.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar la patobiología de los procesos de diseminación de las células leucémicas en la leucemia linfocítica crónica a través de endotelios sanguíneos y linfáticos y el papel que juegan las interacciones de los receptores Eph y sus ligandos ephrin en dicho proceso.

Objetivos parciales:

1. Estudiar el efecto de la migración trans-endotelial (TEM) en la supervivencia de las células LLC durante la extravasación, su asociación con la expresión de integrinas y su implicación en el desarrollo de linfadenopatías.
2. Determinar el significado que para la patobiología de la enfermedad tiene la sobreexpresión de ephrinA4 y la presencia de una isoforma soluble, así como sus efectos en la supervivencia de las células LLC durante la TEM a través de endotelios sanguíneos.
3. Caracterizar las vías transcelular (TC) y paracelular (PC) de migración transendotelial de las células LLC a través de endotelios sanguíneos, el papel de Eph/ephrin en los mismos y su relación con la supervivencia/muerte de las LLC en procesos *in vivo*.
4. Analizar si la ruta linfática es utilizada por las células LLC para entrada a los ganglios linfáticos, su relación con la supervivencia y el posible papel en la diseminación.

5. Determinar qué interacciones Eph/ephrin están principalmente implicadas en la TEM a través de endotelios linfáticos incluyendo el análisis de EphA2/ephrinA4.

6. Determinar el papel que juegan las interacciones Eph/ephrin en procesos de salida de las células LLC de ganglios linfáticos a través de endotelios sanguíneos y linfáticos, así como su interacción con S1P/S1PR1, CCL19/CCR7 y CXCL12/CXCR4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran un nuevo panorama del papel de la célula endotelial en la LLC. En el presente trabajo hemos demostrado y de acuerdo con estudios previos [13, 14, 17, 42-44], que la célula endotelial puede probablemente proporcionar señales de supervivencia a las células leucémicas dentro de los tejidos infiltrados. Sin embargo, las células LLC, pero no los linfocitos B, pueden sufrir apoptosis a través de los contactos físicos con endotelio sanguíneo pre-estimulado con TNF- α (HUVEC-TNF) provocando una disminución de la supervivencia después de la migración trans-endotelial (TEM). Esta supervivencia depende de los contactos físicos entre ambos tipos celulares (CLL-endotelio) tras un tiempo prolongado de interacción. Además efectos en la supervivencia también se dan en gran parte por la liberación de factores solubles. En apoyo a esta hipótesis, demostramos que en cultivos a largo plazo cuando utilizamos endotelio fijado con paraformaldehído no se observan estos efectos de supervivencia, mientras que con HUVEC vivas y medio condicionado procedente de cultivos a largo plazo se protege ampliamente a las células LLC de la apoptosis espontánea y de la apoptosis mediada por HUVEC-TNF en los cultivos de 12 horas. Por el contrario, a tiempos más cortos como en el proceso de extravasación [45] se ve impedida la capacidad de las células endoteliales de producir estos factores solubles poniéndose de manifiesto señales apoptóticas mediadas por contactos físicos. Esto es apoyado por el incremento de la apoptosis en las células LLC de la fracción no trans-migrada (no-TM) que puede posiblemente llevarse a cabo 2 horas después del

contacto físico como se ha demostrado en los co-cultivos. Bajo condiciones fisiológicas de flujo las células LLC no adheridas podrían probablemente escapar de estas señales apoptóticas iniciales que hemos observamos en estos ensayos bajo condiciones estáticas de TEM, aunque serían necesarios ensayos TEM bajo condiciones de flujo para confirmar esta conclusión [26, 46]. Durante la diapédesis las LLC pueden ser rescatadas de las señales apoptóticas recibidas al inicio de la TEM como ocurre en los casos LApos. Además no se puede descartar que las células LLC migradas reciban otras señales de supervivencia una vez dentro del parénquima de los GL, aunque nuestro estudio en secciones de adenopatía mostraron numerosas células apoptóticas cerca de las HEV. Estos datos sugieren que un gran número de células recientemente migradas mueren sin infiltrar el tejido y especialmente cuando migran a través de HEV carentes de ephrinA4 como en las observadas en las regiones exteriores de las linfoadenopatías (LA).

Nuestros resultados demuestran un papel crítico de las integrinas CD49d y CD11a en los procesos de supervivencia/muerte de las células LLC durante la TEM en consonancia con el rol de estas moléculas en otros aspectos de la enfermedad [26, 47-49]. Las células LLC de pacientes con linfoadenopatía (LApos) mostraban una mayor supervivencia durante la TEM en parte debido a expresión de las cadenas de integrinas $\alpha 4$ and αL , relacionando extravasación y la supervivencia. Un alto nivel de expresión de CD49d ($\alpha 4$) es indicativo de un peor pronóstico en los casos no mutados (IgHV) y CD38⁺ [50] lo cual se asocia con la presencia de linfoadenopatías [23, 24, 51]. La cadena $\alpha 4$ juega un papel crítico en la extravasación de linfocitos sanos en asociación con $\beta 1$ mediando la unión a VCAM-1 mientras que $\alpha L\beta 2$ se adhiere a ICAM-1 durante la migración trans-endotelial [47]. Incluso, las células LLC de pacientes sin linfoadenopatía (LANeg) muestran un defecto de la motilidad y la TEM dependiente de $\alpha L\beta 2$, que es en parte corregida por la expresión de $\alpha 4\beta 1$ en los pacientes que presentan adenopatías (LApos) [47, 52]. Esto probablemente explique en los casos LANeg la falta de capacidad para recibir señales de supervivencia durante TEM o cuando se cultivaron sobre ICAM-1 o VCAM-1, enfatizándose una mayor supervivencia cuando la expresión de $\alpha 4$ esta incrementada como en los casos LApos. De acuerdo

con estudios previos en los que se destaca un papel crítico de $\alpha 4$ en la supervivencia de las células LLC mediada por el endotelio [17, 25, 52, 53] hemos demostrado, además, que esto es especialmente relevante en los casos con presencia de linfadenopatía. Por el contrario, el hallazgo de las señales apoptóticas mediadas por estas y otras integrinas en las células LLC cuando fueron cultivadas sobre diferentes ligandos de matrices extracelulares (ECM) o que se observaron en los ensayos TEM fueron completamente inesperados. Por lo tanto encontramos que las integrinas tienen un efecto dual en la viabilidad celular de las células LLC, intercambiando respuestas de apoptosis o supervivencia, que ya han sido encontrados en otros tipos celulares incluyendo células tumorales hematopoyéticas [54-57]. Mecanismos de apoptosis mediados por integrinas han sido relacionados con adhesiones firmes y prolongadas [54] o a través de integrinas no adheridas [55]. Su estado de activación antes de la unión al ligando proporciona además un efecto dual a través del reclutamiento de caspasas [55] y/o de ERK en lugar de Akt kinasa [56]. En conjunto estos mecanismos y/o algunos desconocidos pueden contribuir a los resultados de apoptosis observados cuando se adhieren al endotelio inflamado a través de sus ligandos ICAM-1 o VCAM-1. En este sentido no se puede excluir, de cualquier manera, la posible existencia de mecanismos apoptóticos adicionales indirectamente regulados por la adhesión de integrinas, incluyendo aquellas mediadas por Fas o TRAIL-Rs, que son expresados por las células LLC [58](40) y cuyos ligandos han sido descritos bajo estímulos inflamatorios en la célula endotelial [59, 60].

En la viabilidad dependiente de integrinas en las células LLC, la expresión en la superficie celular de ephrinA4 surge como un mediador crítico para contrarrestar la apoptosis en los pasos iniciales de la adhesión, por lo menos observado en los casos LApos durante la diapédesis. De hecho, nuestros resultados mostraron que la supervivencia así como procesos apoptóticos mediados por integrinas son contrarrestados por la señal *reverse* de ephrinA4 expresada en membrana. Las señales repulsivas debidas a la expresión de la isoforma de membrana, como previamente habíamos mostrado [27], junto con el flujo sanguíneo, podrían posiblemente contribuir a desprender las células LLC de los vasos sanguíneos evitándoles así las señales

apoptóticas provenientes de la adhesión. En contraste con esto, en pacientes LApos, la baja expresión de membrana de ephrinA4 es necesaria para la firme adhesión al endotelio a través de las integrinas $\alpha 4$ y αL [27, 31] y posteriormente efectuar la diapédesis. Además, demostramos que ephrinA4 es capaz de inhibir estados conformacionales de alta afinidad de estas integrinas presumiblemente a través del secuestro físico en la superficie celular. En apoyo a este mecanismo, además mostramos una mejora en la adhesión de células leucémicas al endotelio en células LLC con ephrinA4 silenciada. Los ensayos de silenciamiento demostraron que la ausencia de la señal *reverse* pero no de ephrinA4 por sí misma es necesaria para continuar con la diapédesis pero no para captar señales de supervivencia vía integrinas en las muestras LApos. La asociación inversa entre las moléculas ephrinA4 y $\alpha 4$ resalta aún más la posible existencia de mecanismos comunes para regular su expresión en las células LLC y asegurar la extravasación.

Posteriormente demostramos que la unión de la ephrinA4 soluble al endotelio a través de EphA2 surge como un mecanismo fundamental que promueve la TEM y la supervivencia en los casos de LApos. El hallazgo de células LLC apoptóticas cerca de HEV carentes de ephrinA4 dentro de las linfadenopatías apoyaba, de manera indirecta, que este proceso posiblemente suceda *in vivo*. Para confirmarlo, se realizaron ensayos en ratones a los que se inyectaron células LLC humanas junto con distintas concentraciones de ephrinA4 soluble enriquecida a partir de suero de pacientes LApos. En estos ensayos, que permitieron estudiar *in vivo* la capacidad de las células LLC para establecerse en el ganglio linfático o medula ósea [23, 61], se encontró que ephrinA4 soluble inducía un incremento en el número de células LLC obtenidas de los ganglios así como de su viabilidad. Finalmente, mostramos que ephrinA4 soluble podría promover una ruta trans-celular (TC) de TEM en las células LLC mediante microscopía confocal de co-cultivos teñidos para VE-Cadherina y caveolina-1 [62]. Estos resultados explicarían hallazgos previos de nuestro laboratorio relacionando la internalización de EphA2 mediada por ephrinA4 soluble en las células endoteliales junto con ICAM-1 y señales de supervivencia [27]. De esta manera, EphA2 podría unir físicamente caveolin-1 como efectivamente se ha demostrado a nivel

bioquímico [63]. En conjunto estos datos pueden adicionalmente aportar una nueva alternativa a la eterna pregunta respecto a la importancia de la ruta TC respecto a la paracelular (PC) de la TEM [45, 62, 64].

En conjunto todos estos resultados proporcionan nuevos datos en los mecanismos de supervivencia empleados por la células LLC *in vivo*, demostrando que la extravasación podría representar un evento desfavorable para las células LLC que podría ser explotado para prevenir la diseminación ganglionar de la enfermedad.

Por otro lado, en relación con el estudio de la diseminación a través de endotelio linfático, utilizando para ello células endoteliales linfáticas de dermis humana (HDLEC), describimos una amplia expresión de los miembros de la familia Eph/ephrin [27, 31] destacando una alta expresión de los receptores EphA2 y EphB4. Sobre esta base, la expresión tanto de ephrinA4 como de ephrinB2 en las propias células LLC ponía de manifiesto un posible papel de estas interacciones también en la migración TEM en los endotelios linfáticos. Los ensayos TEM a través de HDLEC-TNF, en respuesta a CXCL12 mostraron que la señal *reverse* a través de ephrinA4 y B2 provocó un aumento en la viabilidad de las células LLC TM en los casos LApos pero no así en LANeg, sugiriendo que las señales *reverse* a través de ephrinA4 y ephrinB2 en las células leucémicas interfieren con la vía de señalización a través de CXCR4 proporcionando señales de supervivencia.

El estudio de los mecanismos de salida de los linfocitos desde los GL a través de vasos sanguíneos y linfáticos se ha centrado en la respuesta a S1P a través de su receptor 1 de esfingosina 1 fosfato (S1PR1) . S1P se encuentra presente en altas concentraciones en sangre y linfa pero bajas en tejidos linfoides [65-67]. En las células LLC son pocos los estudios que se han centrado en este mecanismo [36-40].

A través de citometría de flujo, pudimos comprobar que las células LLC presentan niveles bajos de la expresión de S1PR1 comparadas con linfocitos B. Sin embargo, las células LLC son capaces de responder a S1P con un aumento en el

número de células transmigradas (TM) de acuerdo con estudios previos [36, 37, 39, 40]. También observamos que esta respuesta no es directamente proporcional a los niveles de expresión del receptor lo que sugería la existencia de otros mecanismos que junto con la señal de S1PR1 intervienen mejorando su migración. Mediante ensayos TEM (Basal-Apical) a través de HUVEC-TNF y HDLEC-TNF en respuesta a S1P, simulando la condición de salida, evaluamos la respuesta migratoria y los efectos en la supervivencia de las células LLC. Los índices de migración mostraron que las células LLC de ambas condiciones LA, presentan una menor capacidad para la TEM a través de HUVEC-TNF que HDLEC-TNF, principalmente en los casos LANeg, tras compararlas con ensayos en ausencia de S1P. En el efecto en la supervivencia observamos un aumento en la viabilidad de las células LLC no-TM y marcadamente mayor en las células TM, en ambos endotelios y en presencia y no de S1P. Por tanto, la condición de salida de las células LLC, al contrario que la de entrada, representa un mecanismo de supervivencia para las mismas. En estos mismos ensayos demostramos que las interacciones Eph/ephrin favorecen la migración trans-endotelial en la salida de GL. Nuestros resultados mostraron que la señal *reverse* a través de ephrin A4 en la célula LLC potencia la respuesta a S1P en HUVEC-TNF pero no así en HDLEC-TNF. De la misma manera, cuando unimos ephrinA4 soluble a las monocapas endoteliales a través de EphA2 se produjo un incremento en la migración.

Curiosamente, la señal *reverse* a través de ephrinB2 en las células LLC, magnificaba la TEM en respuesta a S1P en ambos endotelios pero marcadamente mayor en HDLEC-TNF. La interacción ephrinB2-EphB4 no había sido relacionada con la migración trans-endotelial de células LLC ni en la condición sana en el caso de linfocitos. Por lo tanto podríamos pensar que ephrinB2 podría abrir una nueva vía de estudio en esta señalización como diana terapéutica para evitar la acumulación de estas células en los GL que requiere de un estudio más profundo.

Seguidamente estudiamos el papel de los receptores de quimiocinas como CCR7 y/o CXCR4 responsables de la infiltración y retención de las células LLC en el GL [26, 68, 69] en la migración mediada por S1PR1, considerando tanto la retención como la salida del GL como había sido sugerido en el estudio de linfocitos T [34, 66, 70]. En ausencia de monocapas endoteliales, pudimos observar que los estímulos

quimiotácticos con CCL19 y CXCL12 potenciaban la migración en respuesta a S1P, por tanto pudimos demostrar que las señales en las células LLC de CXCR4 y a mayor grado de CCR7, aunque no son necesarias para que las células LLC respondan a S1P sí magnifican de manera significativa la migración mediada por S1PR1. En presencia de monocapas de endoteliales, los ensayos TEM en condiciones de salida (migración Basal-Apical) observamos un menor índice de migración cuando lo comparamos con la ausencia de estímulos (CCL19 y CXCL12), contrario a lo observado en filtros. En conjunto nuestros resultados con células LLC difieren a estudios previos realizados con linfocitos T en los que señalaban que estos estímulos se comportan de manera muy similar a través de filtros y TEM (basal-Apical) difiriendo solo en la magnitud pero no en los efectos generados [34]. Sin embargo lo que sí pudimos demostrar es una interacción entre los receptores CCR7-S1PR1 y CXCR4-S1PR1, ya que los análisis por citometría de flujo mostraron un aumento en la expresión de S1PR1 en las células LLC cuando estas fueron estimuladas con CCL19 y CXCL12.

Los presentes resultados también demuestran que en ensayos de migración a través de filtros, las señales *reverse* en las células LLC a través de ephrinA4 y B2 y la unión de ephrinA4 y B2 al endotelio a través de EphA2 y EphB4 promueven una mayor migración en respuesta a S1P, cuando las células LLC se estimulaban con CXCL12 pero no así con CCL19. En los ensayos TEM (Basal-Apical) pudimos demostrar que estas señales promueven la TEM a través de ambos endotelios y ambos estímulos quimiotácticos. Por tanto, estas señales parecen revertir los efectos del bloqueo en la TEM observado anteriormente por las interacciones S1PR1 con CCR7 y CXCR4. En conjunto estos resultados mostraron que las señales EphA2-ephrinA4 y EphB4-ephrinB2 junto con la internalización de CCR7 y en mayor medida de CXCR4 generan en S1PR1 una ventaja en la respuesta a su ligando en procesos de TEM (Basal-Apical) de las células LLC.

A pesar de que estos últimos resultados son preliminares, nuestros resultados muestran que las señales de Eph/ephrin, aunque no del todo claras, intervienen en los mecanismos de interacción entre esta familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) como CCR7-S1PR1 y CXCR4-S1PR1. Por lo que abre una nueva alternativa de

estudio que pudiera ayudar primero, a entender la biología de estos mecanismos y segundo la prevención de la presencia de linfadenopatías en pacientes de LLC.

CONCLUSIONES

1. Las células LLC, pero no los linfocitos B sanos, pueden sufrir apoptosis a través de los contactos físicos con endotelios estimulados con TNF- α durante la migración trans-endotelial (TEM) a través de endotelios sanguíneos.

2 Células LLC de pacientes con adenopatía (LApos) presentan una mayor supervivencia durante la TEM mediada por las cadenas de integrinas $\alpha 4$ y αL estableciendo una relación entre la extravasación y la supervivencia de las células leucémicas.

3. La expresión de la isoforma de membrana de ephrinA4 en las células LLC contrarresta las interacciones de integrinas escapando de las señales apoptóticas, mientras que la fracción soluble de la *ephrinA4* unida al endotelio potencializa la supervivencia de las células LLC en los casos LApos mediante la inducción de la TEM a través de la ruta trans-celular.

4. La unión de la *ephrinA4* soluble al endotelio a través de EphA2, surge como un mecanismo fundamental que promueve la TEM y la supervivencia en los casos de LApos en la que *ephrinA4* es capaz de inhibir la alta afinidad de estados conformacionales de las integrinas a través del secuestro físico en la superficie celular en lugar de su internalización.

5.. Células LLC de pacientes LApos presentan una menor capacidad de trans-migración que los casos LANeg, mientras que ambas condiciones de LA parecen recibir señales de

supervivencia después de la diapédesis a través de endotelios linfáticos (HDLEC-TNF- α).

6. Los estímulos quimiotácticos de CCL19 y CXCL12 junto con las señales bidireccionales de las Eph/ephrin provocan una mayor expresión de S1PR1 y por siguiente una mayor trans-migración (basal-Apical) a través de HUVEC-TNF y HDLEC-TNF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hallek, M., *Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment*. Am J Hematol, 2015. **90**(5): p. 446-60.
2. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1975. **46**(2): p. 219-34.
3. Binet, J.L., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. Cancer, 1981. **48**(1): p. 198-206.
4. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1840-1847.
5. Crespo, M., et al., *ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(18): p. 1764-1775.
6. Wiestner, A., et al., *ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4944-51.
7. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1848-54.
8. Dohner, H., et al., *Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis*. J Mol Med (Berl), 1999. **77**(2): p. 266-81.
9. D'Arena, G., et al., *Biological and clinical heterogeneity of B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(2): p. 223-8.
10. Ghia, P., N. Chiorazzi, and K. Stamatopoulos, *Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation*. J Intern Med, 2008. **264**(6): p. 549-62.

11. Hamblin, T., *Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two?* Ann Hematol, 2002. **81**(6): p. 299-303.
12. Keating, M.J., et al., *Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003: p. 153-75.
13. Buggins, A.G., et al., *Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription.* Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7523-33.
14. Badoux, X., et al., *Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and bone marrow endothelial cells: role of signal transducer and activator of transcription 3.* Hum Pathol, 2011. **42**(12): p. 1989-2000.
15. Burger, J.A., *Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape.* Curr Opin Oncol, 2012. **24**(6): p. 643-9.
16. Long, B.W., et al., *Apoptosis and interleukin 7 gene expression in chronic B-lymphocytic leukemia cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1416-20.
17. Maffei, R., et al., *Physical contact with endothelial cells through beta(1)- and beta(2)-integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells.* Haematologica-the Hematology Journal, 2012. **97**(6): p. 952-960.
18. Moreno, A., et al., *Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells.* Blood, 2001. **97**(1): p. 242-9.
19. McGettrick, H.M., et al., *Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium.* J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 779-88.
20. Borthwick, N.J., et al., *Transendothelial migration confers a survival advantage to activated T lymphocytes: role of LFA-1/ICAM-1 interactions.* Clin Exp Immunol, 2003. **134**(2): p. 246-52.
21. Ferrero, E., et al., *Transendothelial migration leads to protection from starvation-induced apoptosis in CD34+CD14+ circulating precursors: evidence for PECAM-1 involvement through Akt/PKB activation.* Blood, 2003. **101**(1): p. 186-93.
22. Miyasaka, M. and T. Tanaka, *Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 360-70.
23. Hartmann, T.N., et al., *Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow.* Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 3121-30.
24. Till, K.J., et al., *CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium.* Blood, 2005. **105**(12): p. 4813-9.
25. Zucchetto, A., et al., *CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival.* Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 4001-9.

