

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Impacto de las alteraciones biológicas y moleculares en el  
microambiente estromal de la leucemia linfocítica crónica  
tratada con nuevos fármacos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Lydia González Serrano**

**Director**

**José Antonio García Marco**

**Madrid**

**© Lydia González Serrano, 2024**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

Impacto de las alteraciones biológicas y moleculares en el microambiente estromal de la leucemia  
linfocítica crónica tratada con nuevos fármacos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Lydia González Serrano

DIRECTOR

José Antonio García Marco



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Doctorado en Bioquímica, Biología molecular y  
Biomedicina**



**TESIS DOCTORAL**

**Impacto de las alteraciones biológicas y moleculares en el  
microambiente estromal de la leucemia linfocítica  
crónica tratada con nuevos fármacos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR**

**Lydia González Serrano**

**BAJO LA DIRECCIÓN DEL DOCTOR**

**José Antonio García Marco**

**Madrid, 2023**





## AGRADECIMIENTOS

Después de mucho esfuerzo y trabajo por fin ha llegado este día que tanto esperaba tras estos 4 años. Han sido días difíciles, pero a la vez muy gratificantes que me han ayudado a crecer como persona. Pero me quedo con todo aquel que me ha acompañado en esta etapa tan importante y que contribuyen a que sea la persona que soy.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. José Antonio García Marco, mi director, por haber confiado en aquella chica que tenía unas ganas tremendas de empezar en el maravilloso y difícil mundo de la investigación. Mil gracias Pepe por haberme acogido con tanto cariño y por brindarme esta gran oportunidad de crecer aún más, no sólo como profesional con tu apoyo científico, sino como persona al desarrollar la tesis en el laboratorio. Al Dr. Luis Espinosa Hevia por aconsejarme durante la tesis. A Ana Montes, sin la cual este trabajo no habría sido posible, mil gracias por haberme ayudado tanto en la recogida de las muestras y mil gracias por tu alegría e interés en esta tesis. También quiero agradecer al Dr. Rafael Forés, por su inconmensurable ayuda en el presente trabajo y sobre todo gracias al personal del Servicio de Hematología del Hospital Puerta de Hierro en particular Alicia y Pilar por haberme ayudado tanto durante todo este tiempo y haberme hecho más fácil el camino de la tesis y a Nuria y Nicole por su interés en todo este tiempo.

Me gustaría agradecer a la Dra. M Ángeles García Pardo y a Dra. Noemí Aguilera por la inconmensurable ayuda al inicio de este trabajo sin la cual no habría sido posible llevarlo a cabo.

Especialmente quiero dar las gracias a mi familia de los laboratorios anexos, por haberme acogido con tanto cariño y por enseñarme que el apoyo y el compañerismo es lo que debería prevalecer siempre. Gracias por estar ahí día tras día cuando necesitaba un hombro en el que llorar los biodramas, los ensayos fallidos, las alegrías y sobre todo por aconsejarme y ayudarme a crecer no solo profesionalmente si no para ser mejor persona. En concreto quiero dar las gracias a mi gran familia de UNIM y Reuma sin los cuales estos días habrían sido menos fáciles de llevar.

Dra. M. Alejandra Sánchez, Sandris, mil gracias de verdad por todo, el apoyo y la ayuda, por las fuerzas, los consejos que me has dado no solo con la tesis y, sobre todo, por encontrar el cobijo en vuestro laboratorio (Reuma + UNIM) cuando lo he necesitado. Gracias por transmitirme tu tranquilidad (y tu "pirámide de luz" que evolucionó a "dodecaedro"), tu bondad, generosidad y ojalá todo el mundo fuera una cuarta parte de la gran persona que eres. Gracias por haberme ayudado y motivado y haberte implicado tanto conmigo, de corazón te estoy inconmensurablemente agradecida y espero mantener muchos años la amistad que hemos forjado entre pipetas.

UNIM, todos habéis sido muy importantes para mí. Dra. Laura Sanz y Dra. Marta Compte muchísimas gracias por la ayuda durante esta etapa y por los consejos. Las tres sois un gran modelo en el que fijarse y ojalá llegar a ser como vosotras algún día. Iñigo, mi compitrueno del lab, eres un ser de luz que transmites energía y buena vibra a todo aquel que esté cerca de ti, gracias por esos ratos de escape en el lab, que no sabes cuánto me han ayudado y por esos momentos vividos fuera del lab. Eres una persona muy especial para todos, gracias de corazón, por tanto. Al ya Dr. Tapia-Galisteo, Anthony, gracias por estar ahí, y darme fuerzas para

continuar, por apoyarnos mutuamente, por aconsejarme y por ser mi “pre-doc mayor”, ver en ti mi modelo más próximo de que con esfuerzo se pueden conseguir nuestras metas, pese a las dificultades que nos encontremos, superándote día a día y logrando aquello que no nos planteábamos.

Lo único que puedo decir a todos es que mil gracias “HappyFamily” por todos los momentos vividos dentro y fuera del laboratorio, por nuestras clases de Salsation, nuestras comilonas, las tardes de bolera, por esas conversaciones hasta las mil dentro y fuera del lab, que han dado paso a una amistad y cariño que siempre estarán conmigo y espero mantener.