26. Till, K.J., et al., *The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2977-84.
27. Trinidad, E.M., et al., *An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression*. Blood, 2009. **114**(24): p. 5081-90.
28. Hordijk, P.L., *Recent insights into endothelial control of leukocyte extravasation*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. **73**(8): p. 1591-1608.
29. Alonso, C.L., et al., *Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells*. Leuk Res, 2009. **33**(3): p. 395-406.
30. Aasheim, H.C., et al., *A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes*. Blood, 2000. **95**(1): p. 221-30.
31. Alonso-Colmenar, L.M., et al., *Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells*. Leuk Res, 2009. **33**(3): p. 395-406.
32. Trinidad, E.M., A.G. Zapata, and L.M. Alonso-Colmenar, *Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration*. Cell Adh Migr, 2010. **4**(3): p. 363-7.
33. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 355-360.
34. Yopp, A.C., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptors regulate chemokine-driven transendothelial migration of lymph node but not splenic T cells*. Journal of Immunology, 2005. **175**(5): p. 2913-2924.
35. Ledgerwood, L.G., et al., *The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics*. Nature Immunology, 2008. **9**(1): p. 42-53.
36. Capitani, N., et al., *S1P1 expression is controlled by the pro-oxidant activity of p66Shc and is impaired in B-CLL patients with unfavorable prognosis*. Blood, 2012. **120**(22): p. 4391-4399.
37. Borge, M., et al., *The Expression of Sphingosine-1 Phosphate Receptor-1 in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Impaired by Tumor Microenvironmental Signals and Enhanced by Piceatannol and R406*. Journal of Immunology, 2014. **193**(6): p. 3165-3174.
38. Sic, H., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014. **134**(2): p. 420-+.
39. Till, K.J., A.R. Pettitt, and J.R. Slupsky, *Expression of Functional Sphingosine-1 Phosphate Receptor-1 Is Reduced by B Cell Receptor Signaling and Increased by Inhibition of PI3 Kinase delta but Not SYK or BTK in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells*. Journal of Immunology, 2015. **194**(5): p. 2439-2446.

40. Patrussi, L., et al., *Enhanced Chemokine Receptor Recycling and Impaired S1P1 Expression Promote Leukemic Cell Infiltration of Lymph Nodes in Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Cancer Res*, 2015. **75**(19): p. 4153-63.
41. Garcia-Bernal, D., et al., *Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving alpha4beta1 integrin function*. *J Pathol*, 2013. **229**(1): p. 36-48.
42. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(2): p. 377-88.
43. Millan, J., et al., *Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(2): p. 113-23.
44. Muller, W.A., *Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes*. *Circ Res*, 2009. **105**(3): p. 223-30.
45. Schnoor, M., et al., *Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 946509.
46. Mionnet, C., et al., *High endothelial venules as traffic control points maintaining lymphocyte population homeostasis in lymph nodes*. *Blood*, 2011. **118**(23): p. 6115-22.
47. Burger, J.A., *The CLL cell microenvironment*. *Adv Exp Med Biol*, 2013. **792**: p. 25-45.
48. Plate, J.M., B.W. Long, and S.B. Kelkar, *Role of beta2 integrins in the prevention of apoptosis induction in chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Leukemia*, 2000. **14**(1): p. 34-9.
49. Lagneaux, L., et al., *Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells*. *Leuk Lymphoma*, 1999. **35**(5-6): p. 445-53.
50. Walsby, E., et al., *Development and characterization of a physiologically relevant model of lymphocyte migration in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2014. **123**(23): p. 3607-17.
51. Slattery, M.J. and C. Dong, *Neutrophils influence melanoma adhesion and migration under flow conditions*. *Int J Cancer*, 2003. **106**(5): p. 713-22.
52. Till, K.J., et al., *Cell motility in chronic lymphocytic leukemia: defective Rap1 and alphaLbeta2 activation by chemokine*. *Cancer Res*, 2008. **68**(20): p. 8429-36.
53. Vincent, A.M., J.C. Cawley, and J. Burthem, *Integrin function in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1996. **87**(11): p. 4780-8.
54. Eksioğlu-Demiralp, E., et al., *Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages*. *Leukemia*, 1996. **10**(8): p. 1331-9.
55. Gattei, V., et al., *Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2008. **111**(2): p. 865-73.

56. Fiorcari, S., et al., *The PI3-kinase delta inhibitor idelalisib (GS-1101) targets integrin-mediated adhesion of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell to endothelial and marrow stromal cells*. PLoS One, 2014. **8**(12): p. e83830.
57. Lagneaux, L., et al., *Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells*. Blood, 1998. **91**(7): p. 2387-96.
58. Saito, Y., et al., *Apoptotic death of hematopoietic tumor cells through potentiated and sustained adhesion to fibronectin via VLA-4*. J Biol Chem, 2009. **285**(10): p. 7006-15.
59. Stupack, D.G., et al., *Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins*. J Cell Biol, 2001. **155**(3): p. 459-70.
60. Whitlock, B.B., et al., *Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1305-20.
61. Stupack, D.G., *Integrins as a distinct subtype of dependence receptors*. Cell Death Differ, 2005. **12**(8): p. 1021-30.
62. Davids, M.S. and J.A. Burger, *Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Open J Hematol, 2012. **3**(S1).
63. Martinez-Moreno, M., et al., *In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins*. Leukemia, 2015.
64. Vihanto, M.M., et al., *Caveolin-1 is required for signaling and membrane targeting of EphB1 receptor tyrosine kinase*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 11): p. 2299-309.
65. Lee, Y.M., et al., *A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC)*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. **84**(3-4): p. 154-62.
66. Yopp, A.C., et al., *FTY720-Enhanced T cell homing is dependent on CCR2, CCR5, CCR7, and CXCR4: Evidence for distinct chemokine compartments*. Journal of Immunology, 2004. **173**(2): p. 855-865.
67. Schwab, S.R., et al., *Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients*. Science, 2005. **309**(5741): p. 1735-1739.
68. Burger, J.A., M. Burger, and T.J. Kipps, *Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3658-3667.
69. Lopez-Giral, S., et al., *Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(2): p. 462-71.
70. Cyster, J.G. and S.R. Schwab, *Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs*. Annual Review of Immunology, Vol 30, 2012. **30**: p. 69-94.



Summary

Study of the mechanisms of dissemination in chronic lymphocytic leukemia and the role of Eph/ephrin interactions.

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a chronic lymphoproliferative syndrome (SLPC) of CD5⁺ B lymphocytes. It commonly affects elderly persons with an average of diagnosis ranging from 67 to 72 years and is more common in men than in women (1.7: 1) although the proportion of young patients seems to be increasing [1]

The CLL has a very heterogeneous clinical course, from individuals who live with the disease for years without requiring treatment to others with a more aggressive clinical course requiring early treatment. Disease stage is mainly based on clinic and pathological characteristics as defined previously by Rai et al. (year) [2] and Binet et al. (year) . Currently other prognostic factors are used to define the risk of the disease including cellular markers such as CD38 [4] and ZAP70 [5, 6] expression, and genetic variants of the immunoglobulin heavy chain (IgHV) [4, 7] and common cytogenetic aberrations such as deletions in some chromosome regions (d13q, d11q and d7p) or trisomy 12 (Tri12) [8].

Compelling evidence supports that CLL cells survival within the tumor microenvironment is highly dependent on extrinsic signals provided by non-leukemic cell types [9, 10]. In vitro studies support that endothelial cells could protect CLL cells in vivo either through soluble factors and/or direct physical contacts [9-15]. Consequently, endothelial cells could play a similar role during extravasation a fact that, to our knowledge, has not been previously addressed in this disease. Indeed, it has been suggested that transendothelial migration (TEM) could improve survival of non-leukemia cell types including granulocytes [16], T lymphocytes [17] or CD34+CD14+ monocyte precursors [18] indicating that the extravasation through inflamed vascular vessels or the specialized high endothelial venules (HEV) in lymphoid tissues [19] could affect the survival outcome of CLL cells.

The TEM capacity of CLL cells seems to be dependent on α 4 (CD49d) integrin expression which together with α L integrin (CD11a), contributes to the development of lymphadenopathies [20-22]. Interestingly, CD49d can also mediate the contact dependent survival of CLL cells within tumor microenvironment [14, 23] and might be

associated with inferior prognosis groups including the unmutated (UM) IgHV or CD38 tumor expressing cases. All together strongly suggest that integrin dependent extravasation may be further linked to a survival advantage, however more evidence it is needed to demonstrate this affirmation.

Several Eph/ephrin interactions have been described in different types of endothelium within different types of leukocytes, in which some Eph/ephrin isoforms have been implicated in the endothelial activation, TEM of leukocytes and cancer cells [24]. CLL cells show a reduced TEM compared to normal B cells under static or flow in vitro TEM conditions [20, 22, 25] and also in vivo model in mice [20].

We previously showed that this reduced TEM can be in part linked to overexpression of ephrinA4, a GPI-membrane-linked ligand of the Eph receptor family of tyrosine kinases which is found as a membrane bound and a soluble isoforms in CLL and normal B cells [26, 27]. We also found that reverse signaling through the cell surface expressed isoform of ephrin-A4 inhibits integrin mediated adhesions of CLL cells to endothelium through binding to EphA2 receptor on the surface of endothelial cells [25, 28] likely impairing extravasation. By contrast, the soluble isoform enhances TEM of CLL cells in vitro when bound to endothelial cells through EphA2. This process can be coupled to enhanced diapedesis through sequestration and internalization of ICAM-1 and VCAM-1 [25] rather than through increased vascular permeability of the altered endothelial junctions found after ephrinA1 treatment [29]. Moreover patients having lymphadenopathy show increased serum levels of ephrinA4 in addition to decreased expression of ephrinA4 on the surface of CLL cells [27]. These findings identify the soluble isoform as the mechanism contributing likely to nodal dissemination of CLL cells, although this needs physiological confirmation in vivo [30-32].

Patients with lymphadenopathy may have several lymph nodes infiltrated by the CLL cells which could likely be due to their dissemination through the lymph circulation, an aspect that, to our knowledge, has not been previously studied. On this basis and together with impaired TEM through HEV, it is believed that lymphatic endothelium could play a major role in the nodal dissemination of these leukemic cells, a process that could be orchestrated by Eph/ephrin interactions as previously described by us for blood vessels [28].

Another important aspect that might contribute to the development of lymphadenopathies is the lymph node exit capacity of CLL cells. Normal lymphocyte egress from lymphoid tissues is in response to sphingosin-1-phosphate (S1P) levels and its binding to S1PR1 receptor [33]. However, most data come from studies with T lymphocytes [34, 35] whereas mechanisms involving B lymphocyte have been less studied and to a lesser extent within the CLL pathology [36-40]. A reduced number of studies indicate that reduced S1PR1 expression in CLL cells could result in their retention within lymph nodes based on in vitro assays [36, 37] but a definitive proof is still lacking.

Chemokines such as CCL19 and CXCL12 and their receptors CCR7 and CXCR4 has been involved in the extravasation of CLL cells into lymph nodes [41, 42] while S1P and its S1PR1 receptor could be required for their egress from lymph nodes [36]. Studies in carcinogenic processes and in multiple myeloma cells have shown that the adhesion and migration of these cells by the combined activity of CXCL12 and S1P could have important consequences on disease progression [43], whereas in CLL cells the stimulus with CXCL12 inhibits migration in response to S1P [37]. Histochemistry studies on lymphadenopathy of CLL patients compared to reactive (healthy) lymph nodes show that the expression of CXCR4 and CCR7 remain high, promoting an accumulation of these cells in the lymph nodes that together with the deficiency in the expression of S1PR1, generate an imbalance that leads to the formation of lymphadenopathy [40]. However, how these two receptor systems are regulated for the entry and exit of CLL cells to and from lymph nodes has not been described.

Inhibitors of kinases, mainly targeting the BCR signaling, have been developed recently as therapeutic agents. These drugs cause a mobilization of the CLL cells from the lymph node to the peripheral blood, resulting in rapid lymphocytosis and reduced lymph node enlargement [39, 42, 44-46]. Therefore, we hypothesized that the Eph receptors members of the tyrosine kinase family could intervene in the signal of S1P and consequently provoke a mobilization in the cells of CLL from the lymph nodes. In addition, there are studies that have focused on the therapeutic development of novel drugs targeting Eph/ephrin interactions [47] which has gained increasing interest in several aspects of cancer biology including metastasis.

OBJECTIVES

General objective:

To study the transendothelial migration capacity of CLL cells from blood into lymphatic endothelium and the role of Eph/ephrin interactions in this process as possible mechanisms regulating lymph node seeding and/or enlargement.

Partial objectives:

1. To study the role of endothelium in the viability of CLL cells during trans-endothelial migration (TEM), its association with integrin expression and its involvement in the development of lymphadenopathy.
2. To determine the significance of overexpression of ephrinA4 and the presence of a soluble isoform in the pathobiology of CLL in the TEM related survival through blood endothelium.
3. To determine whether transcellular and paracellular TEM pathways of CLL cells through blood endothelia can be linked to their survival.
4. To analyze whether the lymphatic pathway is used by CLL cells for extravasation into the lymph nodes, their relationship to survival and the possible role in dissemination.
5. To determine which Eph/ephrin interactions are primarily involved in TEM through lymphatic endothelium.
6. To analyze the role of blood and lymphatic endothelia in the egress of CLL cells from lymph nodes and the role of Eph/ephrin interactions in this process related to S1P/S1PR1, CCL19/CCR7 and CXCL12/CXCR4.

RESULTS AND DISCUSSION

Our present results shed new light on the role of endothelial cells in CLL. In accordance with previous studies [3, 4, 6, 29–31] we demonstrate that endothelial cells can provide pro-survival signals to the leukemia cells within infiltrated tissues which are largely mediated by the release of pro-survival soluble factors. We show that CLL cells, but not normal B cells, can suffer apoptosis via endothelium when they are stimulated with tumor necrosis factor alpha (TNF- α) resulting in impaired survival after transendothelial migration (TEM). We observed that the increase in the spontaneous apoptosis in suspension culture was only evidenced after 12 hours resulting in decreased viability and not due to any soluble factors released from the endothelium. The viability of CLL cells in the TEM assays was even more decreased in the two TEM fractions and, especially, in the transmigrated cells (TM) compared to the control suspension cultures, indicating that a direct contact with endothelium was involved in these effects. This fact was not observed in normal B cells, suggesting that the pro-apoptotic effect in the endothelium was specific to CLL cells. It would be interesting to confirm our results under flow conditions in a model recently used by other authors [13, 32] or through adapting flow conditions to transwells [33]. All together, support that CLL cells receive apoptotic signals during TEM. Further in, we found a significant association with the development of lymphadenopathy (LA) and to a lower extent with some genetic defects in ZAP-70 rather than IGVH mutational status or CD38 expression. Samples having lymphadenopathy (LApos) showed a better survival outcome than those lacking it (LANeg) suggesting a possible association with the TEM capacity and integrin expressions.

Indeed, we found that CLL cells of patients with LA have a survival advantage during TEM mediated by $\alpha 4$ and αL integrin chains. Since $\alpha 4$ integrin expression in LApos cases have been correlated with enhanced TEM capacity [12–14] we investigated its possible association with TEM survival outcome.

We found that the cell surface expression of $\alpha 4$ and αL integrins and their corresponding β chains were lower in CLL cells compare to normal B cells, and significantly increased in LApos respect to LANeg cases together with enhanced TEM rate. To confirm this, we blocked $\alpha 4$ or αL interactions in separate TEM assays with recombinant forms of Vascular cell adhesion protein 1 (rhVCAM-1) or Intercellular Adhesion Molecule 1 (rhICAM-1) endothelial ligands, respectively. LApos cases showed a strong reduction in the TEM rate after blocking the two integrin interactions

compared to LANeg samples, confirming that both integrin chains play a critical role in TEM of LApos cases.

A dual effects of integrins on cell survival (i.e. interchanging apoptosis or survival outcomes) have been found in other cell types including hematopoietic tumor cells [40–43]. This can be related to potentiated and sustained adhesion [40], through un-ligated integrins [41], due to their activation state prior to ligation recruiting caspases [41] and/or ERK rather than Akt kinase [42]. These data showed that the integrin adhesions responsible of the enhanced TEM of CLL cells are also critically involved in the survival outcome.

In this study, we show that Integrin dependent survival outcomes are counteracted by EphrinA4 reverse signaling. EphrinA4 expression was significantly higher in LANeg than LApos samples while no significant differences were found according to ZAP-70, IGVH or CD38 parameters confirming its association with the LA condition of patients in agreement with our previous studies [16, 18]. EphrinA4 expression and TEM survival followed an inverse correlation in both, LA clinical groups contrasting with that observed for integrins. Accordingly, expression of ephrinA4 and CD49d followed an opposite pattern. EphA2Fc treatments of CLL cells resulted in ephrinA4 reverse signaling modulating integrin affinity [16]. These authors showed most of the effects onto integrin ligands, including the prosurvival ones observed in LApos cases onto either of the two endothelial ligands rhICAM-1 or rhVCAM-1. They also found that EphA2Fc induced a significant increase in the number of non-adhered CLL cells recovered from the adhesion assays. Indeed, we demonstrated that EphA2Fc treatment strongly inactivated VLA4 in the CLL cells even when they were artificially activated through addition of Mn^{2++} to culture medium. Altogether, these data supported that ephrinA4 signaling inhibits integrin affinities for their ligands and produces an increase in the apoptotic/survival signals.

Next, we study of role of ephrinA4 reverse signaling in TEM assays. We observed that the absence of ephrinA4 reverse signaling dramatically improves the survival of TM CLL cells from LApos cases. For TEM assays CLL cells were preincubated with saturating amounts of the EphA2Fc recombinant molecules, in accordance with the inhibition of integrin adhesions. We found a significantly increase in the viability of non- TM and TM

cells in all samples and, more importantly, also in the survival outcome of TM cells relative to basal levels in suspension cultures but not relative to the non-TM ones of LApos cases. Altogether, these data supported that ephrinA4 reverse signaling during diapedesis might inhibit integrin prosurvival signals into the CLL cells of LApos cases.

We also blocked ephrinA4 signaling in TEM assays through siRNA mediated knock-down. In terms of viability, ephrinA4 knock-down led to a marked decrease in the viability of non-TM cells in both LA clinical groups compared to siRNA neg nucleofected or untreated cells which was compatible with the increased adhesion and, hence, occurrence of pro apoptotic signals at initial steps of TEM. In contrast, the viability of TM cells was dramatically improved in the LApos but not the LANeg cases compared to untreated samples and, more importantly, to their corresponding non-TM cells. Together with the preceding integrin blocking or EphA2Fc TEM assays these results support that switching-off ephrinA4 reverse signaling during diapedesis represents a survival advantage for the CLL cells of LApos cases.

We found that soluble ephrinA4 binding to endothelium strongly potentiates survival advantage of CLL LApos cases. We confirmed higher levels of soluble ephrinA4 in the serum from lymphadenopathy patients compared to than in those lacking it, consistent with our previous study [18]. It is known that soluble ephrinA4 enhances extravasation of CLL cells after binding to EphA2 receptor on the surface of endothelial cells [16]. Therefore we pre incubated the TNF- HUVEC monolayer with saturating amounts of soluble recombinant human ephrinA4 (ephrinA4Fc) as previously described [18]. This resulted in an increased TEM rate of LApos but not of the LANeg cases. The viability of non- TM and TM cells of LApos samples was dramatically improved along with an enhancement in the survival outcome of TM cells compared to untreated control TEM assays, confirming the pro survival role of soluble ephrinA4 during TEM of LApos CLL cells. Next, immunofluorescence microscopy analysis with the transwell fillters showed that many CLL cells inside of HUVEC were distinctly located within caveolin-1 endothelial vacuoles and surrounded by ICAM-1 staining suggesting a TC route of TEM. Caveolin-1 mediated TC TEM is coupled to ICAM-1 and VCAM-1 transcytosis [26] similarly to what we have observed in the case of ephrinA4 mediated

internalization of EphA2 [16]. Moreover, EphA2 can physically interact with caveolin-1 at a biochemical level [45]. Image based counting of CLL cells at VE-Cadherin junctions (1 μ m) stained within caveolin-1 during TEM assays revealed an increased frequency of the later, under ephrinA4Fc treatments together with an enhanced TC pathway through the endothelial cell body. These data confirmed that soluble ephrinA4Fc does not induce a TEM of CLL cells through disassembling interendothelial junctions but rather through endothelial cells themselves likely through a TC route of TEM. Together these data may shed new light on the long-lasting question about the significance of a TC versus a PC route of TEM [26, 27, 46].

A possible correlation between apoptosis and in vivo extravasation was indirectly investigated by immunofluorescence microscopy analysis of human CLL lymphadenopathies and in vivo assays in mice. We found that ephrinA4 can be detected in the HEV of CLL lymphadenopathies and enhances the viability of CLL cells infiltrating the lymph node in adoptively transferred mice. We confirmed an accumulation of apoptotic cells within 200 μ m areas under the capsule in the three LA samples studied. Apoptotic cells were closer to HEV in outer than inner regions indirectly suggesting an association with extravasation. Indeed, we found that the number of apoptotic nuclei within \leq 20 μ m around the HEV and this was markedly higher in the outer than the inner LA areas suggesting that they could represent recently extravasated CLL cells. Besides, ephrinA4 staining was found not only in the infiltrating CLL cells but also within the endothelial cells of HEV bound to EphA2. Quantification of ephrinA4 staining bound to EphA2 in HEV in outer and inner regions revealed a significant higher frequency in the former thus following a completely opposed distribution to that observed for apoptotic cells. Altogether these data support a possible in vivo pro survival role of soluble ephrinA4 related to the extravasation of CLL cells into lymphadenopathies. Balb/c mice represent a good animal model to study in vivo lymph node or bone marrow seeding capacity of human CLL cells [12, 44]. Soluble ephrinA4 purified from patients sera led to an increase in the proportion and viability of the human CLL cells recovered from the lymph nodes of mice that were inoculated with LApos samples in a concentration-dependent manner. Using TEM assays, we compared TEM of CLL cells in blood (HUVEC) vs lymphatic

(HDLEC) endothelial monolayers. The results showed in all analyzed samples a higher migration index through HDLEC compared to HUVEC, probably due to the expression of ICAM-1 and VCAM-1.

TEM assays at 4 hours in response to chemokines through HDLEC CLL cells but not lymphocytes can be retained in inflamed lymphatic endothelia by blocking transmigration in response to CCL19 and CXCL12, probably due to increased adhesion in LApos cases, but not so in LANeg. Confocal microscopy analyzes on lymphadenopathy biopsy sections of CLL patients showed a large accumulation of leukemic cells within lymphatic vessels, thus suggesting that the diapedesis process is altered in CLL cells but not adhesion itself in this type of endothelium. However, in order to consolidate these facts, we must increase the number of patients in addition to perform new experiments that will allow us to consolidate this conclusion. Interestingly in TEM assays at 12 hours to study viability, a favorable response to the CCL19 and CXCL12 was observed in both the LApos and markedly greater cases in LANeg suggesting that the chemotactic signal through lymphatic endothelium requires longer time since the TEM assays at 4 hours did not show these results. On the other hand, we could also observe that LA CLL cells of TM fraction acquired survival signals whereas in No-TM fraction no effects appeared, suggesting that lymphatic endothelia provide viability to CLL cells during extravasation.

We found in lymphatic HDLEC a wide expression of Eph/ephrin family members like blood endothelial cells [28, 73] highlighting a high expression of EphA2 and EphB4. Therefore, ephrinA4 and ephrinB2 ligands expressed in CLL cells could interact with their receptor in lymphatic endothelia similar to what we showed with ephrinA4 in blood endothelium [28].

In the study of Eph/Ephrin interactions, we first described how the blockade of those ligated with the recombinant EphA-Fc2 and EphB4-Fc proteins in CLL cells generated an increased viability in the transmigrated cells of the LApos but not in LANeg in response to CXCL12. Therefore the blockade of the interaction of CLL-endothelial cell through ephrinA4 and ephrinB2 provides survival signals, suggesting that the reverse signals through ephrinA4 and ephrinB2 in the leukemic cells intervene via CXCR4

signaling providing viability.

Our results corroborate previous findings that showed that CLL cells had lower levels of S1PR1 expression compare to normal B lymphocytes and were able to respond to S1P [80, 81, 83, 84]. However, we found that this response is not directly proportional to the levels of the receptor expression, raising the possibility that there are other mechanisms that together with S1PR1 intervene in their migration. After studying the response to S1P through HUVEC and HDLEC monolayers in TEM (Basal-Apical), we observed that CLL cells did not respond through HUVEC in both LA conditions while magnifying its response in LANeg cases through TNF stimulated HDLEC. Our studies show, for the first time, an effect in vitro on CLL cells survival by demonstrating an increase in non-TM CLL cells and even higher in TM cells in HDLEC, both with and without S1P, indicating that egress through either type of endothelium provide survival signals to the CLL cells.

We thought that chemokine receptors responsible for infiltration and retention of CLL cells such as CCR7 and / or CXCR4 [126] could play a competitive role, together with S1PR1, between retention and lymph node egress as mentioned by some authors in the study of T lymphocytes [78, 99, 100]. Indeed, lymph node egress, through chemotactic stimuli with CCL19 and CXCL12 and with an enhanced response to S1P. However, when we study these conditions in TEM assays through HUVEC and HDLEC (Basal-Apical), the internalization of CCR7 and CXCR4 caused a block in TEM through both endothelial types in response to S1P. Although previous studies with T lymphocytes indicated that these stimuli behave very similarly through filters and TEM (basal-apical), and differing only in magnitude but not in the effects generated [78]. IN our hands, it doesn't seem to behave in the same way.

Interestingly, our results demonstrate the important role of EphA2-ephrinA4 and EphB4-ephrinB2 signaling as they seem to reverse the effects of TEM blockade by S1PR1 interactions with CCR7 and CXCR4 but showing clear differences between HUVEC and HDLEC endothelium.

Although studies of the dissemination of CLL cells through lymphatic endothelia and in vitro simulated processes of egress from the lymph node through lymphatic and blood

endothelium are preliminary, we can conclude that Eph/ephrin interactions might play a key role in the mechanism of interaction between this family of G protein-coupled receptors (GPCR) such as CCR7-S1PR1, and CXCR4-S1PR1.

Although more research needs to be done in this field, the results showed here open a new alternative way to study the biology of these mechanisms to prevent the presence of lymphadenopathy in patients with CLL and to a final extent improving the quality of life of these patients.

CONCLUSIONS

In conclusion our results show a role of endothelial cells in the survival of CLL cells during extravasation. Concretely, CLL cells but not normal B cells can receive apoptotic signals through physical contact with TNF- α activated endothelium impairing survival in TEM assays. In addition, the CLL cells of patients with lymphadenopathy (LApos) show a survival advantage during TEM that can be linked to an increased expression of $\alpha 4$ and αL integrin chains. Within this context, ephrinA4 expressed on the surface of CLL cells sequesters integrins and inactivates them resulting in reduced adhesion and inhibition of apoptotic/survival signals through them. In agreement, ephrinA4 silencing resulted in increased survival of CLL cells of LApos patients but not in LA neg patients. Similarly we observed that when a soluble ephrinA4 isoform was added to TEM assays in the serum of LApos patients, it contributed to CLL cells dissemination and survival in vivo. In supporting this, CLL lymphadenopathies showed a preferential accumulation of apoptotic CLL cells around high endothelial venules lacking ephrinA4. Moreover, soluble ephrinA4 isolated from sera of patients increased the number and viability of CLL cells recovered from the lymph nodes of adoptively transferred mice. We present evidence suggesting that soluble ephrinA4 mediated survival during TEM and this could enhance a transcellular TEM route of the CLL cells. Together these findings point to an important role of ephrinA4 in the nodal dissemination of CLL cells governing extravasation and survival.

We conclude that CLL cells might have a higher migration index through lymphatic compared to blood endothelium. Nonetheless, CLL cells migration through lymphatics was reduced compared to healthy B lymphocytes. Also, CLL cells appear to be retained in the lymphatic endothelium of the lymph nodes of patients with lymphadenopathy.

While CLL cells from LApos patients have a lower trans-migration ability than LANeg cases, both LA conditions appear to receive survival signals after diapedesis via lymphatic endothelia (HDLEC-TNF- α). Also, HDLEC have a large expression of Eph/ephrin family members specially EphA2 and EphB4. The chemotactic stimuli of CCL19 and CXCL12 along with the bidirectional signals of the Eph/ephrin increase expression of S1PR1 followed by an improved trans-migration (basal-Apical) through HUVEC-TNF and HDLEC-TNF during lymph node exit.

BIBLIOGRAPHY

1. Hallek, M., *Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment*. Am J Hematol, 2015. **90**(5): p. 446-60.
2. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1975. **46**(2): p. 219-34.
3. Binet, J.L., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. Cancer, 1981. **48**(1): p. 198-206.
4. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1840-1847.
5. Crespo, M., et al., *ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(18): p. 1764-1775.
6. Wiestner, A., et al., *ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4944-51.
7. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1848-54.
8. Dohner, H., et al., *Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis*. J Mol Med (Berl), 1999. **77**(2): p. 266-81.
9. Burger, J.A., *Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape*. Curr Opin Oncol, 2012. **24**(6): p. 643-9.
10. Ghia, P., N. Chiorazzi, and K. Stamatopoulos, *Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation*. J Intern Med, 2008. **264**(6): p. 549-62.
11. Badoux, X., et al., *Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and bone marrow endothelial cells: role of signal transducer and activator of transcription 3*. Hum Pathol, 2011. **42**(12): p. 1989-2000.
12. Buggins, A.G., et al., *Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription*. Cancer Res, 2010. **70**(19): p. 7523-33.
13. Long, B.W., et al., *Apoptosis and interleukin 7 gene expression in chronic B-lymphocytic leukemia cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1416-20.
14. Maffei, R., et al., *Physical contact with endothelial cells through beta1- and beta2-integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-*

- induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells. Haematologica, 2011. 97(6): p. 952-60.*
15. Moreno, A., et al., *Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. Blood, 2001. 97(1): p. 242-9.*
 16. McGettrick, H.M., et al., *Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium. J Leukoc Biol, 2006. 79(4): p. 779-88.*
 17. Borthwick, N.J., et al., *Transendothelial migration confers a survival advantage to activated T lymphocytes: role of LFA-1/ICAM-1 interactions. Clin Exp Immunol, 2003. 134(2): p. 246-52.*
 18. Ferrero, E., et al., *Transendothelial migration leads to protection from starvation-induced apoptosis in CD34+CD14+ circulating precursors: evidence for PECAM-1 involvement through Akt/PKB activation. Blood, 2003. 101(1): p. 186-93.*
 19. Miyasaka, M. and T. Tanaka, *Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. Nat Rev Immunol, 2004. 4(5): p. 360-70.*
 20. Hartmann, T.N., et al., *Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. Cancer Res, 2009. 69(7): p. 3121-30.*
 21. Till, K.J., et al., *The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. Blood, 2002. 99(8): p. 2977-84.*
 22. Till, K.J., et al., *CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. Blood, 2005. 105(12): p. 4813-9.*
 23. Zucchetto, A., et al., *CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. Cancer Res, 2009. 69(9): p. 4001-9.*
 24. Hordijk, P.L., *Recent insights into endothelial control of leukocyte extravasation. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. 73(8): p. 1591-1608.*
 25. Trinidad, E.M., et al., *An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression. Blood, 2009. 114(24): p. 5081-90.*
 26. Aasheim, H.C., et al., *A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes. Blood, 2000. 95(1): p. 221-30.*
 27. Alonso-Colmenar, L.M., et al., *Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells. Leuk Res, 2009. 33(3): p. 395-406.*
 28. Trinidad, E.M., A.G. Zapata, and L.M. Alonso-Colmenar, *Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration. Cell Adh Migr, 2010. 4(3): p. 363-7.*
 29. Larson, J., et al., *Endothelial EphA receptor stimulation increases lung vascular permeability. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. 295(3): p. L431-9.*
 30. Daar, I.O., *Non-SH2/PDZ reverse signaling by ephrins. Semin Cell Dev Biol, 2012. 23(1): p. 65-74.*
 31. Davids, M.S. and J.A. Burger, *Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. Open J Hematol, 2012. 3(S1).*
 32. Schnoor, M., et al., *Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation. Mediators Inflamm, 2015. 2015: p. 946509.*
 33. Rivera, J., R.L. Proia, and A. Olivera, *The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. Nat Rev Immunol, 2008. 8(10): p. 753-63.*

34. Yopp, A.C., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptors regulate chemokine-driven transendothelial migration of lymph node but not splenic T cells*. Journal of Immunology, 2005. **175**(5): p. 2913-2924.
35. Ledgerwood, L.G., et al., *The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics*. Nature Immunology, 2008. **9**(1): p. 42-53.
36. Capitani, N., et al., *S1P1 expression is controlled by the pro-oxidant activity of p66Shc and is impaired in B-CLL patients with unfavorable prognosis*. Blood, 2012. **120**(22): p. 4391-4399.
37. Borge, M., et al., *The Expression of Sphingosine-1 Phosphate Receptor-1 in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Impaired by Tumor Microenvironmental Signals and Enhanced by Piceatannol and R406*. Journal of Immunology, 2014. **193**(6): p. 3165-3174.
38. Sic, H., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptors control B-cell migration through signaling components associated with primary immunodeficiencies, chronic lymphocytic leukemia, and multiple sclerosis*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2014. **134**(2): p. 420-+.
39. Till, K.J., A.R. Pettitt, and J.R. Slupsky, *Expression of Functional Sphingosine-1 Phosphate Receptor-1 Is Reduced by B Cell Receptor Signaling and Increased by Inhibition of PI3 Kinase delta but Not SYK or BTK in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells*. Journal of Immunology, 2015. **194**(5): p. 2439-2446.
40. Patrussi, L., et al., *Enhanced Chemokine Receptor Recycling and Impaired S1P1 Expression Promote Leukemic Cell Infiltration of Lymph Nodes in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Cancer Res, 2015. **75**(19): p. 4153-63.
41. Lopez-Giral, S., et al., *Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(2): p. 462-71.
42. Davids, M.S. and J.R. Brown, *Targeting the B cell receptor pathway in chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2012. **53**(12): p. 2362-70.
43. Garcia-Bernal, D., et al., *Sphingosine-1-phosphate activates chemokine-promoted myeloma cell adhesion and migration involving alpha4beta1 integrin function*. J Pathol, 2013. **229**(1): p. 36-48.
44. Hoellenriegel, J., et al., *The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2011. **118**(13): p. 3603-3612.
45. Friedberg, J.W., et al., *Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2010. **115**(13): p. 2578-2585.
46. Advani, R.H., et al., *Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Has Significant Activity in Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(1): p. 88-94.
47. Boyd, A.W., P.F. Bartlett, and M. Lackmann, *Therapeutic targeting of EPH receptors and their ligands*. Nature Reviews Drug Discovery, 2014. **13**(1): p. 39-62.



Anexos

ANEXOS

Anexo I

Datos clínicos de los pacientes

Tabla 1: Datos clínicos y moleculares de los pacientes. Para el estudio del apartado 1 de resultados

n.	G.	Edad (años)	Rai	LA	IgHV ^a	ZAP-70 ^b	CD38 ^c	del 13q	del 17p	del 11q	TRI +12	Ephrin A4 ^d	αL	Integrin chain ^e β2	α4	β1
1	F	74	bajo	no	M	neg	neg	-	-	-	+	15.90	11.95	32.06	25.00	21.93
2	M	69	bajo	no	M	neg	pos	-	-	-	-	30.90	7.37	22.91	9.53	45.00
3	F	91	int	si	UM	neg	pos	-	-	-	-	20.20	13.32	67.84	63.80	55.24
4	M	59	int	si	M	neg	pos	-	-	-	-	7.70	13.20	57.45	24.28	50.74
5	M	78	alto	no	M	pos	neg	+	-	-	-	17.80	17.46	30.44	26.00	15.36
6	M	73	alto	si	M	pos	pos	-	+	-	-	10.70	7.84	23.85	89.00	55.00
7	F	69	alto	si	M	pos	neg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.30	7.60	14.45	52.00	45.00
8	F	69	bajo	no	UM	neg	neg	+	-	-	-	36.47	9.92	13.69	19.60	7.58
9	F	78	int	si	M	neg	neg	-	-	-	-	10.25	8.73	29.23	63.56	35.00
10	F	73	int	si	M	neg	pos	+	-	-	-	7.83	42.12	65.56	56.78	59.23
11	F	65	alto	si	UM	pos	neg	+	+	-	-	6.44	5.89	13.56	54.00	33.62
12	M	76	int	si	UM	pos	neg	+	-	-	-	10.99	10.54	19.81	45.00	53.71
13	F	71	int	si	M	pos	neg	-	-	-	+	12.62	35.48	56.68	16.53	69.67
14	F	58	alto	si	M	neg	neg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10.46	10.85	21.07	78.00	63.00
15	M	69	int	si	UM	pos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9.63	51.00	54.00	56.00	25.00
16	F	63	int	si	M	neg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11.25	20.00	23.00	98.00	65.00
17	M	79	int	no	UM	neg	neg	-	-	-	+	56.25	32.00	25.00	12.00	27.00
18	F	62	int	si	M	neg	n.d.	-	-	-	-	6.98	8.00	68.00	34.00	32.00
19	F	85	int	si	M	pos	neg	-	-	-	+	4.69	6.00	66.00	65.25	45.00
20	F	77	int	si	UM	pos	neg	+	-	-	-	26.53	24.00	52.00	65.00	56.00
21	F	88	bajo	no	M	pos	neg	+	+	+	-	14.35	15.00	36.00	15.00	65.00
22	F	72	bajo	no	UM	pos	neg	+	-	+	-	62.25	7.00	35.00	15.00	53.00
23	M	75	bajo	no	UM	pos	neg	+	-	-	-	70.00	18.00	15.00	18.00	21.00
24	F	83	alto	si	UM	neg	neg	-	-	-	-	18.69	33.00	84.00	70.00	45.00
25	F	58	bajo	no	M	pos	pos	-	+	-	-	68.00	26.00	29.00	33.00	56.00
26	F	66	bajo	no	UM	pos	neg	+	-	+	-	25.25	35.00	33.00	35.00	25.00
27	M	73	bajo	no	M	pos	neg	+	-	-	-	36.25	12.00	38.00	39.00	21.00
28	M	73	int	si	M	pos	neg	-	-	-	-	14.56	54.00	61.00	66.00	68.00
29	M	68	bajo	no	UM	pos	pos	+	-	-	-	11.25	9.00	15.00	52.00	23.00
30	M	85	int	si	UM	pos	pos	+	-	+	-	11.25	36.00	12.00	63.00	33.00

a. Secuencias con una homología germinal $\geq 98\%$ fueron consideradas como No Mutadas (UM). b y c Determinadas por citometría de flujo, Positivo = ZAP-70 > 25% células teñidas; CD38 > 35% células teñidas. d y c Determinada por citometría de flujo datos en intensidad media de fluorescencia (MFI)

Tabla 2. Datos clínicos de los pacientes de LLC. Para el estudio del apartado 2 y 3 de resultados

CASO LLC	LA	RAI	BINET	IgHV ^a	ZAP 70 ^b	CD 38 ^c	d13q	d11q	d17p	TRI 12	Ephrin A4 ^c	Ephrin B2 ^d
LLC 1	Si	I	A	No Mutado	POS	NEG	SI	NO	NO	NO	10.64	6.03
LLC 2	No	0	A	Mutado	NEG	POS	SI	SI	NO	NO	9.24	6.4
LLC 3	No	0	A	No Mutado	POS	Indeterminado	SI	NO	SI	NO	10.48	6.69
LLC 4	No	0	A	Mutado	POS	POS	NO	NO	SI	NO	11.71	7.1
LLC 5	Si	I	A	Mutado	Indeterminado	NEG	NO	NO	NO	NO	9.27	5.25
LLC 6	Si	I	A	Mutado	NEG	NEG	NO	NO	NO	NO	n.d.	n.d.
LLC 7	No	I	A	Mutado	NEG	POS	NO	NO	NO	SI	9.12	7.53
LLC 8	Si	IV	C	Mutado	NEG	POS	NO	SI	NO	NO	9.76	6.26
LLC 9	Si	I	A	n.d.	NEG	POS	NO	NO	NO	NO	6.2	4.64
LLC 10	SI	IV	C	n.d.	POS	NEG	NO	SI	NO	SI	7.78	3.57
LLC 11	Si	IV	B	n.d.	n.d.	n.d.	SI	NO	NO	NO	9.82	6.53
LLC 12	Si	I	A	n.d.	NEG	POS	SI	SI	NO	NO	9.64	6.58
LLC 13	No	I	A	Mutado	POS	NEG	SI	NO	NO	NO	8.68	6.65
LLC 14	No	0	A	No Mutado	POS	POS	SI	NO	NO	SI	9.63	5.84
LLC 15	No	0	A	No Mutado	Indeterminado	POS	SI	NO	NO	NO	11.99	6.6

a. Secuencias con una homología germinal $\geq 98\%$ fueron consideradas como No Mutadas (UM). b y c Determinadas por citometría de flujo, Positivo = ZAP-70 > 25% células teñidas; CD38 > 35% células teñidas. d y c Determinada por citometria de flujo datos en intensidad media de fluorescencia (MFI)

Anexo II

Tampones y medios de cultivo

1. Tampones para RT-PCR

TAE 1x

- 40 mM Tris-Acetato (Panreac)
- 1,142 mL de Ácido Acético Glacial 99,5% (Panreac)
- 1 mM EDTA (pH = 8,0; MECRK)
- Diluido en H₂O Milli-Q

Tampón de carga

- 20 mL de H₂O destilada
- 20 mL de Glicerol (Sigma -Aldrich)
- 0,1 g de Azul de Bromofenol (Sigma -Aldrich)
- 0,1 g de Naranja de Acridina (Sigma -Aldrich)
- 0,1 g de Cianol Xileno (Sigma -Aldrich)

2. Tampón Salino Fosfato

PBS 1X

- 8,4 mM Na₂HPO₄ (Panreac)
- 2,6 mM NaH₂PO₄ (Panreac)
- 150 mM NaCl (Panreac)
- Diluido en H₂O Milli-Q
- pH =7,2 - 7,4

PBS-EDTA

- 5 mM EDTA (pH = 8,0; MECRK)
- Diluido en PBS 1X

PBS-EDTA-TRIPSINA

- Trispsina (Sigma -Aldrich) 5 veces diluida en PBS - EDTA

PBS-FACS

- 2,5 mM EDTA (pH = 8,0; MECRK)
- 0,1% de BSA (Sigma -Aldrich)
- 0,01% de acida (Panreac)
- Diluido en 500 mL de PBS 1X

PBS-EDTA-FBS

- 2% Suer bovino Fetal (FBS; gibco)
- Diluido en PBS-EDTA

PBS-BSA (0,1% de BSA) para inmuno-fluorescencias

- 0,1 % peso/volumen de BSA (Sigma -Aldrich)
- Diluido en PBS 1X

3. Tampón para tinción con Anexina

Tampón -Anexina

- 10 mM HEPES (pH =7,4; Sigma -Aldrich)
- 140 mM NaCl (Panreac)
- 2,5 mM CaCl₂ (Panreac)
- Diluido en H₂O Milli-Q

4. Medios de cultivo

Medio Completo

- RPMI 1640 (Sigma -Aldrich)
- 10% FBS suero bovino fetal (gibco)
- 1 mM L-Glutamina (Sigma -Aldrich)
- 100 µg/mL Estreptomicina (Sigma - Aldrich)
- 100 U/mL Penicilina (Sigma -Aldrich)

Medio Completo BSA

- RPMI 1640 (Sigma -Aldrich)
- 1% BSA (Sigma-Aldrich A7030)
- 1 mM L-Glutamina (Sigma -Aldrich)
- 100 µg/mL Estreptomicina (Sigma - Aldrich)
- 100 U/mL Penicilina (Sigma -Aldrich)

Medio Experimental

- RPMI 1640 (Sigma -Aldrich)
- 2% suero bovino fetal (FBS; gibco)
- 1 mM L-Glutamina (Sigma -Aldrich)
- 100 µg/mL Estreptomicina (Sigma -Aldrich)
- 100 U/mL Penicilina (Sigma -Aldrich)

RPMI-FBS

- 10% FBS suero bovino fetal (gibco)
- Diludo en RPMI 1640 (Sigma -Aldrich)

Anexo III

Anticuerpos

Tabla 1. Anticuerpos purificados para aislamientos.

Todos los anticuerpos son de isotipo IgG, están desarrollados en ratón contra humano.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	CLON
CD19- biotinado	Immunostep	A3-B1
CD2	BD Biosciences	RPA-2.10
CD3	BD Biosciences	ALTOT3a
CD13	BD Biosciences	WM15
CD14	BD Biosciences	M5E2
CD56	BD Biosciences	B159

Tabla 2. Anticuerpos no modificados o conjugados directamente a fluorocromo .

Todos los anticuerpos son de isotipo IgG, están desarrollados en ratón contra humano

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	FLUOROCROMO	CLON
CD19	Immunostep	FITC	A3-B1
CD5	BD Biosciences	PE-CY5	UCHT2
CD54 (ICAM-1)	Biolegend	FITC	HA58
CD106 (VCAM-1)	BD Biosciences	APC	51-10C9
S1PR1	R&D Systems	Purificado	218713

Tabla 3. Anticuerpos Eph/ephrin no modificados.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	CLON	ISOTIPO
EphA1	R&D Systems	Policlonal	IgG de cabra
EphA3	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	IgG de conejo
EphA8-b	R&D Systems	Policlonal	IgG de cabra
EphrinA3	AbCam	Policlonal	IgG de conejo
EphrinA4-b	R&D Systems	Policlonal	IgG de cabra
EphB1	R&D Systems	Policlonal	IgG de ratón
EphB3	R&D Systems	Policlonal	IgG de cabra
EphB6	R&D Systems	Policlonal	IgG de ratón
EphrinB1-b	R&D Systems	Policlonal	IgG de cabra
EphrinB2-b	R&D Systems	Policlonal	IgG de cabra

Tabla 4. Anticuerpos Eph/ephrin directamente unidos a fluorocromo.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	FLUOROCROMO	CLON
EphA2	Santa Cruz Biotechnology	PE	K α -5H5
EphA4	Santa Cruz Biotechnology	PE	Policlonal
EphB2	R&D Systems	Alexa Fluor [®] 488	512012
EphB4	R&D Systems	PE	395810

Tabla 5. Anticuerpos empleados para e inmunofluorescencias.

ANTICUERPO	FLUOROCROMO	CASA COMERCIAL	CLON	ISOTIPO
CD54 (ICAM-1)	FITC	Biolegend	HA58	Mouse IgG
CD106 (VCAM-1)	APC	BD Biosciences	51-10C9	Mouse IgG
CD31	Alexa Fluor [®] 488/647	BD Biosciences	M89D3	Mouse IgG
EphA2	Purificado	R&D Systems	Policlonal	IgG de cabra
EphrinA4	Purificado	R&D Systems	Policlonal	IgG de cabra
VE-cadherina	Purificado	Santa Cruz Biotechnology	F-8	IgG de ratón
Caveolina-1	Purificado	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	IgG de conejo
LYVE-1	Purificado	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	IgG de conejo
PNAd	Biotinado	Biolegend	MECA-79	IgM de rata

Anexo IV

Proteínas recombinantes y Quimiocinas

Tabla 1. Proteínas recombinantes y quimiocinas.

PROTEÍNA RECOMBINANTE	CASA COMERCIAL
rh EphA2	R&D Systems
rh EphB4	R&D Systems
rh <i>ephrinA4</i>	R&D Systems
rh <i>ephrinB2</i>	R&D Systems
rh ICAM-1	R&D Systems
rh VCAM-1	R&D Systems
S1P	Santa Cruz <i>Biotechnology</i>
CCL19	PEPROTECH
CXCL12	PEPROTECH

Anexo V

Cebadores

Tabla 1. Cebadores para EphA.

La localización cromosómica para cada una de las moléculas a amplificar se detalla de cada una de ellas.

Molécula diana	Extremo Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases	Producto ADNg (bp)	Producto ADNc (bp)
EphA1 7q34	5´	GCCACCATCTGTACCTGTGA	20	659	357
	3´	CTGACACTCCATTTTGGGCT	20		
EphA2 1p36	5´	GAACAACTGAAGCCCCTGAA	20	402	290
	3´	ATGATGTTGTGGTGGCTGAA	20		
EphA3 3p11.2	5´	CCAGCAACATGGATTGTCAG	20	909	1150
	3´	CAAACCTGTCGAGGGAGGAAG	20		
EphA4 2q36.1	5´	TGACGCATCCTGCATTAAGA	20	9242	516
	3´	ATAGGAATCTTGCCACCCCT	20		
EphA5 4q13.1	5´	ATCCCAATCAAGCTGTCCAC	20	14411	345
	3´	GTGAACTGCCCATCGTTTTT	20		
EphA7 6q16.1	5´	GACCAAGAAGGCGATGAAGA	20	6404	399
	3´	TGCATCTAGGGCTCCATTTT	20		
EphA8 1p36.12	5´	TCCCAGAGCCCCAGTTCTAT	20	475	276
	3´	ATGTTGGGATGGTCGAATTG	20		
EphA8 1p36.12	5´	TGCCACTGTGACCTCAGCTA	20	2845	610
	3´	ACACTAGCCTGCCTCTGAGC	20		
EphA10 1p34.3	5´	CCAAGTGTGCCCTGACTACCTGTC	24	990	219
	3´	G TTCAGCCAAAGAGATGCCTAGGCTCAC	28		

Tabla 2. Cebadores para EphB.

La localización cromosómica para cada una de las moléculas a amplificar se detalla de cada una de ellas.

Molécula diana	Extrem o Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases	Producto ADNg (bp)	Producto ADNc (bp)
EphB1 3q21-q23	5´	CTTAACATCATTTCGCCTGGA	20	66544	1072
	3´	GAGAAATGGAGATTGCCTGC	20		
EphB2 1p36.1- p35	5´	TACAGAGCAGACCTGGACCC	20	1974	290
	3´	GAAGGTGTACTGGGTGTGGG	20		
EphB3 3q21-qter	5´	TGAGTTCATGGAAAACGCG	20	707	240
	3´	GTAGGATCGGAGGGGTCATC	20		
EphB4 7q22	5´	GAGAGCTGTGTGGCAATCAA	20	5363	214
	3´	GAAGTGTCCGTCGTTTAGCC	20		
EphB6 7q33-q35	5´	GATTGAGGAGGTCATTGGGA	20	2514	1022
	3´	GTTGCTGAAGGAGCTGGATG	20		

Tabla 3. Cebadores para EPHRINA. La localización cromosómica para cada una de las moléculas a amplificar se detalla de cada una de ellas.

Molécula diana	Extremo Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases	Producto ADNg (bp)	Producto ADNc (bp)
<i>ephrinA1</i> 1q21-q22	5'	ACCCAGACCCATAGGAGACC	20	6300	828
	3'	ATACTGACCCGTTTTGAGGC	20		
<i>ephrinA2</i> 19p13.3	5'	CTACATCTCTGCCACGCCTC	20	-	300
	3'	GCGTCTCTATTTGGTCTCGG	20		
<i>ephrinA3</i> 1q21-q22	5'	ATCTGGATATTTACTGCCCGC	21	1407	544
	3'	CTAGGAGGCCAAGAACGTCA	20		
<i>ephrinA4</i> 1q21-q22	5'	GGAAGTCCAGTAACCCAGG	20	5123	362/528
	3'	ATCTTGGGAGGACTCTGGCT	20		
<i>ephrinA5</i> 5q21	5'	CTTCTCGCTCTCCTACCCCT	20	289543	872
	3'	TAATGTCAAAGCATCGCCA	20		

Tabla 4. Cebadores para EPHRINB. La localización cromosómica para cada una de las moléculas a amplificar se detalla de cada una de ellas.

Molécula diana	Extremo Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases	Producto ADNg (bp)	Producto ADNc (bp)
<i>ephrinB</i> 1Xq12	5'	GGAGAAGAGCGACACCGAAG	20	11048	1213
	3'	CGGGCACTCAGACCTTGTAG	20		
<i>ephrinB</i> 213q33	5'	CATGGCTGTGAGAAGGGACT	20	41981	1059
	3'	AGGCATCGGGACATTAGGTG	20		
<i>ephrinB</i> 317p13.1	5'	CCTTTTGCTGAATTGATCCCT	21	-	1385
	3'	ATTAAACTGGAGGAGCACCC	20		

Tabla 5. Cebadores para siRNA.
(Stealth Select siRNAs duplexes Invitrogen, Thermofisher)

Molécula diana	Cebadores	Extremo Cebador	Secuencia Cebadores	Nº de bases
<i>ephrinA4</i>	Pareja 1	5'	CCC UGC CCU UUG GCC AUG UUC AAU U	25
		3'	AAU UGA ACA UGG CCA AAG GGC AGG G	25
	Pareja2	5'	CCA GAG AGU UCU GGC CAG UGC UUG A	25
		3'	UCA AGC ACU GGC CAG AAC UCU CUG G	25
	Pareja 3	5'	GGU GCC AAU UCA GAC CGA CAA GAU G	25
		3'	CAU CUU GUC GGU CUG AAU UGG CAC C	25
EphA2	Pareja 1	5'	GCA AGG AAG UGG UAC UGC UGG ACU U	25
		3'	AAG UCC AGC AGU ACC ACU UCC UUG C	25

Anexo VI

Publicaciones

EphrinA4 plays a critical role in $\alpha 4$ and αL mediated survival of human CLL cells during extravasation

Miguel A. Flores^{1,3,*}, Paula Fortea^{1,3,*}, Eva M. Trinidad⁴, Dolores García², Gloria Soler², Francisco J. Ortuño², Agustín G. Zapata^{1,3}, Luis M. Alonso-Colmenar^{1,3}

¹Cytometry and Fluorescence Microscopy Research Center, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

²Hematology and Medical Oncology Department, HGU Morales Meseguer, Marqués de los Velez, 30008 Murcia, Spain

³Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Universidad Complutense de Madrid, José Antonio Nováis, 2, 28040 Madrid, Spain

⁴Transformation and Metastasis Group, Cancer Epigenetic and Molecular Biology Program (PEBC), IDIBELL, 08908 Barcelona, Spain

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Luis M. Alonso-Colmenar, email: lmalonso@ucm.es

Keywords: leukemia, extravasation, apoptosis, integrin, ephrin

Received: March 04, 2016

Accepted: June 08, 2016

Published: June 27, 2016

ABSTRACT

A role of endothelial cells in the survival of CLL cells during extravasation is presently unknown. Herein we show that CLL cells but not normal B cells can receive apoptotic signals through physical contact with TNF- α activated endothelium impairing survival in transendothelial migration (TEM) assays. In addition, the CLL cells of patients having lymphadenopathy (LApos) show a survival advantage during TEM that can be linked to increased expression of $\alpha 4$ and αL integrin chains. Within this context, ephrinA4 expressed on the surface of CLL cells sequesters integrins and inactivates them resulting in reduced adhesion and inhibition of apoptotic/survival signals through them. In agreement, ephrinA4 silencing resulted in increased survival of CLL cells of LApos patients but not LA neg patients. Similarly was observed when a soluble ephrinA4 isoform was added to TEM assays strongly suggesting that accumulation of this isoform in the serum of LApos patients could contribute to CLL cells dissemination and survival in vivo. In supporting, CLL lymphadenopathies showed a preferential accumulation of apoptotic CLL cells around high endothelial venules lacking ephrinA4. Moreover, soluble ephrinA4 isolated from sera of patients increased the number and viability of CLL cells recovered from the lymph nodes of adoptively transferred mice. Finally, we present evidence suggesting that soluble ephrinA4 mediated survival during TEM could enhance a transcellular TEM route of the CLL cells. Together these findings point to an important role of ephrinA4 in the nodal dissemination of CLL cells governing extravasation and survival.

INTRODUCTION

Compelling evidence supports that CLL cell survival within the tumor microenvironment is highly dependent on extrinsic signals provided by non-leukemic cell types [1, 2]. Endothelial cells can protect CLL cells from spontaneous apoptosis in vitro through soluble factors and/or direct physical contacts [1–7]. Both findings suggest that endothelial cells could play a similar role during extravasation an issue that, to our knowledge, has not been

previously addressed. It has been emphasized a major effect of transendothelial migration (TEM) in the survival of non-leukemia cell types including granulocytes [8], T lymphocytes [9] or CD34+CD14+ monocyte precursors [10]. In agreement, the extravasation through inflamed vascular vessels or the specialized high endothelial venules (HEV) in lymphoid tissues [11] could affect the survival outcome of CLL cells.

In CLL cells, the TEM capacity is strongly dependent on $\alpha 4$ (CD49d) expression which together with

α L integrin (CD11a) contributes to enhance it in patients having lymphadenopathy [12–14]. CD49d can also mediate contact dependent survival of CLL cells within tumor microenvironment [6, 15] associating with inferior prognosis groups including unmutated (UM) IgHV or CD38 expressing cases. Together these lines of evidence strongly suggest that integrin dependent extravasation may be further linked to a survival advantage that needs, however, a definitive demonstration.

Moreover, CLL cells show a reduced TEM compared to that of normal B cells as demonstrated under static or flow in vitro TEM conditions [12, 14, 16] and in an adoptively transferred mice in vivo model [12]. We showed that this can be in part linked to overexpression of ephrinA4, a GPI-membrane-linked ligand of the Eph receptor family of tyrosine kinases which is found as a membrane bound and a soluble isoforms in CLL and normal B cells [17, 18]. Reverse signaling through the cell surface expressed isoform inhibits integrin mediated adhesions of CLL cells to endothelium through binding to EphA2 receptor on the surface of endothelial cells [16, 19] likely impairing extravasation. By contrast, the soluble isoform enhances TEM of CLL cells in vitro when bound by endothelial cells through EphA2. This process could be coupled to enhanced diapedesis through sequestration and internalization of ICAM-1 and VCAM-1 [16] rather than through increased vascular permeability of the altered endothelial junctions found after ephrinA1 treatment [20]. Moreover patients having lymphadenopathy show increased serum levels of ephrinA4 in addition to decreased expression of ephrinA4 on the surface of CLL cells [18]. Together these findings pointed to soluble isoform as a likely mechanism contributing to nodal dissemination of CLL cells which needed further confirmation in a more physiological in vivo setting [21–23]. Herein we present for the first time in vitro and in vivo evidence suggesting that the major role of two ephrin A4 isoforms in CLL could be related with a non-previously described mechanism of survival linked to extravasation strongly dependent on integrin signaling.

RESULTS

CLL cells, but not normal B cells, can suffer apoptosis through physical contact with TNF- α activated endothelium resulting in impaired survival after transendothelial migration (TEM)

The possible impact of extravasation in the survival of CLL cells was analyzed in the widely accepted [24] transendothelial migration (TEM) assays. HUVEC monolayers grown onto the filters were preactivated for 4 hour with TNF- α and then extensively washed in fresh culture medium before addition of the CLL cells onto them. The percentage of apoptotic (Annexin-V^{pos} 7AAD^{neg}) and viable cells (Annexin-V^{neg} 7AAD^{neg})

were measured by flow cytometry in the transmigrated (TM) and the non-transmigrated (non-TM) fractions after 4 or 12 hours. Values were compared to basal levels in control suspension cultures done in the bottom chambers of separate wells having or not a TNF α pretreated HUVEC monolayer onto the filter. A clear increase in the spontaneous apoptosis in control suspension cultures was only evidenced after 12 hours (Supplementary Figure S2) resulting in decreased viability irrespectively of the presence of a TNF-HUVEC monolayer on top of the filter (Figure 1A-i) discarding any effect of soluble factors from endothelium. The viability of CLL cells in the TEM assays was even more decreased in the two TEM fractions and, especially, in the TM cells compared to basal levels in the control suspension cultures in bottom chambers (Figure 1A-i) indicating that direct contact with endothelium was involved in these effects. Normal B cells suffered no significant changes in viability or an increased one in some samples (Figure 1A-ii) suggesting a proapoptotic effect of endothelium specifically in the CLL cells. Importantly, CLL cells transmigrating through non-activated HUVEC showed no significant changes in viability compared to basal levels (Supplementary Figure S3) highlighting that only activated endothelium mediated the apoptotic signals. The low cellular density in bottom chambers could explain the decreased viability of TM cells compared to the non-TM ones. However, no significant improvement in viability of TM cells was found when cell numbers in the bottom chambers were increased through direct addition of CLL cells at the initiation of the assays (Supplementary Figure S4). To further confirm that CLL cells could receive apoptotic signals while crossing the TNF-HUVEC monolayer we examined TUNEL stained filters through confocal microscopy. This demonstrated the occurrence of numerous apoptotic CLL cells in both sides of the filters with TNF-HUVEC compared to untreated HUVEC assays (Figure 1A-iii). Although absolute numbers of total and apoptotic CLL cells predominated in the upper side of filters (Figure 1A-iii, cartoons) the frequency of apoptotic cells was significantly higher in the underside (Figure 1A-iii) in agreement with a higher frequency of apoptotic cells in the bottom than the upper chambers, as determined by flow cytometry (Figure 1A-i). Together these data supported that CLL cells receive apoptotic signals during TEM.

Since previous studies had reported prosurvival effects of endothelium in CLL cells cocultured several days [1–7], we analyzed the endothelium role in CLL viability cocultured onto TNF- α or unstimulated HUVEC monolayers at 12 hours or at longer time points 2 or 5 days. In line with previous studies [1–7] we observed a prosurvival effect onto unstimulated and to a lower extent TNF-HUVEC but not earlier than 2 days (Figure 1B-i). Indeed, these prosurvival effects with TNF-HUVEC were preceded by a drop in CLL viability at 12 hours (Figure 1B-i) in concert with our TEM assays. In

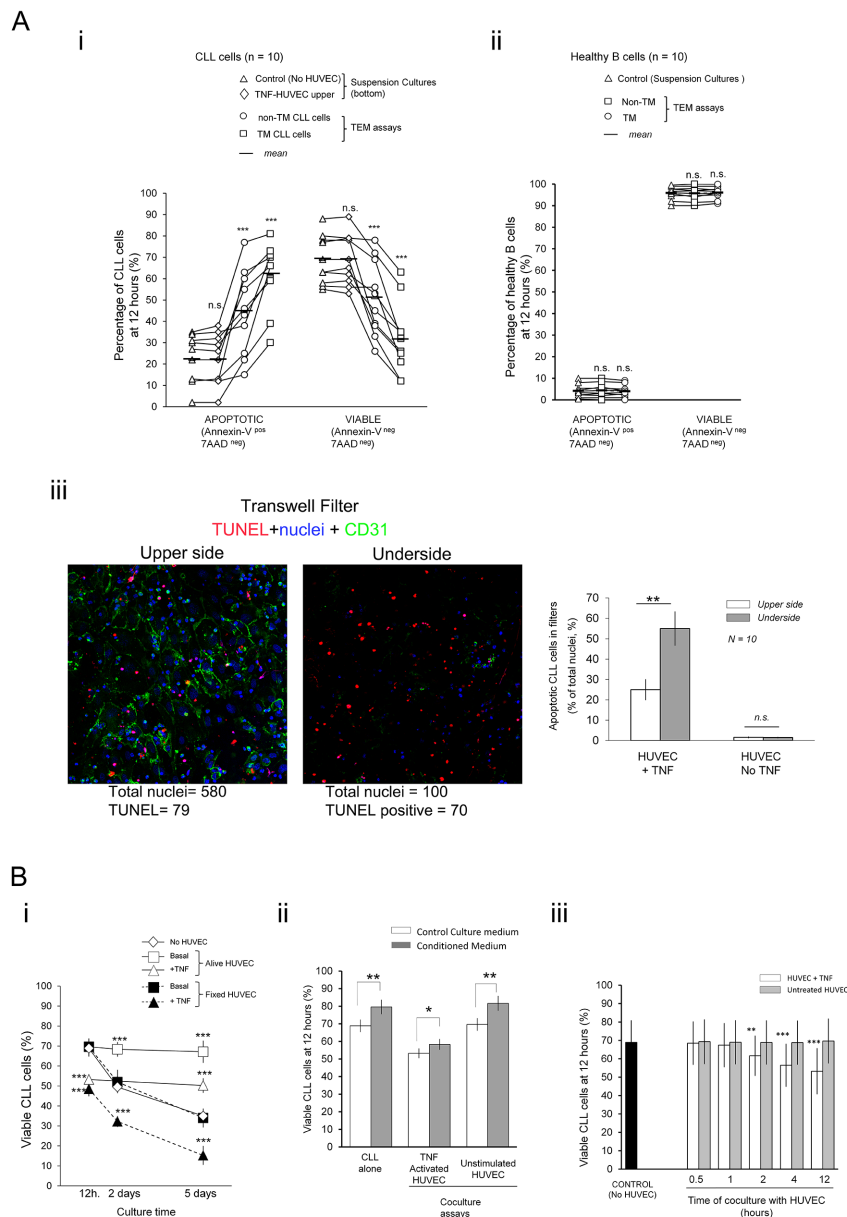


Figure 1: Physical contacts of CLL cells with TNF-activated endothelial cell monolayers during transendothelial migration (TEM) impair survival of leukemia cells. A. CLL cells from 10 patients (n. 1-10; Table 1) (i) or normal B cells isolated from the peripheral blood of 10 healthy donors (ii) were added onto TNF α pretreated confluent monolayer of HUVEC (TNF-HUVEC) in transwell plates (Transendothelial Migration (TEM) assays) or to the bottom compartment of separate transwells (Suspension cultures)(5×10^5 cells/well). Suspension cultures of CLL cells were carried out in bottom wells either with or without a TNF-HUVEC onto the upper filter. The percentage of apoptotic and viable cells in each experimental condition were determined after 12 hours by flow cytometry analysis of Annexin-V-PE/7AAD double staining. Each experimental condition was compared to basal levels in control suspension cultures without HUVEC (TEM assays: non-TM, non-transmigrated; TM, transmigrated). (iii) Transwell filters of TEM assays with CLL cells performed with TNF- α activated (+TNF) or untreated HUVEC (No TNF) were fixed and fluorescently stained with TUNEL (red; apoptotic nuclei), anti-CD31 (green; HUVEC junctions) and Hoechst (blue; total nuclei). Laser confocal microscopy images were taken from the upper and underside of filters (magnification 20x; ≥ 3 microscopy fields per filter; 1-2 filters per sample). Cartoons are from a representative TEM experiment with TNF-HUVEC. Total and TUNEL stained nuclei were counted (Image J; > 200 nuclei per sample and experimental condition) and the frequency of apoptotic cells in each side of the filters calculated (Right panel). Note that although the absolute number of nuclei was higher in the upper than the undersides the percentages of apoptotic CLL cells increased in the later one. Data are mean (\pm SD) from ten independent samples. **B.** i) CLL cells were cultured onto alive or paraformaldehyde fixed (fixed) TNF- α preactivated or untreated confluent HUVEC monolayers. The percentages of viable CLL cells (Annexin-V-neg 7AAD neg) were determined at the indicated time points by flow cytometry and compared to control suspension cultures without HUVEC. ii) CLL cells were cultured for 12 hours in suspension or onto alive HUVEC with normal culture medium or conditioned medium from 5 days CLL-HUVEC cocultures. iii) CLL cells were harvested at the indicated time-points from cocultures onto untreated or TNF-activated HUVEC and left in culture alone up to 12 hours. Two-tailed Student's t-test significance values: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s. non-significant.

addition, paraformaldehyde fixed instead of alive HUVEC monolayers lacked any pro-survival effects in the cocultured CLL cells and, more importantly, emphasized the proapoptotic ones onto TNF-HUVEC even at 2 or 5 days (Figure 1B-i) pointing to the release of pro-survival soluble factors in the alive conditions. Indeed, conditioned media from 5 days cocultures with alive HUVEC had pro-survival effects in the CLL cells cultured for 12 hours alone or under any coculture condition (Figure 1B-ii) definitively demonstrating that soluble pro-survival factors accumulate after prolonged coculture. We further concluded that 2 hours coculture of CLL cells with TNF-HUVEC was sufficient to receive proapoptotic signals that irreversibly led to their apoptosis when harvested and left in culture alone until 12 hours (Figure 1B-iii).

Together these data conclusively demonstrated that CLL cells suffer apoptotic signaling through direct contacts with TNF-HUVEC and likely during extravasation which needed further investigation.

CLL cells of patients having lymphadenopathy (LApos) have a survival advantage during TEM mediated by $\alpha 4$ and αL integrin chains

Having established that TEM impairs survival of CLL cells, we examined its possible association with disease related parameters including lymphadenopathy (LA), IGHV gene mutational status or ZAP-70 or CD38 antigens expression. To this end, the sample size was increased by including 20 additional patients in TEM assays (Table 1). In all cases examined we confirmed a decline in the viability of both TEM fractions relative to basal levels and mainly in the TM cells (from 68% mean basal values to 48% mean values in the TM cells) (Figure 2A-i). Nevertheless, because the viability levels in TEM assays varied between samples we normalized them to the basal ones as a measure of survival outcome. This allowed us to find a significant association with the lymphadenopathy (LA) condition of patients and to a lower extent ZAP-70 rather than IGVH mutational status or CD38 expression (Figure 2A-ii). Samples having lymphadenopathy (LApos) showed a better survival outcome than those lacking it (LANeg) (Figure 2A-ii) suggesting a possible association with the TEM capacity. In supporting this conclusion we found a strong correlation of survival outcome with the TEM rate of samples (Figure 2A-iii) that largely associated with LA condition rather than other parameters (Supplementary Figure S5A).

Because $\alpha 4$ integrin expression in LApos cases have been correlated with enhanced TEM capacity [12–14] and mediate survival signals from endothelium [6, 15], we investigated its possible association with TEM survival outcome. As determined by flow cytometry, the cell surface expression of $\alpha 4$ and αL integrins and their corresponding β chains were lower in CLL cells than in normal B cells although significantly increased in

LApos respect to LANeg cases (Figure 2B-i) in concert with enhanced TEM rate (Supplementary Figure S5B-C). Interestingly, there was a strong correlation of $\alpha 4$, rather than αL expression, with the survival outcome of TM cells (Figure 2B-ii) further supporting a specific role of $\alpha 4$ integrin in this outcome.

To further confirm this, we blocked $\alpha 4$ or αL interactions in separate TEM assays through preincubating the CLL cells of LApos and, for comparison, LANeg cases with recombinant forms of VCAM-1 (rhVCAM-1) or ICAM-1 (rhICAM-1) endothelial ligands, respectively. Five samples having different $\alpha 4$ or αL expressions within each LA clinical conditions were compared (Figure 2C). LApos cases showed a strong reduction in the TEM rate after blocking either of the two integrin interactions (Figure 2C-i) in contrast to LANeg samples (Figure 2C-i) confirming that both integrin chains play a critical role in TEM of LApos cases. Moreover, the viability of both, non-TM and TM cells, was strongly improved in the LApos cases under blocking either of the two integrins compared to the untreated samples while only αL blocking did in the LANeg cases (Figure 2C-ii). The bound recombinant ligands had no significant effects in the viability of CLL cells in control suspension cultures (Figure 2C-ii) indicating that their effects in TEM assays can be linked to the inhibition of the corresponding integrin interactions with endothelium. The survival outcome of TM cells was greatly improved in the LApos cases compared to that in control untreated assays (Figure 2C-iii). However, it was impaired relative to the non-TM cells compared to the control cultures (Figure 2C-iii) suggesting that integrin interactions rescued the CLL cells during diapedesis from proapoptotic signals received at initial adhesions.

In conclusion, these data showed that the integrin adhesions responsible of the enhanced TEM of CLL cells are also critically involved in the survival outcome.

Integrin dependent survival outcomes are counteracted by ephrinA4 reverse signaling

Having established that integrins enhance the survival outcome of TM CLL cells in LApos patients, we analyzed its possible modulation through ephrinA4 reverse signaling as previously reported by us [16]. As determined by flow cytometry, ephrinA4 expression was significantly higher in LANeg than LApos samples (Figure 3A-i) while no significant differences were found according to ZAP-70, IGVH or CD38 parameters (Figure 3A-i) confirming its association with the LA condition of patients previously found by us [16, 18]. Remarkably, ephrinA4 expression levels were low in most trisomy 12 (tris12) cases (4 out of 5) and, to a lower extent, del11q positive samples (3 out of 4) (Figure 3A-i) which could be in concert with the increased risk to suffer lymphadenopathy in these patients. EphrinA4 expression and TEM survival followed an inverse correlation in both LA clinical groups (Figure 3A-ii) contrasting with

Table 1: Clinical and molecular details of patients

N.	G.	Age(y)	Rai	LA	IgHV ^a	ZAP-70 ^b	CD38 ^c	del13q	del17p	del11q	+12	ephrinA4 ^d	Integrin chain ^e			
													αL	β2	α4	β1
1	F	74	low	no	M	neg	neg	-	-	-	+	15.90	11.95	32.06	25.00	21.93
2	M	69	low	no	M	neg	pos	-	-	-	-	30.90	7.37	22.91	9.53	45.00
3	F	91	int	yes	UM	neg	pos	-	-	-	-	20.20	13.32	67.84	63.80	55.24
4	M	59	int	yes	M	neg	pos	-	-	-	-	7.70	13.20	57.45	24.28	50.74
5	M	78	hi	no	M	pos	neg	+	-	-	-	17.80	17.46	30.44	26.00	15.36
6	M	73	hi	yes	M	pos	pos	-	+	-	-	10.70	7.84	23.85	89.00	55.00
7	F	69	hi	yes	M	pos	neg	-	-	-	-	6.30	7.60	14.45	52.00	45.00
8	F	69	low	no	UM	neg	neg	+	-	-	-	36.47	9.92	13.69	19.60	7.58
9	F	78	int	yes	M	neg	neg	-	-	-	-	10.25	8.73	29.23	63.56	35.00
10	F	73	int	yes	M	neg	pos	+	-	-	-	7.83	42.12	65.56	56.78	59.23
11	F	65	hi	yes	UM	pos	neg	+	+	-	-	6.44	5.89	13.56	54.00	33.62
12	M	76	int	yes	UM	pos	neg	+	-	-	-	10.99	10.54	19.81	45.00	53.71
13	F	71	int	yes	M	pos	neg	-	-	-	+	12.62	35.48	56.68	16.53	69.67
14	F	58	hi	yes	M	neg	neg	-	-	-	-	10.46	10.85	21.07	78.00	63.00
15	M	69	int	yes	UM	pos	pos	+	-	-	-	9.63	51.00	54.00	56.00	25.00
16	F	63	int	yes	M	neg	neg.	+	-	-	+	11.25	20.00	23.00	98.00	65.00
17	M	79	int	no	UM	neg	neg	-	-	-	+	56.25	32.00	25.00	12.00	27.00
18	F	62	int	yes	M	neg	n.d.	-	-	-	-	6.98	8.00	68.00	34.00	32.00
19	F	85	int	yes	M	pos	neg	-	-	-	+	4.69	6.00	66.00	65.25	45.00
20	F	77	int	yes	UM	pos	neg	+	-	-	-	26.53	24.00	52.00	65.00	56.00
21	F	88	low	no	M	pos	neg	+	+	+	-	14.35	15.00	36.00	15.00	65.00
22	F	72	low	no	UM	pos	neg	+	-	+	-	62.25	7.00	35.00	15.00	53.00
23	M	75	low	no	UM	pos	neg	+	-	-	-	70.00	18.00	15.00	18.00	21.00
24	F	83	hi	yes	UM	neg	neg	-	-	-	-	18.69	33.00	84.00	70.00	45.00
25	F	58	low	no	M	pos	pos	-	+	-	-	68.00	26.00	29.00	33.00	56.00
26	F	66	low	no	UM	pos	neg	+	-	+	-	25.25	35.00	33.00	35.00	25.00
27	M	73	low	no	M	pos	neg	+	-	-	-	36.25	12.00	38.00	39.00	21.00
28	M	73	int	yes	M	pos	neg	-	-	-	-	14.56	54.00	61.00	66.00	68.00
29	M	68	low	no	UM	pos	pos	+	-	-	-	11.25	9.00	15.00	52.00	23.00
30	M	85	int	yes	UM	pos	pos	+	-	+	-	11.25	36.00	12.00	63.00	33.00

Footnotes: ^a Sequences with a germline homology of $\geq 98\%$ were considered as UM; ^{b, c} Determined by flow cytometry (Positivity cut off over isotype stained negative control stainings): ZAP-70, $> 25\%$ stained cells; CD38, $> 35\%$ stained cells; ^{d, e} Mean Fluorescence Intensity (MFI) determined by flow cytometry.

that observed for integrins (Figure 2B-ii). Accordingly, expression of ephrinA4 and CD49d followed an opposite pattern and, in the LApos cases, the appearance of a CD49d high population correlated with a low ephrinA4 expression (Figure 3B). Together these data further supported a direct

and/or indirect role of ephrinA4 in the survival events during TEM modulating integrin adhesions.

To discriminate between these two possibilities we preincubated the CLL cells from the 30 patients with saturating amounts of recombinant extracellular domains

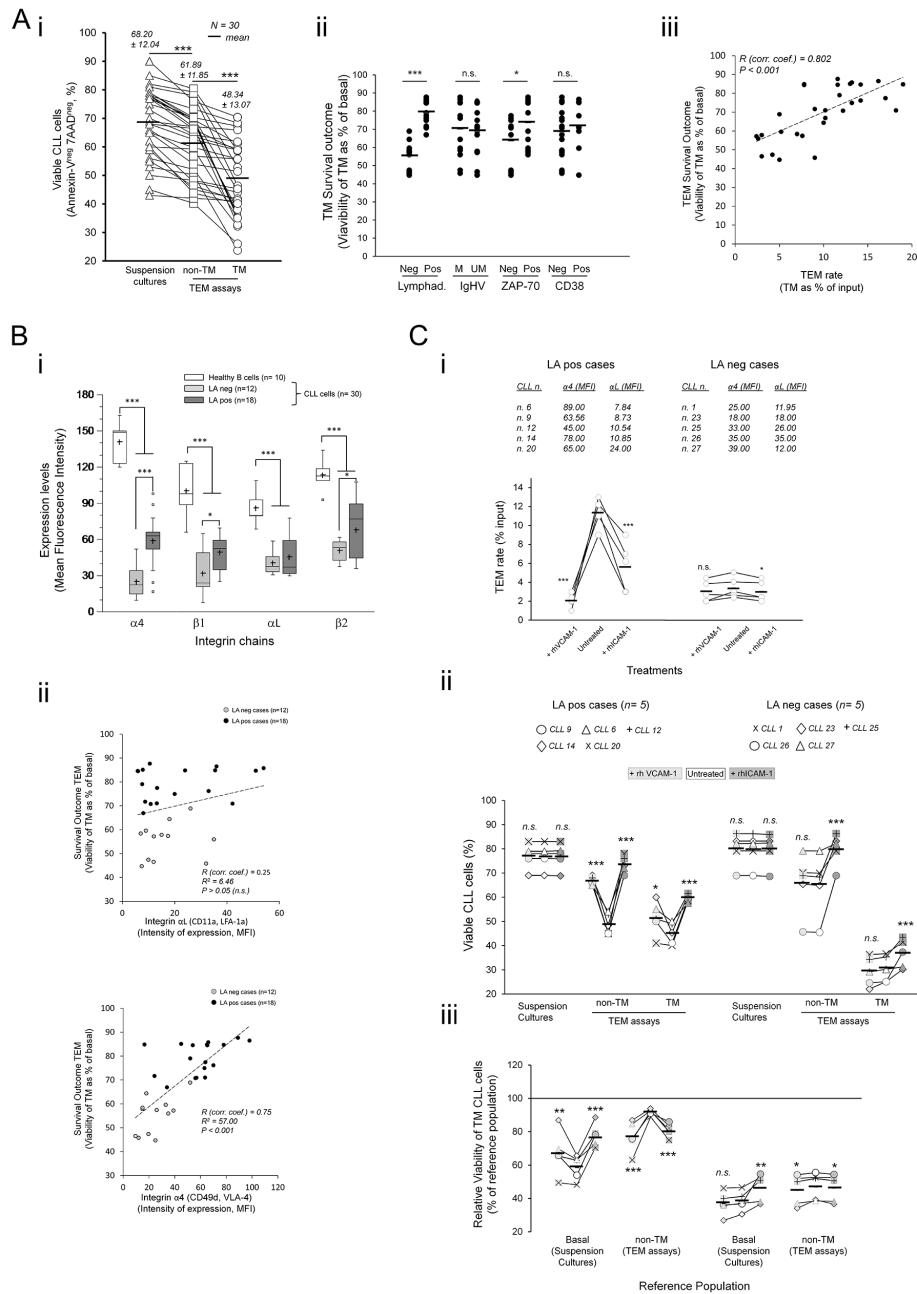


Figure 2: CLL cells of patients having lymphadenopathy (LApos) show a survival advantage during TEM mediated by αL and $\alpha 4$ integrins. **A.** TEM assays through TNF-HUVEC were done with 30 patients and viability determined by flow cytometry analysis after 12 hours. i) Absolute values of viable cells. ii-iii) Viability of TM cells relative to basal levels in control suspension cultures without HUVEC (TM survival outcome) according to the indicated disease parameters (ii). iii) Linear correlation analysis between TM survival outcome and TEM rate. Absolute number of TM CLL cells, recovered from the bottom chambers, was measured by flow cytometry and expressed as percentage of total input cells (TEM rate). R , Spearman's correlation coefficient. **B.** Cell surface expression of the indicated integrin chains was measured in normal B cells and CLL cells by flow cytometry after staining with antigen specific antibodies. i) Whisper-box plots compare integrin expression levels (mean fluorescence intensity, MFI) between CLL cells and normal B cells, and between CLL cells of patients having or not lymphadenopathy (LApos and LANeg, respectively). ii) Linear correlation analysis between survival outcome of TM cells and expression of αL (upper plot) or $\alpha 4$ (lower plot) integrins. R , Spearman's correlation coefficient. **C.** CLL cells from 10 patients, having (LApos) or not (LANeg) lymphadenopathy, were preincubated or not (untreated) with recombinant soluble forms of human VCAM-1 (+rhVCAM-1) or ICAM-1 (+rhICAM-1) and left transigrating through TNF-HUVEC monolayers (TEM assays) or cultured in suspension (suspension cultures) for 12 hours. Integrin expression levels (MFI) of the used samples are shown. i) TEM rate of samples were compared to that in control (untreated) TEM assays in LApos and LANeg cases. ii) Absolute levels of viable CLL cells in suspension cultures or in TEM assays (non-TM and TM cells) after rhVCAM-1 or rhICAM-1 preincubation. Treatments are compared to control (untreated) assays. iii) Viability of TM cells as percentage of a reference population: basal levels (suspension cultures) or non-TM cells. Paired two-tailed Student's T test significance values: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

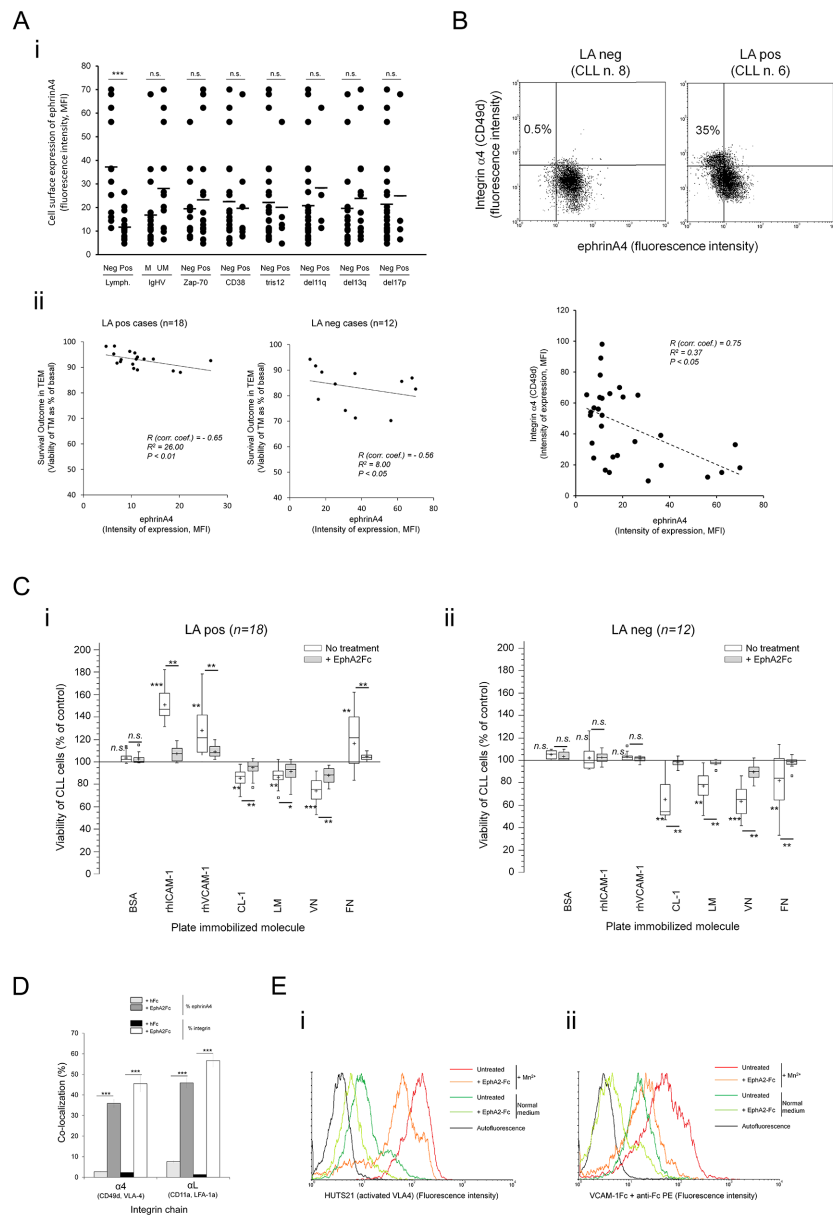


Figure 3: EphrinA4 reverse signaling suppresses integrin mediated survival signals through inhibiting activation state.

A. Expression of ephrinA4 was measured on the surface of CLL cells from 30 samples by flow cytometry analysis (MFI, mean fluorescence intensity) and (i) compared between samples according to disease parameters and cytogenetic characteristics or (ii) correlated with survival outcome of TM cells in LApos (left) and LANeg (right) cases. R : Spearman's correlation coefficient. **B.** Expression of ephrinA4 and CD49d ($\alpha 4$) on the surface of CLL cells was determined by flow cytometry (upper panels). Correlation analysis between ephrinA4 and $\alpha 4$ expression (mean fluorescence intensity, MFI) of samples. **C.** CLL cells from 30 patients (i, LApos; ii, LANeg) were preincubated (+EphA2Fc) or not (No treatment) with saturating amounts of soluble recombinant human EphA2 extracellular domains (EphA2Fc) and cultured for 12 hours in suspension in untreated plates (control) or plates containing the indicated molecules pre-immobilized to wells. BSA was used as a non-specific immobilized protein. Viability of CLL cells onto each protein is shown as percentage of basal levels in control suspension cultures without immobilized proteins. Statistical significances are shown for comparison between untreated cultures to control cultures or for EphA2Fc treatments to untreated conditions. Whisper-box plots: mean (+) and median (-) values. **D.** CLL cells from LApos samples (n=3) were preincubated in suspension with poly-His tagged EphA2Fc or hFc as control. Cell suspensions were then incubated with biotin anti-His followed by AlexaFluor488 streptavidin and adhered to slides for 15 min (37°C). After paraformaldehyde fixation (4% PF in PBS) slides were incubated with AlexaFluor647 conjugated monoclonal Ab for the indicated integrin chains and analyzed through confocal microscopy (Supplementary Figure S6). At least 3 fields per experiment were evaluated for colocalization analysis (Colocalization Tool, Image J). ≥ 200 cells per sample were analyzed. **E.** CLL cell suspensions (10^5 /assay) were incubated for 30 min with EphA2Fc or Fc only in RPMI/2% FCS (Normal medium) or containing 1mM MnCl₂ (Mn²⁺). Next, CLL cells were incubated with a PE coupled HUTS21 mAb in cold PBS (i) or PE coupled anti-Fc preclustered VCAM-1-Fc in normal medium (ii) followed by flow cytometry analysis. A representative LApos CLL sample is shown (n>3 samples). Paired two-tailed Student's T test significance values: * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

of human EphA2 (EphA2Fc) which results in ephrinA4 reverse signaling modulating integrin affinity [16]. The viability of CLL cells was analyzed, as in the preceding TEM assays, at 12 hours of culture in suspension alone or onto plate immobilized rhICAM-1 or rhVCAM-1 or other integrin ligands of the extracellular matrix (ECM) including fibronectin (FN), collagen type-1 (CL-1), laminin (LM) or vitronectin (VN). EphA2Fc did not significantly affect the viability of CLL cells cultured onto immobilized BSA relative to control assays (Figure 3C-i-ii) discarding a direct role of ephrinA4 reverse signaling in CLL cell viability. However, it largely counteracted most of the effects onto integrin ligands (Figure 3C-i-ii), including the prosurvival ones observed in LApos cases onto either of the two endothelial ligands. ECM molecules mainly induced a decrease in the viability of CLL cells of all samples (Figure 3C-i, ii) excluding FN which had prosurvival effects in LApos cases (Figure 3C-i-ii) confirming the critical role of $\alpha 4$ in this clinical group. These data agreed with prosurvival signals mediated by αL and, mainly, $\alpha 4$ integrins in LApos cases during diapedesis, as concluded from blocking them in the preceding TEM assays, and further highlighted a role of ephrinA4 in regulating them. In line with our previous findings [16], EphA2Fc induced a significant increase in the number of non-adhered CLL cells recovered from the adhesion assays (not shown) which occurred in the absence of a significant decrease in integrin expression (not shown). Confocal fluorescence microscopy demonstrated a lack of intracellular staining for integrins but rather showed their sequestration on the surface of the EphA2Fc treated CLL cells (Supplementary Figure S6) (Figure 3D). These results suggested that physical interactions on the cell surface rather internalization could modulate the integrin binding capacities. Indeed, flow cytometry analysis of HUTS-21 Abs staining, which recognizes high affinity conformations of VLA4 integrins, demonstrated that EphA2Fc treatment strongly inactivated VLA4 in the CLL cells even when artificially activated through addition of Mn^{2+} to medium (Figure 3E-i). Accordingly, binding of soluble VCAM-1-Fc by CLL cells was dramatically reduced in the presence of EphA2Fc (Figure 3E-ii). In conclusion, these data supported that ephrinA4 signaling inhibits integrin affinities for their ligands and, hence, apoptotic/survival signals.

Absence of ephrinA4 reverse signaling dramatically improves the survival of TM CLL cells from LApos cases

To demonstrate a role of ephrinA4 reverse signaling in TEM assays, CLL cells were preincubated with saturating amounts of the EphA2Fc recombinant molecules. Under these conditions, bidirectional signaling between CLL and endothelial cells through the receptor-ligand pair is inhibited while ephrinA4 reverse signaling into the CLL cells still can take place [16]. In these experiments, six samples of each LA condition were chosen that differed in ephrinA4

expression levels within each group (Figure 4C; Table 1). In line with our previous findings [16], rhEphA2 did not significantly change integrin expression of CLL cells (Figure 4A) but led to a marked drop in the TEM rate of all samples (Figure 4B) in concert with the inhibition of integrin adhesions. Indeed, as in the integrin blocking TEM assays, it significantly increased both the viability of non-TM and TM cells in all samples (Figure 4C-i) and, more importantly, the survival outcome of TM cells relative to basal levels in suspension cultures but not relative to the non-TM ones of LApos cases (Figure 4C-ii). Altogether, these data supported that ephrinA4 reverse signaling during diapedesis likely inhibits integrin prosurvival signals into the CLL cells of LApos cases.

Next, we blocked ephrinA4 signaling in TEM assays through siRNA mediated silencing of EphA2 in the endothelial cells. However, absence of this receptor in the endothelial cells rendered them unable to form a tightly packed monolayer (Figure 4D) thus limiting further TEM assays. Next, we challenged ephrinA4 silencing in the CLL cells from the 6 LApos and LANeg cases used in the preceding EphA2Fc TEM. Forty-eight hours after nucleofection, we found a strong reduction of ephrinA4 expression on the cell surface (Figure 5A) without significantly compromising their viability as compared to untreated or control nucleofected samples. EphrinA4 knock-down had not significant effects on the expression of integrins but markedly reduced the TEM rate of samples as compared to siRNA neg or untreated CLL cells (Figure 5B-i) and the number of CLL cells retained onto the HUVEC monolayer increased as determined by fluorescent microscopy analysis of transwell filters (Figure 5Bii-iii). Collectively, these findings confirmed that ephrinA4 decreases adhesion [16, 18]. In terms of viability, ephrinA4 knock-down led to a marked decrease in the viability of non-TM cells of both LA clinical groups compared to siRNA neg nucleofected or untreated cells (Figure 5C-i) which was compatible with the increased adhesion and, hence, occurrence of proapoptotic signals at initial steps of TEM. By contrast, the viability of TM cells was dramatically improved in the LApos but not the LANeg cases compared to that in untreated samples and, more importantly, to their corresponding non-TM cells (Figure 5C-i) a finding also confirmed in terms of survival outcome (Figure 5C-ii). Together with the preceding integrin blocking or EphA2Fc TEM assays, these results supported that switching-off ephrinA4 reverse signaling during diapedesis represented a survival advantage for the CLL cells of LApos cases.

Soluble ephrinA4 binding to endothelium strongly potentiates survival advantage of CLL LApos cases

As previously demonstrated by us [18], herein we confirmed higher levels of soluble ephrinA4 in the

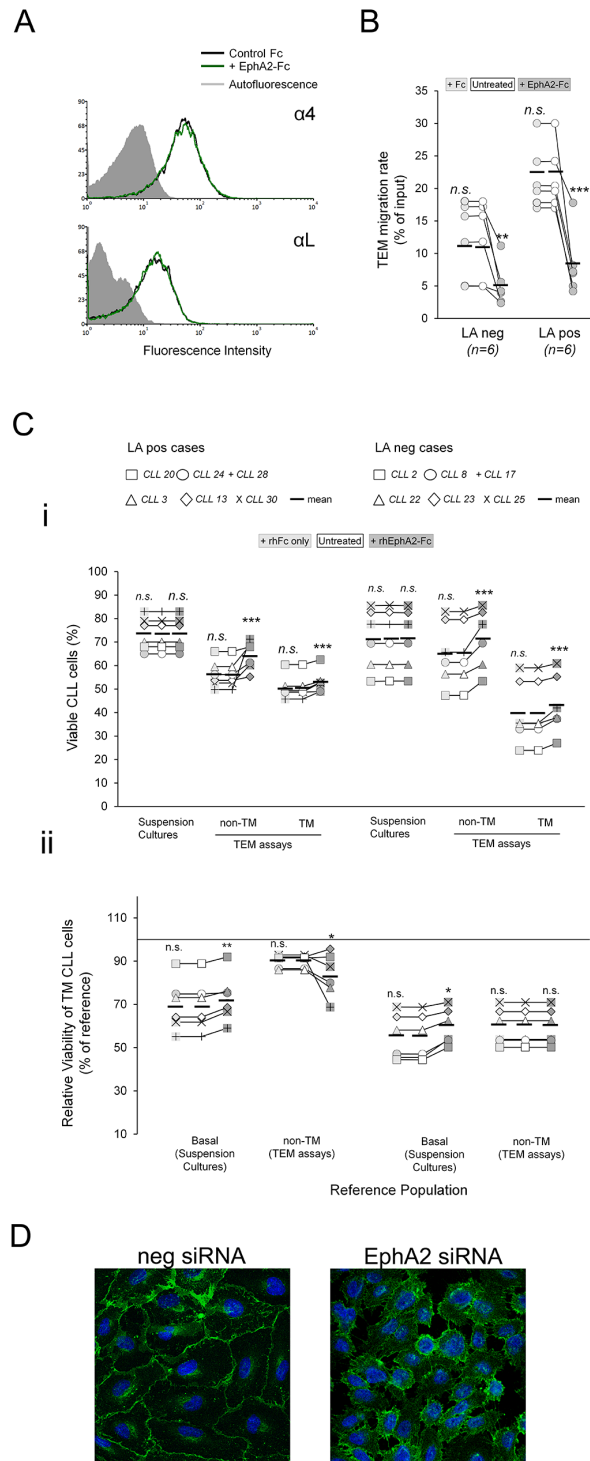


Figure 4: EphrinA4 reverse signaling inhibits survival signaling during diapendesis. CLL cells from the indicated patients having (LApos) or not (LANeg) lymphadenopathy were preincubated with EphA2Fc or hFc or left untreated and allowed transmigrating through TNF-HUVEC monolayers (TEM assays) or cultured in suspension (suspension cultures) for 12 hours. **A.** Representative flow cytometry histograms of $\alpha 4$ or αL integrin expression in CLL cells before and after incubation with EphA2Fc. **B.** TEM rate of samples, as determined by flow cytometry, were compared between hFc or EphA2Fc treatments to untreated cultures in LApos and LANeg cases. **C.** Effects of EphA2Fc in viability of CLL cells. i) Absolute levels of viable CLL cells in suspension cultures or in TEM assays (non-TM and TM cells) after rhEphA2Fc or hFc treatment compared to control, untreated CLL cells. ii) Relative viability of TM cells as percentage of basal levels in suspension cultures or of the corresponding non-TM cells. **D.** HUVEC were nucleofected with EphA2 specific or negative control siRNA. VE-Cadherin (green) stained HUVEC cultures demonstrated that EphA2 silencing inhibited the formation of a proper confluent monolayer. Paired two-tailed Student's T test significance values: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

serum from patients having lymphadenopathy than in those lacking it (Figure 6A) whereas a clear association with other parameters was not found (Figure 6A). Mechanistically, soluble ephrinA4 enhances extravasation of CLL cells after binding to EphA2 receptor on the surface of endothelial cells [16] through inhibiting cell surface expressed ephrinA4 mediated reverse signaling, thus allowing integrin mediated adhesions. Furthermore, EphA2 mediated sequestration and internalization of VCAM-1 and ICAM-1 endothelial ligands could be

involved in this process [18]. To analyze whether this mechanism could contribute to improve the survival of CLL cells in TEM assays, we preincubated the TNF-HUVEC monolayer with saturating amounts of soluble recombinant human ephrinA4 (ephrinA4Fc) as previously described [18]. This resulted in an increased TEM rate of LApos but not the LANeg cases (Figure 6B-i) confirming our previous findings [16]. Moreover, the viability of non-TM and TM cells of LApos samples was dramatically improved (Figure 6B-ii) along with an enhancement in

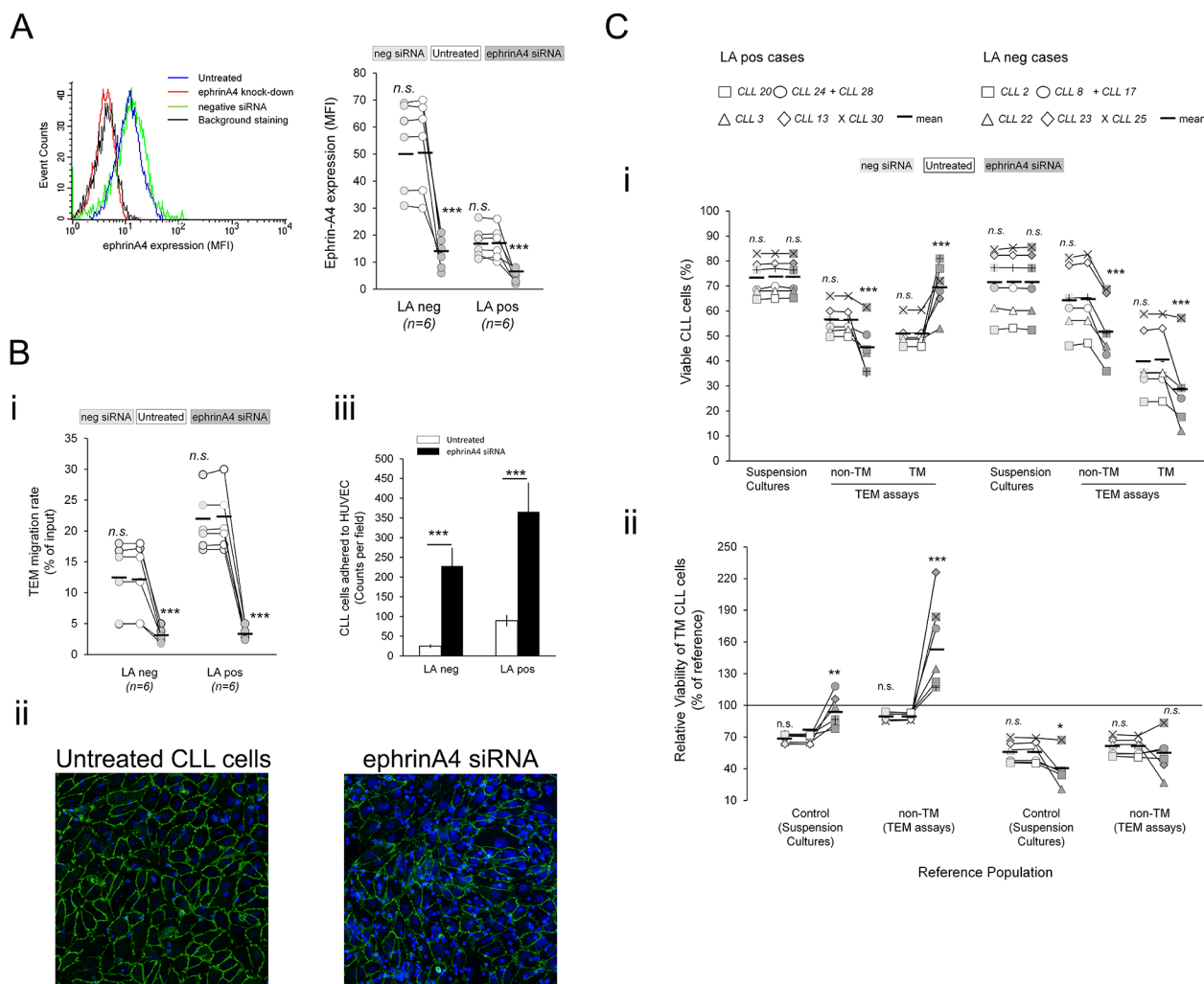


Figure 5: Absence of ephrinA4 reverse signaling during TEM increases survival outcome of TM cells in LApos samples. CLL cells of the 12 patients used in EphA2Fc assays having (LApos) or not (LANeg) lymphadenopathy (Figure 4), were nucleofected with ephrinA4 specific or negative control siRNA duplexes or left untreated. **A.** EphrinA4 silencing was determined by flow cytometry 48 hours after nucleofection. **B.** Untreated or nucleofected cells (siRNA neg or ephrinA4) were left transmigrating for 12 hours through TNF-HUVEC. **i**) TEM rate of samples measured by flow cytometry. **ii**) Transwell filters from TEM assays were stained with anti CD31 mAb (green, HUVEC junctions) and Hoechst (blue, nuclei) and examined by confocal microscopy (40x oil immersion; Leica TCS-SP2). CD31 junctions were not altered in the HUVEC monolayer of ephrinA4 knock-down samples. **iii**) Absolute counts of CLL cells adhered to TNF-HUVEC were measured by image analysis (ImageJ; > 200 nuclei counted per filter). **C.** Analysis of CLL cells viability in TEM assays after ephrinA4 knock-down. **i**) Absolute levels of viable CLL cells in suspension cultures or in TEM assays (non-TM and TM cells) were compared between ephrinA4-specific or neg control siRNA nucleofected to control untreated CLL cells. **ii**) Relative viability of TM cells as percentage of basal levels in suspension cultures or of non-TM cells. Paired two-tailed Student's T test significance values: * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

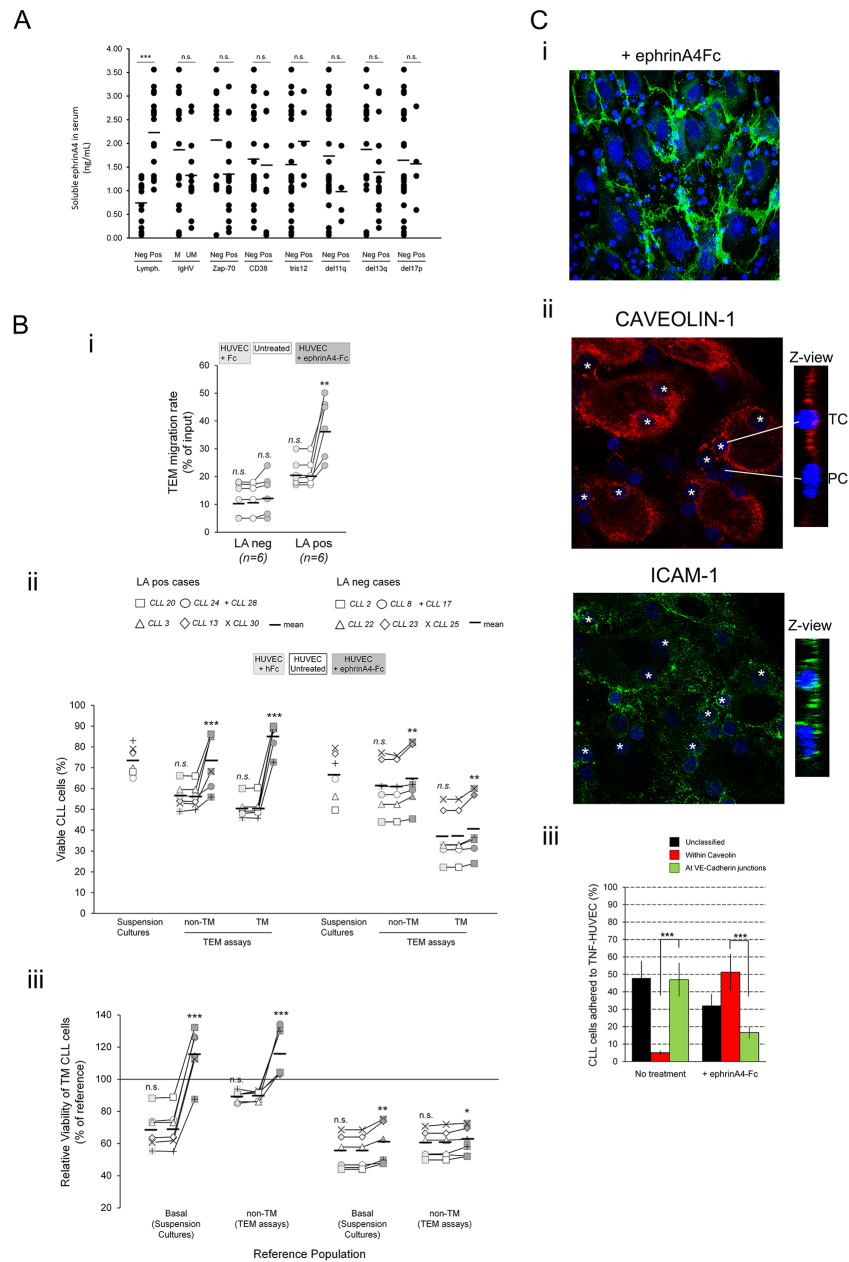


Figure 6: Treatment of TNF-HUVEC with soluble recombinant human ephrinA4 strongly potentiates survival of CLL cells and a possible transcellular TEM pathway. **A.** Soluble ephrinA4 levels in the serum of CLL patients were determined by indirect ELISA (ng/mL) and possible associations with clinical parameters examined. **B.** CLL cells from 12 patients having (LApos) or not (LANeg) lymphadenopathy, used in the EphA2Fc or siRNA assays (Figures 3 and 4), were left transmigrating 12 hours through TNF- α preactivated HUVEC monolayers preincubated (30 min) with saturating amounts of recombinant human ephrinA4 (HUVEC+ephrinA4Fc), purified human Fc (HUVEC + hFc) or untreated before addition of CLL cells. **i**) Absolute number of transmigrated cells (TM) was counted by flow cytometry and expressed as percentage of total input cells (TEM rate). **ii**) Absolute levels of viable CLL cells in suspension cultures or in TEM assays (non-TM and TM cells) in the ephrinA4Fc or hFc treated TEM assays were compared to untreated conditions. **iii**) Relative viability of TM cells normalized to basal levels (suspension cultures) or to the corresponding non-TM cells in the ephrinA4Fc or hFc treatments compared to untreated TEM assays. **C.** **i**) Transwell filters were stained with anti VE-Cadherin (green, HUVEC junctions) and Hoechst (blue, nuclei) and examined by confocal microscopy. Adhered CLL cells were located at VE-Cadherin interendothelial junctions or separated from them. **ii-iii**) Caveolin-1 and ICAM-1 immunofluorescence staining of TEM assays done in chamber slides 2 hours after coculture with LApos CLL cells. **ii**) CLL cells inside of HUVEC were surrounded by caveolin-1 endothelial caveola (asterisks, > 1 μ m from VE-Cadherin junction) and ICAM-1. Insets show Z- views of caveolin and ICAM-1 staining for a transcellular (TC) and a paracellular (PC) TEM CLL nuclei. **iii**) Measurement of CLL cells located within caveolin-1, at VE-Cadherin junctions or unclassified in ephrinA4Fc treated compared to untreated TNF-HUVEC after 2 hours coculture (at least 200 nuclei were counted per condition). Paired two-tailed Student's T test significance values: * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

the survival outcome of TM cells compared to untreated control TEM assays (Figure 6B-iii), confirming a pro-survival role of soluble ephrinA4 during TEM of LApos CLL cells.

Next, immunofluorescence microscopy analysis of the transwell filters showed that VE-Cadherin⁺ junctions between HUVECs were unaltered in the ephrinA4Fc treatments (Figure 6C-i) discarding that CLL cells traversed through holes as a possible explanation to the increased survival. Moreover, CLL cells located at VE-Cadherin junctions (Figure 6C-i), suggesting a paracellular (PC) TEM route, or at > 1µm from them possibly following a transcellular (TC) TEM routes, as previously demonstrated [25]. To confirm a TC TEM pathway, we examined by confocal microscopy a possible association between intracellular caveolin-1 staining, which has been related with this TEM route in lymphocytes [26, 27], and the CLL cells actually inside of endothelial cells located > 1µm of interendothelial junctions. Many CLL cells inside of HUVEC were distinctly located within caveolin-1⁺ endothelial vacuoles and surrounded by ICAM-1 staining (Figure 6C-ii) suggesting a TC route of TEM. Image based counting of CLL cells at VE-Cadherin junctions or > 1µm within caveolin-1 in TEM assays revealed an increased frequency of the later under ephrinA4Fc treatments (Figure 6C-iii) in concert with an enhanced TC pathway through the endothelial cell body. These data confirmed that soluble ephrinA4Fc does not induce a TEM of CLL cells through disassembling interendothelial junctions but rather through endothelial cells themselves likely through a TC route of TEM.

EphrinA4 can be detected in the HEV of CLL lymphadenopathies and enhances viability of CLL cells infiltrating the lymph node of adoptively transferred mice

A possible correlation between apoptosis and *in vivo* extravasation was indirectly investigated by immunofluorescence microscopy analysis of CLL lymphadenopathies. Apoptotic cells were detected in tissue sections through TUNEL staining and their location relative to HEV through PNAd staining. At low magnification, we confirmed an accumulation of apoptotic cells within 200 µm areas under the capsule in the three LA studied (Figure 7A-i). Because normal lymph node architecture is profoundly effaced in CLL lymphadenopathies we referred to these areas concentrating apoptotic cells near the capsule as outer rather than cortical regions, and as inner regions to the deeper ones inside of the LA parenchyma. Interestingly, apoptotic cells were closer to HEV in outer than inner regions (Figure 7A-i) indirectly suggesting an association with extravasation. After extravasation normal lymphocytes are retained for hours within an area of < 20 µm around the HEV of cortical lymph node regions

before infiltrating the LN parenchyma [28], a feature that correlated with an accumulation of apoptotic cells around them. Indeed, we found that the number of apoptotic nuclei within ≤ 20 µm around the HEV was markedly higher in the outer than the inner LA areas (Figure 7A-ii) suggesting that they could represent recently extravasated CLL cells. Its possible association with ephrinA4 staining was further examined. EphrinA4 staining was found not only in the infiltrated CLL cells but also within the endothelial cells of HEV bound to EphA2 (Figure 7B-i). Quantification of ephrinA4 staining bound to EphA2 in HEV in outer and inner regions (Figure 7B-ii) revealed a significant higher frequency in the former (Figure 7B-iii) thus following a completely opposed distribution to that observed for apoptotic cells. Altogether these data supported a possible *in vivo* pro-survival role of soluble ephrinA4 related to the extravasation of CLL cells into lymphadenopathies.

To assess this in a more physiological condition, CFSE stained human CLL cells of LApos and LANeg patients were adoptively transferred to Balb/c mice receiving different amounts of a soluble ephrinA4 purified from the sera of CLL patients. The percentage and viability of CLL cells was analyzed 24 hours later by flow cytometry (Supplementary Figure S1) in cell suspensions of the popliteal lymph node where the number of endogenous mouse lymphocytes is greatly lower than in other lymph nodes. EphrinA4 led to an increase in the proportion (Figure 7C, Bars) and viability (Figure 7C, lines) of the human CLL cells recovered from the lymph nodes of mice inoculated with LApos samples in a concentration-dependent manner.

DISCUSSION

Herein we provide evidence, for the first time, that CLL cells establish physical contacts with endothelia that can result in decreased survival during extravasation. In patients having lymphadenopathy, CLL cells are able of collecting pro-survival signals through αLβ2 and α4β1 integrins linked to ICAM-1 and VCAM-1 mediated diapedesis. In these processes, the soluble form of ephrinA4, that accumulates in the sera of patients having lymphadenopathy [18], plays an instrumental role. In these patients, ephrinA4 binding to EphA2 receptor on the luminal side of endothelial cells facilitates the adherence and migration of CLL cells through the endothelial vessels of lymphoid tissues, coupling enhanced TEM to pro-survival signals. Thus, the present findings expand our previous studies on the role of ephrinA4 isoforms in CLL cell adhesion and TEM [16, 18] by further connecting them to CLL cell survival and lymphadenopathy.

Our present results shed new light on the role of endothelial cells in CLL. In accordance with previous studies [3, 4, 6, 29–31] we demonstrate that endothelial cells can provide pro-survival signals to

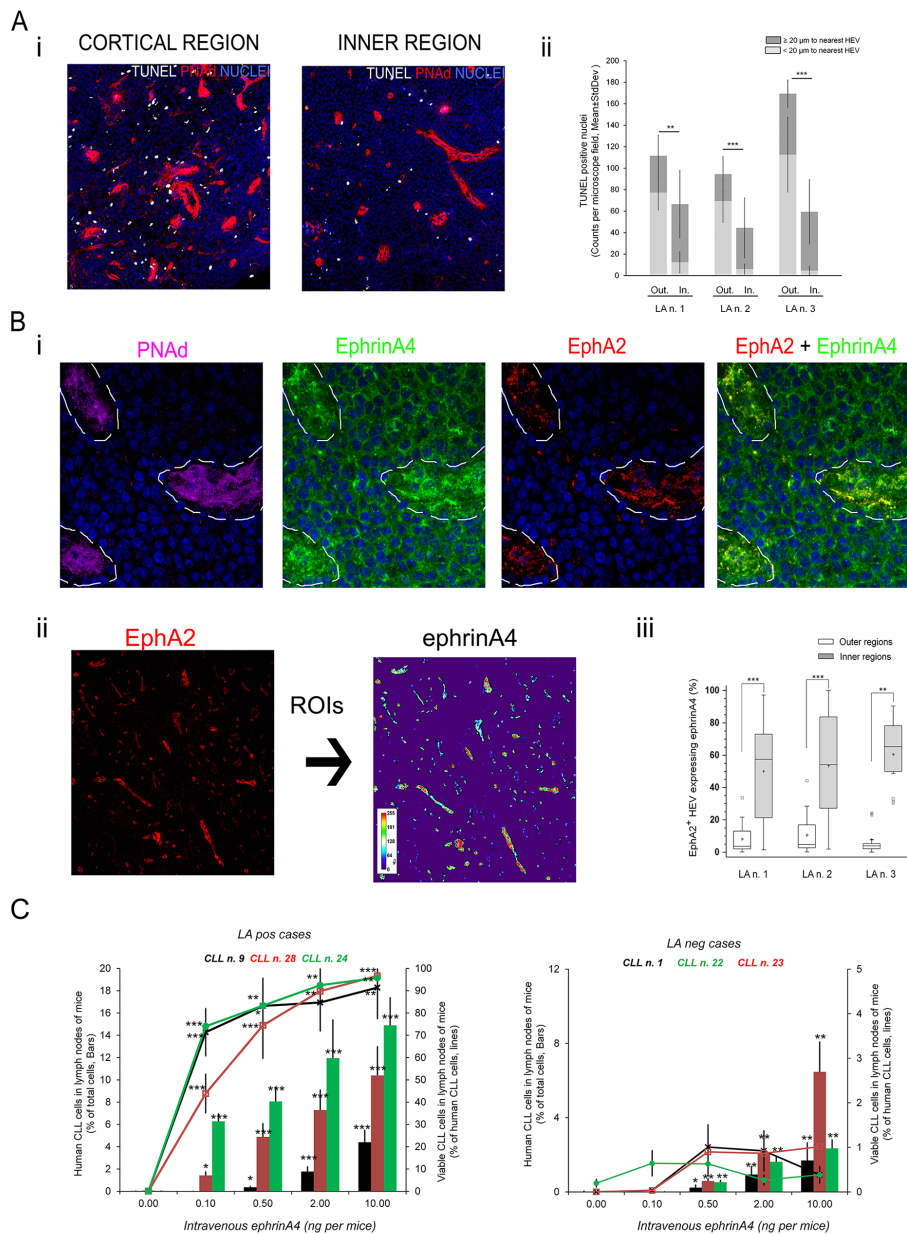


Figure 7: Soluble human ephrinA4 in HEV of lymphadenopathies inversely correlates with apoptotic cells near HEV dramatically enhancing the number and viability of human CLL cells recovered from lymph node of adoptively transferred mice. A-B. Seven μm thick sections from frozen CLL lymphadenopathies (LA n.1, 2 and 3 corresponding to CLL patients n. 3, 18 and 28, respectively) were fixed in acetone and sequentially incubated with A) TUNEL (white) and antibodies against PNAAd (red) or B) antibodies against PNAAd (magenta), ephrinA4 (green), EphA2 (red). In all cases nuclei were counterstained with Hoechst (blue). Fluorescent images were taken in a laser confocal microscope (TCS SP-2 AOBs, Leica). A) Representative low magnification images (20x) of areas near the capsule (“Cortical” region, left panel) or deeper (>200μm far from capsule, “Inner” regions; right panel). ii) Frequency of apoptotic nuclei around (≤ 20 μm) or separated from HEV in cortical and inner LA regions (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001). B) i) HEV (PNAAd+, magenta; dotted line) showed strong ephrinA4 staining co-localizing with EphA2. (63x). ii) Regions of interest (ROI) were traced around HEV according to EphA2 staining (left). Intensity of ephrinA4 staining within ROIs was measured (pseudocolor scale inset). iii) HEVs containing ≥ 10% pixels above 200 gray-scales were considered as positive. Whisper-box plots of > 20 measured fields from each LA section. Unpaired two-tailed Student’s t-test significance values were *p<0.01; **p<0.005; ***p<0.001. C. Human CLL cells were stained with CFSE fluorescent tracer and adoptively transferred into germ-free young Balb/c mice (2×10⁷ per mice) by intravenous injection through the tail vein along with increasing concentrations of human soluble ephrinA4 purified from the sera of patients. Mice were sacrificed 24 hours later and cell suspensions from popliteal lymph nodes stained with an anti-mouse CD45 antibody, AnnexinV-PE and 7AAD for flow cytometry analysis. Human CLL cells were gated according to CFSE positivity and negativity for anti-mouse CD45 (Suppl. Figure S1). Data (mean±SD) were compared to mice receiving human CLL cells in PBS without ephrinA4. Five animals were used per sample and experimental condition. Paired two-tailed Student’s T test significance values were *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

the leukemia cells within infiltrated tissues which are largely mediated by the release of pro-survival soluble factors. This is dependent on physical contacts between both cell types likely favored by prolonged coexistence within the infiltrated tissues. In supporting this hypothesis we demonstrated a lack of pro-survival effects in prolonged cocultures when using PF fixed rather than alive HUVEC. Besides, conditioned medium from long term cocultures protected the CLL cells from spontaneous and TNF-HUVEC mediated apoptosis in overnight (12 hours) cultures. By contrast, the timeframe of extravasation process is not presumably long enough [27] to promote the release of soluble factors by endothelial cells while proapoptotic signals through physical contacts could predominate. This is supported by the increase of apoptotic CLL cells in the non-TM cells and can likely take place as early as 2 hours after contact as further demonstrated in cocultures. It would be interesting to confirm our results under flow conditions in a model recently used by other authors [13, 32] or through adapting flow conditions to transwells [33]. During diapedesis the CLL cells can be rescued from proapoptotic signals received at initiation of TEM in LApos cases. However, we cannot exclude that the migrated CLL cells could receive other survival signals once inside the lymph node parenchyma although our studies in LN sections show numerous apoptotic cells near to HEV. These data suggest that many recently migrated cells die without infiltrating the tissue and especially when migrating through the HEV lacking ephrinA4 that predominate in outer LA regions.

Our results also confirm a critical role of integrins in the pathobiology of CLL [13, 34–36] further emphasizing that they represent a link between extravasation and survival of leukemia cells. Increased levels of CD49d ($\alpha 4$) expression can be associated with inferior prognosis in IgHV-UM and CD38 expressing cases [37] and the occurrence of trisomy 12 likely associating with the appearance of lymphadenopathies [12–14, 22]. Its expression in CLL cells of LApos patients has been related with enhanced $\alpha L\beta 2$ adhesion to ICAM-1 during transendothelial migration [34]. Indeed, CLL cells from patients lacking lymphadenopathy show a defective $\alpha L\beta 2$ dependent motility and TEM which is in part corrected through expression of $\alpha 4\beta 1$ in those suffering this organomegaly [34, 38]. This likely explains the lack of LANeg samples to receive pro-survival signal in TEM or when cultured onto ICAM-1 or VCAM-1 and further emphasizes the survival advantage of LApos cells. In agreement with previous studies highlighting a critical role of $\alpha 4$ in the endothelial mediated survival of CLL cells [6, 15, 38, 39]] we further demonstrate that this is especially relevant in lymphadenopathy cases. By contrast, the finding of proapoptotic signaling mediated by these

and/or other integrins in the CLL cells when cultured onto ECM ligands or that highlighted in TEM assays were completely unexpected. Integrins dual effects on cell survival, interchanging apoptosis or survival outcomes, have been found in other cell types including hematopoietic tumor cells [40–43]. This can be related with potentiated and sustained adhesion [40] or through unligated integrins [41] or their activation state prior to ligation recruiting caspases [41] and/or ERK rather than Akt kinase [42]. Together these mechanisms and/or other unknown ones may contribute to the presently observed apoptotic outcome when adhering to inflamed endothelium through ligands different from ICAM-1 or VCAM-1.

In keeping with such an integrin dependent survival of CLL cells, cell surface expressed ephrinA4 arises as a critical mediator counteracting apoptosis at initial adhesion steps and nonetheless the pro-survival ones in LApos CLL cells during diapedesis. Repulsive signals mediated by the surface expressed isoform, as previously shown by us [16], along with blood flow could likely contribute to detach the CLL cells from vascular vessels preventing adhesion related apoptotic signals. In LApos patients, by contrast, down regulation of membrane expressed ephrinA4 is needed to allow the firm adhesion to endothelium through $\alpha 4$ and αL integrins [16, 18]. Moreover, we show that ephrinA4 is able of inhibiting high affinity conformational states of integrins through cell surface dependent physical sequestration rather than cell internalization. In supporting this mechanism, we also show enhanced adhesion to endothelium of ephrinA4 silenced CLL cells. The knock-down assays further demonstrate that absence of reverse signaling, but not of ephrinA4 itself, is necessary for LApos samples to go on with diapedesis but not for recruiting survival signals via integrins. The inverse association between ephrinA4 and CD49d molecules further highlights the possible existence of common mechanisms regulating their expression on the CLL cells to assure extravasation. Remarkably, in spite of the low number of tris12 and del11q cases included in the present study, most of them showed low ephrinA4 levels on the surface of CLL cells, a finding that could be linked to the increased tendency to develop lymphadenopathies in these patients.

Accordingly, it is on this basis that binding of the soluble ephrinA4 to endothelial EphA2 arises as a critical mechanism to promote TEM [21–23] coupled to survival in LApos cases. The finding of apoptotic CLL cells near HEV lacking ephrinA4 within the lymphadenopathies indirectly supported also the possible occurrence of this process in vivo. This was further confirmed in chimeric mice assays that, although not physiological at all, represent a good experimental protocol to study in vivo lymph node or bone marrow seeding capacity of human CLL cells [12, 44]. Besides we show that soluble ephrinA4

could promote a transcellular TEM route of CLL cells, as concluded from the VE-cadherin and caveolin-1 stainings of TEM assays, rather than through inducing holes in the HUVEC monolayer as observed in other endothelial studies of permeability using ephrinA1 rather than ephrinA4 [20]. Caveolin-1 mediated TC TEM is coupled to ICAM-1 and VCAM-1 transcytosis [26] similarly to what we have observed in the case of ephrinA4 mediated internalization of EphA2 [16]. Moreover, EphA2 can physically interact with caveolin-1 as indeed demonstrated at a biochemical level [45]. Together these

data may shed new light on the long lasting question about the significance of a TC versus a PC route of TEM [26, 27, 46].

Within this context, ephrinA4 could play an instrumental role in ensuring survival of the CLL cells linked to extravasation and lymphadenopathy, as summarized in Figure 8. In conclusion, our results provide new data on the survival mechanisms developed by CLL cells in vivo, demonstrating that extravasation could represent a disadvantageous event to be exploited for preventing nodal dissemination.

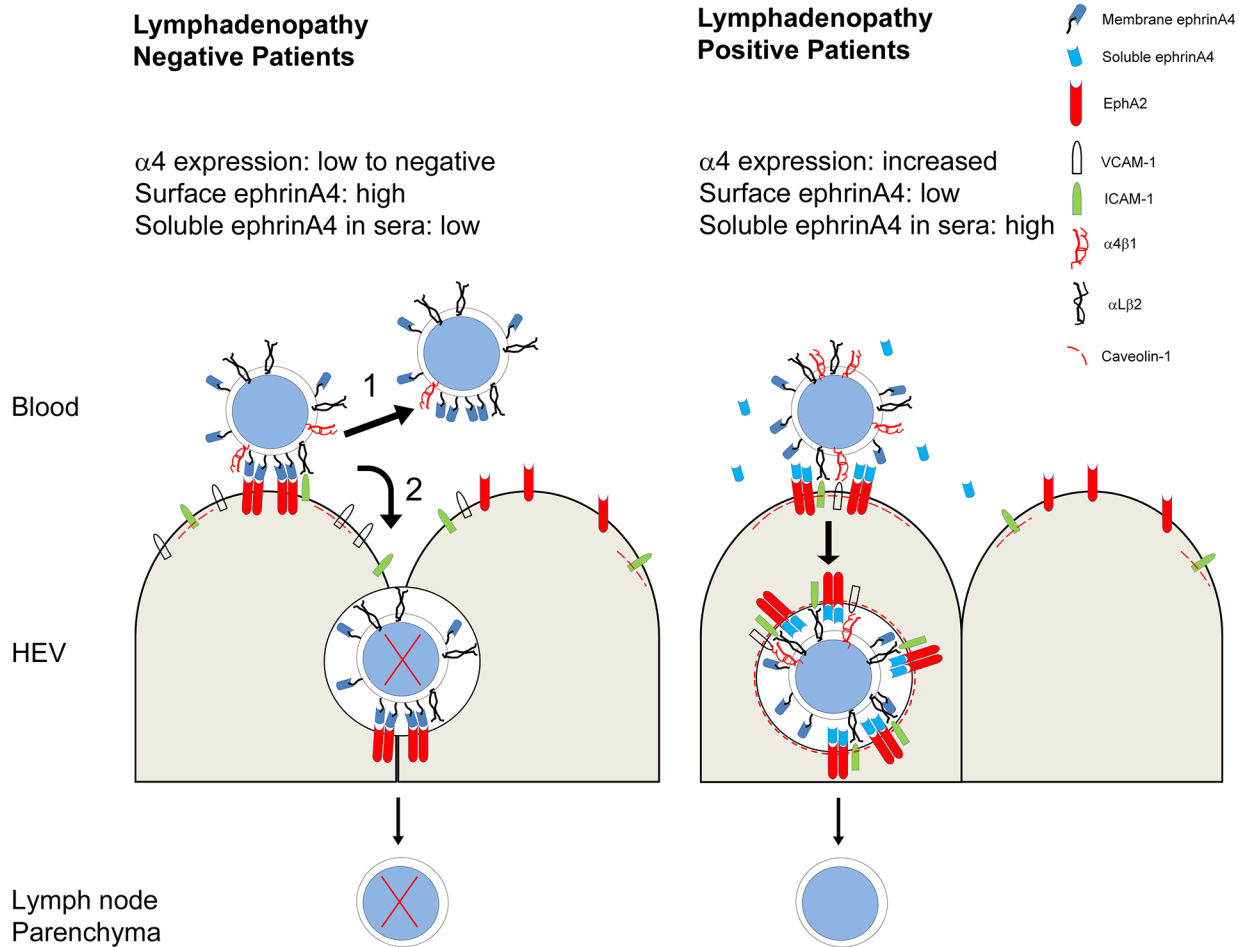


Figure 8: Summary of extravasation decisions and survival outcome of CLL cells according to lymphadenopathy condition determined by integrin and ephrinA4 mechanisms. In patients without lymphadenopathy (LANeg, left), CLL cells have low levels of $\alpha 4$ integrin expression impairing their extravasation but not adhesion to endothelium likely through $\alpha L\beta 2$. In these conditions, a low frequency of CLL cells extravasate between adjacent endothelial cells (paracellular TEM route) without receiving prosurvival signals and finally die (2). Most CLL cells, however, will detach from endothelium as a result of their high ephrinA4 expression on the cell surface allowing them to continue flowing within blood (1). The levels of soluble ephrinA4 in the sera of LANeg patients are not high enough to counteract the binding of the cell surface expressed one to endothelial EphA2 and detachment. In patients with lymphadenopathy (right) (LApos) expression of $\alpha 4$ integrin is high enough to allow extravasation. In these patients, CLL cell adhesion to endothelium is facilitated by low expression of ephrinA4 on their surface and the high levels of soluble isoform in sera which binds to endothelial EphA2. As a result, adhesion to endothelium will take place facilitating apoptotic signals which, nonetheless, are counteracted in the CLL cells that successfully bind to ICAM-1 and VCAM-1 induced upon EphA2 aggregation. A mechanism coupling EphA2 to caveolin-1 could promote a transcellular TEM route.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Investigation has been conducted in accordance with the ethical standards and according to the Declaration of Helsinki and national and international guidelines and has been approved by the authors' institutional review board.

Patients

Patients gave written informed consent before inclusion in this study. Research has been approved by the Ethics and Research Committees of Universidad Complutense de Madrid and H. Morales Meseguer of Murcia according to the principles embodied in the Declaration of Helsinki. The sample size was calculated prospectively for each one of the disease parameters to be studied (Power =0.8; $\alpha < 0.05$; SPSS Sample Power 3, IBM). Under these criteria a total of 30 subjects were included (Table 1). FISH and IgHV gene mutational status analysis were performed according to previously published methods (Supplementary Material and Methods).

Blood samples were centrifuged onto density-gradient (Histopaque 1.077, Sigma-Aldrich) incubated with lineage specific antibodies (Abs) in PBS (mouse anti-CD3, -CD2, -CD56, -CD14 and -CD13 antigens; BD Biosciences, Europe, Spain) followed by MACS-conjugated anti-mouse secondary Abs (Miltenyi Biotech, Spain) before depletion in an AutoMACS separator (Miltenyi Biotech, Spain). CLL or B cells purities were $\geq 98\%$.

Fresh small fragments of lymphadenopathies were available from three patients (CLL patients n. 3, 18 and 28; Table 1) that were embedded in cryoprotective medium (TissueTeck, Leica) and snap-frozen in liquid N₂.

Transendothelial migration (TEM) assays

TEM assays were performed as previously described [16]. Briefly confluent monolayers of HUVECs (PromoCell, Spain) were grown onto the filters of transwell plates (96xwell transwell plates, 5 μ m pore size, Corning) and stimulated or not with TNF- α (10 ng/mL; PeProtech, Europe) for 4 hours. HUVEC were left by 6 hours in fresh medium without cytokine before addition of CLL or B cells onto them, for TEM assays, or in the bottom chambers for control suspension cultures (5×10^5 /well). At the indicated time-points, cells were harvested in PBS from the bottom and upper chambers (transmigrated (TM) or non-transmigrated (non-TM) cells in TEM assays, respectively). Where indicated, cellular density was increased in the bottom chambers through direct addition of CFSE fluorescently prestained CLL cells (5×10^5 /well) (5-(and-6)-Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester of fluorescein; 10 μ M; Thermofisher).

Where indicated, HUVEC monolayers or CLL suspensions were preincubated for 30 min with Fc fragments of human IgG (hFc; 1 μ g/mL; Jackson) in the presence or not of saturating amounts of hFc tagged recombinant extracellular domain dimers of human ephrinA4 (ephrinA4Fc; R&D) (0.5 μ g/mL; 30 min), EphA2 (EphA2Fc, 0.5 μ g/10⁶ cells), VCAM-1 (rhVCAM-1) (0.2 μ g/10⁶ cells) or ICAM-1 (rhICAM-1) (all from R&D). Saturating concentrations were determined by flow cytometry using an anti hFc or poly-His antibody as previously described [16].

Suspension cultures onto plate immobilized integrin ligands

Recombinant cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 (5 μ g/mL each) (R&D), extracellular matrix proteins (EMP) including fibronectin (FN, 10 μ g/mL), vitronectin (VN, 10 μ g/mL), laminin (LM, 10 μ g/mL), type I collagen (10 μ g/mL) (all from BD) or control protein (BSA; 5 μ g/mL; Sigma) were bound to the flat-surface of 96-well culture plates (96 \times multiwell culture plates, Corning) for 2 hours at 37°C. Where indicated CLL cell suspensions were incubated for 30 min with recombinant EphA2Fc (0.5 μ g/10⁶ cells) and purified hFc fragments of human Igs (1 μ g/10⁶ cells, Jackson) and extensively washed in culture medium before addition to culture wells (5×10^5 /well). All cultures were done in 200 μ l final volume of freshly prepared RPMI-1640 supplemented with pyruvate (1mM), L-Gln (1 mM) and 1 % FCS in a humidified incubator (5% CO₂, 37°C).

Coculture assays

Confluent monolayers of HUVEC were grown in multiwell plates (96x wells plastic culture plates, Corning). HUVEC activation was performed by providing 10ng/ml TNF α (PeProtech, Europe) to the culture medium for 4 hours followed by extensive washing in fresh medium without cytokine. TNF α activated or untreated HUVEC monolayers were used alive or fixed in 4% paraformaldehyde (PF) in PBS for 20 min followed by extensive washing in fresh medium. CLL cell suspensions (5×10^5 / well) were harvested from cocultures or control suspension cultures without HUVEC at the indicated time points by extensive washing in PBS containing 5 mM EDTA.

siRNA knock-down assays

Mixed siRNAs duplexes targeting different exons of *ephrinA4* (Supplementary Material and Methods) or negative control duplexes (Stealth RNAi negative control duplexes, medium-GC, Invitrogen) were nucleofected (300 nM) following manufacturer's recommendations (Amaxa, nucleofection reagents #4DV4XP-3024; 4D-Nucleofector X-unit). EphrinA4 protein knock-down

and CLL viability were analyzed by flow cytometry 48 hours postnucleofection.

Flow cytometry analysis

Cell suspensions were incubated with PE conjugated Annexin-V in HEPES buffer (ImmunoStep, Spain) followed by incubation with 7-AAD solution (5 µg/mL) until analysis in a four-color flow cytometer (FACScalibur, BD; Flow Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre, UCM). Absolute cell counts were measured by flow cytometry. Briefly, total recovered cells were suspended in equivalent final volumes of PBS to which equivalent concentrations of fluorescent counting beads were added (CountBright absolute counting beads, ThermoFisher). Acquisition was performed at low speed for 1 min. Absolute cell counts were determined according to the following formula:

$$\left(\frac{\text{Number of B-cell events}}{\text{Number of bead events}} \right) \times \text{number of beads added}$$

For immunofluorescent staining cell suspensions were incubated in cold PBS [0.1% bovine serum albumin (BSA)] (2×10^5 cells/50 µL) with saturating amounts of antibodies to human antigens including: anti-CD19 (FITC, APC or PE), -CD5 (PE-Cy5); FITC or PE-Cy5 anti-CD11a (α L); -CD29 (β 1), -CD18 (β 2) or -CD49d (α 4)(all from ImmunoStep, Spain); PE conjugated anti ZAP-70 or APC-CD38 (BD). Biotinylated goat-anti human ephrinA4 polyclonal Ab (R&D, Vitro, Spain) in the presence of purified goat IgG immunoglobulins (Jackson Immuno-Research, Europe) followed by streptavidin (SAV)-AlexaFluor-488 (Invitrogen).

Quantification of soluble ephrinA4 in serum by ELISA

Indirect ELISAs were carried out as previously described [18]. Briefly, plates (MaxiSorp Nunc-ImmunoPlates, Nunc) were preincubated with an anti-human ephrinA4 goat polyclonal antiserum (R&D) for antigen capture followed by addition of 100 µL serum samples diluted two to eightfold in binding buffer (TBS, 0.5% Tween 20). After 4h incubation, the bound ephrinA4 was detected by incubating wells with a biotinylated anti-ephrinA4 antibody followed by SAV-HRPO conjugate (Jackson-ImmunoResearch). Absorbance readings were at 405 nm (reference wavelength 492 nm) on a microplate reader (Bio-Tek Instruments). Standard curves were generated with serial dilutions of a recombinant human ephrinA4 (R&D) (ng/ml).

Integrin activation state and ligand binding assays

CLL cell suspensions (10^6 /mL) were preincubated for 30 min (37°C) in RPMI/2%FCS culture medium, with or without MnCl_2 (1mM), containing purified Fc

fragments of human IgG (Jackson). Next, cells were maintained in the same binding medium and incubated 30 min with recombinant human EphA2 (0.5 µg/ 10^6 cells). To detect activated VLA4, cells were incubated in cold PBS with PE-conjugated HUTS-21 mAb (Becton Dickinson). To analyze soluble ligand binding, VCAM-1-Fc were preclustered with a PE-conjugated affinity pure F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG, Fc gamma fragment specific (Jackson ImmunoResearch) before addition to the EphA2Fc-preincubated CLL cell suspensions.

Fluorescence microscopy studies

Fluorescence microscopy studies were performed, accordingly, onto 1) paraformaldehyde fixed (4% in PBS, 30 min) transwell filters from TEM assays, 2) acetone fixed (10 min) tissue cryo-sections from CLL lymphadenopathies (7 µm thick; Leica cryo-cutter, -22°C), 3) CLL cell suspensions adhered onto microscope slides and fixed in paraformaldehyde solution (4% in PBS, 30 min) or 4) CLL-HUVEC co-cultures in 16xwell glass chamber slides (Corning) as previously described [16]. FITC coupled TUNEL detection kit was used according to manufacturer recommendations (Roche). Immunofluorescence stainings were done in humidified chambers in 100 µl PBS (0.1%BSA) containing 0.1 µg/mL antibodies (Supplementary Material and Methods). Nuclei were counterstained with Hoechst (5 µg/mL, 10 min; Thermofisher). Samples were mounted with a non-fluorescent anti-fading mounting solution (ProlongGold, Thermofisher). Confocal images were acquired in a laser confocal microscope system (Leica, TCS SP2 AOBs; Flow Cytometry and Fluorescence Microscopy Centre, UCM).

Image analyses tools and procedures were performed with Image J (Supplementary Material and Methods).

Xenograft assays in mice

Germ-free BALB/c mice (Charles River Laboratories) were intravenously injected through the tail vein with CFSE prestained (10 µM, Thermofisher) human CLL cells (20×10^6 cells per mice) in 20 µl sterile PBS solution with or without different concentrations of ephrinA4 purified from serum of CLL patients (Supplementary Material and Methods). Animals were sacrificed by anesthesia 48 hours later and cell suspensions from surgically removed popliteal lymph nodes were stained with an APC conjugated anti mouse CD45 Ab (BD), Annexin-PE and 7AAD for flow cytometry analysis (10^7 total cells per staining). Human CLL cells were gated according to positivity for CFSE within the mouse CD45 negative cell population (Supplementary Figure S1). The minimum number of animals per experimental condition and CLL sample was prospectively calculated (SPSS Sample Power 3; power, 0.8; $\alpha < 0.05$). Animal studies

were approved by the Ethical and Research Committee in Animal Experimentation of the Complutense University of Madrid.

Statistical analysis

All in vitro assays were done in triplicate wells and results are shown as mean (\pm SD). Statistical analyses were performed in SPSS IBM or StatGraphics Centurion XVI. Spearman correlation coefficient was used to measure interrelatedness of variables and significance determined by using the Kruskal Wallis test. Normal distribution of data was determined by Shapiro-Wilks test. Normally distributed data were compared by paired or unpaired, accordingly, two-tailed Student's *t*-test [*; $P < 0.05$; **; $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, not statistically significant ($P \geq 0.05$)].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the patients who contributed to this work and to Drs. Alfonso Cortés, Juan José Muñoz, Amalia Vázquez and Carmen Hernández for technical advice and assistance in flow cytometry and fluorescence microscopy techniques (CAI Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, UCM).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

FUNDING

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Fondo de Investigaciones Sanitarias grant n. PI11/01976), Fundación Científica Eugenio Rodríguez Pascual (grant. FCERP 2014-2015), Asociación Española Contra el Cáncer (AECC AIO 2013-2016) and the British Council School (BIOOR 2013-2016). P. Fortea is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Fondo de Investigaciones Sanitarias, TERCEL RD12/0019/0007). MA Flores is supported by the Mexican Ministry of Education (Chihuahua Autónoma University).

REFERENCES

1. Burger JA. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol.* 2012; 24:643-649.
2. Ghia P, Chiorazzi N and Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med.* 2008; 264:549-562.
3. Badoux X, Bueso-Ramos C, Harris D, Li P, Liu Z, Burger J, O'Brien S, Ferrajoli A, Keating MJ and Estrov Z. Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and bone marrow endothelial cells: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hum Pathol.* 2011; 42:1989-2000.
4. Buggins AG, Pepper C, Patten PE, Hewamana S, Gohil S, Moorhead J, Folarin N, Yallop D, Thomas NS, Mufti GJ, Fegan C and Devereux S. Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription. *Cancer Res.* 2010; 70:7523-7533.
5. Long BW, Witte PL, Abraham GN, Gregory SA and Plate JM. Apoptosis and interleukin 7 gene expression in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92:1416-1420.
6. Maffei R, Fiorcari S, Bulgarelli J, Martinelli S, Castelli I, Deaglio S, Debbia G, Fontana M, Coluccio V, Bonacorsi G, Zucchini P, Narni F, Torelli G, Luppi M and Marasca R. Physical contact with endothelial cells through beta1- and beta2- integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells. *Haematologica.* 2011; 97:952-960.
7. Moreno A, Villar ML, Camara C, Luque R, Cespon C, Gonzalez-Porque P, Roy G, Lopez-Jimenez J, Bootello A and Santiago ER. Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2001; 97:242-249.
8. McGettrick HM, Lord JM, Wang KQ, Rainger GE, Buckley CD and Nash GB. Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium. *J Leukoc Biol.* 2006; 79:779-788.
9. Borthwick NJ, Akbar AA, Buckley C, Pilling D, Salmon M, Jewell AP and Yong KL. Transendothelial migration confers a survival advantage to activated T lymphocytes: role of LFA-1/ICAM-1 interactions. *Clin Exp Immunol.* 2003; 134:246-252.
10. Ferrero E, Belloni D, Contini P, Foglieni C, Ferrero ME, Fabbri M, Poggi A and Zocchi MR. Transendothelial migration leads to protection from starvation-induced apoptosis in CD34+CD14+ circulating precursors: evidence for PECAM-1 involvement through Akt/PKB activation. *Blood.* 2003; 101:186-193.
11. Miyasaka M and Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4:360-370.
12. Hartmann TN, Grabovsky V, Wang W, Desch P, Rubenzer G, Wollner S, Binsky I, Vallon-Eberhard A, Sapozhnikov A, Burger M, Shachar I, Haran M, Honczarenko M, Greil R and Alon R. Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res.* 2009; 69:3121-3130.
13. Till KJ, Lin K, Zuzel M and Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for

- migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood*. 2002; 99:2977-2984.
14. Till KJ, Spiller DG, Harris RJ, Chen H, Zuzel M and Cawley JC. CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood*. 2005; 105:4813-4819.
 15. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, Bossi F, Lorenzon D, Degan M, Rossi FM, Rossi D, Bulian P, Franco V, Del Poeta G, Deaglio S, Gaidano G, et al. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res*. 2009; 69:4001-4009.
 16. Trinidad EM, Ballesteros M, Zuloaga J, Zapata A and Alonso-Colmenar LM. An impaired transendothelial migration potential of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells can be linked to ephrin-A4 expression. *Blood*. 2009; 114:5081-5090.
 17. Aasheim HC, Munthe E, Funderud S, Smeland EB, Beiske K and Logtenberg T. A splice variant of human ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes. *Blood*. 2000; 95:221-230.
 18. Alonso-Colmenar LM, Trinidad EM, de Garcillan B, Ballesteros M, Castellanos M, Cutillo I, Munoz JJ and Zapata AG. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in healthy human B lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leuk Res*. 2009; 33:395-406.
 19. Trinidad EM, Zapata AG and Alonso-Colmenar LM. Eph-ephrin bidirectional signaling comes into the context of lymphocyte transendothelial migration. *Cell Adh Migr*. 2010; 4:363-367.
 20. Larson J, Schomberg S, Schroeder W and Carpenter TC. Endothelial EphA receptor stimulation increases lung vascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 295:L431-439.
 21. Daar IO. Non-SH2/PDZ reverse signaling by ephrins. *Semin Cell Dev Biol*. 2012; 23:65-74.
 22. Davids MS and Burger JA. Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open J Hematol*. 2012; 3.
 23. Schnoor M, Alcaide P, Voisin MB and van Buul JD. Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015:946509.
 24. Muller WA and Luscinskas FW. Assays of transendothelial migration in vitro. *Methods Enzymol*. 2008; 443:155-176.
 25. Carman CV and Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*. 2004; 167:377-388.
 26. Millan J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P and Ridley AJ. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol*. 2006; 8:113-123.
 27. Muller WA. Mechanisms of transendothelial migration of leukocytes. *Circ Res*. 2009; 105:223-230.
 28. Mionnet C, Sanos SL, Mondor I, Jorquera A, Laugier JP, Germain RN and Bajenoff M. High endothelial venules as traffic control points maintaining lymphocyte population homeostasis in lymph nodes. *Blood*. 2011; 118:6115-6122.
 29. Burger JA. The CLL cell microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 792:25-45.
 30. Plate JM, Long BW and Kelkar SB. Role of beta2 integrins in the prevention of apoptosis induction in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2000; 14:34-39.
 31. Lagneaux L, Delforge A, De Bruyn C, Bernier M and Bron D. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 1999; 35:445-453.
 32. Walsby E, Buggins A, Devereux S, Jones C, Pratt G, Brennan P, Fegan C and Pepper C. Development and characterization of a physiologically relevant model of lymphocyte migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; 123:3607-3617.
 33. Slattery MJ and Dong C. Neutrophils influence melanoma adhesion and migration under flow conditions. *Int J Cancer*. 2003; 106:713-722.
 34. Till KJ, Harris RJ, Linford A, Spiller DG, Zuzel M and Cawley JC. Cell motility in chronic lymphocytic leukemia: defective Rap1 and alphaLbeta2 activation by chemokine. *Cancer Res*. 2008; 68:8429-8436.
 35. Vincent AM, Cawley JC and Burthem J. Integrin function in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996; 87:4780-4788.
 36. Eksioglu-Demiralp E, Alpdogan O, Aktan M, Firatli T, Ozturk A, Budak T, Bayik M and Akoglu T. Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. *Leukemia*. 1996; 10:1331-1339.
 37. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM, Degan M, Amadori S and Del Poeta G. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 111:865-873.
 38. Fiorcari S, Brown WS, McIntyre BW, Estrov Z, Maffei R, O'Brien S, Sivina M, Hoellenriegel J, Wierda WG, Keating MJ, Ding W, Kay NE, Lannutti BJ, Marasca R and Burger JA. The PI3-kinase delta inhibitor idelalisib (GS-1101) targets integrin-mediated adhesion of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell to endothelial and marrow stromal cells. *PLoS One*. 2014; 8:e83830.
 39. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C and Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998; 91:2387-2396.

40. Saito Y, Owaki T, Matsunaga T, Saze M, Miura S, Maeda M, Eguchi M, Tanaka R, Taira J, Kodama H, Goto S, Niitsu Y, Terada H and Fukai F. Apoptotic death of hematopoietic tumor cells through potentiated and sustained adhesion to fibronectin via VLA-4. *J Biol Chem.* 2009; 285:7006-7015.
41. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM and Cheresh DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol.* 2001; 155:459-470.
42. Whitlock BB, Gardai S, Fadok V, Bratton D and Henson PM. Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms. *J Cell Biol.* 2000; 151:1305-1320.
43. Stupack DG. Integrins as a distinct subtype of dependence receptors. *Cell Death Differ.* 2005; 12:1021-1030.
44. Martinez-Moreno M, Leiva M, Aguilera-Montilla N, Sevilla-Movilla S, Isern de Val S, Arellano-Sanchez N, Gutierrez NC, Maldonado R, Martinez-Lopez J, Buno I, Garcia-Marco JA, Sanchez-Mateos P, Hidalgo A, Garcia-Pardo A and Teixido J. In vivo adhesion of malignant B cells to bone marrow microvasculature is regulated by alpha4beta1 cytoplasmic-binding proteins. *Leukemia.* 2015.
45. Vihanto MM, Vindis C, Djonov V, Cerretti DP and Huynh-Do U. Caveolin-1 is required for signaling and membrane targeting of EphB1 receptor tyrosine kinase. *J Cell Sci.* 2006; 119:2299-2309.
46. Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009; 14:2522-2545.