A Silvia, Arancha, Elvira, Alberto, Nuria, por preocuparos, por la ayuda, por mostrarme vuestro apoyo y cariño. Irene, Dra. Romera, hemos vivido esta etapa juntas, animándonos y apoyándonos, me quedo con todas las risas y confianzas, en el despacho, el momento colonia, los coffebreaks. Seguro que me dejo a mucha gente por agradecer, pero en general gracias a todos los que de una manera u otra han intentado comprender qué es lo que estaba haciendo y mostrarme su apoyo.

Sin duda, lo más importante y lo mejor que me llevo de esta experiencia, aparte de todo el conocimiento aprendido y la experiencia personal, sois todos vosotros que para mí siempre seréis mi familia adoptiva. En definitiva, gracias por todo, no encontraré mejor team que vosotros y os echaré muchísimo de menos donde vaya.

A mis amigas, por tener en ellas uno de mis mayores apoyos, a Marta por ser una gran amiga y estar ahí desde aquella primera clase y compartir este “parto” juntas, a Yols, quien nos iba a decir que eto nos uniría tanto, gracias por ser un gran apoyo incluso a distancia, Andrea, por estar ahí y crecer juntas; seguid luchando como hasta ahora porque estoy segura de que vais a conseguir todo lo que os propongáis.

Iván, eres una de las personas más especiales de mi vida, has aparecido cuando menos lo esperaba y no sé dónde nos llevará la vida, pero espero que el camino sea largo y juntos. Creo que estás siendo testigo de la peor, más caótica y más desesperante etapa de mi vida, mi peor época, pero gracias por tu paciencia, interés y apoyo en esta etapa, por acompañarme en estos momentos y animarme a alcanzar mis metas y cumplir mis sueños.

Y, por último, mi familia. A mis abuelos, que las circunstancias no os permitieron ver este momento, pero que sé que estarías rebosantes de orgullo y alegría de ver donde he llegado. A mi hermana y a mis padres porque esta tesis en realidad es vuestra. Sin vosotros no hubiera llegado hasta aquí, nada de esto hubiera sido posible. Sé que lo sabéis, pero quiero agradecerlos haberme animado siempre a que persiguiera aquello en lo que creía y luchara por conseguirlo y superarme. Gracias por animarme cuando más lo necesitaba, por el apoyo incondicional, darme esperanza y creer en mí, por escucharme contar datos, aunque no estuvieran dentro de vuestro campo y hacerlo siempre con un interés desbordante. Gracias por estar siempre ahí, por la paciencia, el cariño y la comprensión, gracias por haberme inculcado los valores que me hacen ser quien soy y ser mi mejor modelo.

Sin cada uno de vosotros esta tesis no hubiera sido posible. Gracias de corazón.

Os quiero

# ***ÍNDICE***

---



# Índice de contenido

RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Leucemia linfocítica crónica. ....	7
1.1.1. Características clínicas principales y epidemiología .....	7
1.1.2. Marcadores pronósticos.....	8
1.1.2.1. Sistemas de clasificación Rai y Binet.....	8
1.1.3. Marcadores moleculares /genéticos .....	9
1.1.3.1. Alteraciones citogenéticas.....	10
1.1.3.2. Estado mutacional de IgHV.....	11
1.1.3.3. Expresión de CD38 .....	12
1.1.3.4. Expresión de ZAP70 .....	12
1.1.3.5. Expresión de CD49d .....	12
1.1.3.6. Mutaciones genéticas .....	13
1.2. MICROAMBIENTE .....	15
1.2.1. Tipos celulares o componentes implicados en el microambiente: .....	16
1.2.2. Microambiente tumoral en la LLC. Integración.....	21
1.3. RECEPTOR DE LINFOCITOS B (BCR) .....	23
1.3.1. Origen molecular. Ontogenia del linfocito B.....	23
1.3.2. BCR .....	25
1.3.3. Señalización del BCR .....	25
1.3.3.1. Tirosina quinasa de Bruton BTK.....	27
1.3.3.1.1. Inhibidores de BTK.....	27
1.3.3.1.2. Ibrutinib .....	27
1.3.3.1.3. Otros inhibidores de BTK, de última generación.....	28
1.3.3.2. PI3K.....	28
1.3.3.2.1. Idelalisib.....	29
1.3.3.3. Bcl-2.....	29
1.3.3.3.1. Venetoclax .....	29
1.3.3.4. Mutaciones en la vía del BCR.....	30
1.4. CD99 .....	31
1.5. TRATAMIENTO DE LA LLC.....	33
1.5.1. Antecedentes de la evolución de los tratamientos .....	33

1.5.2.	Elección del tratamiento y criterios de inicio.....	34
1.5.2.1.	Seguimiento, Respuesta y evaluación.....	36
1.5.3.	Tratamiento en pacientes R/R segunda línea.....	36
1.5.3.1.	Resistencias al tratamiento.....	37
1.5.3.2.	Evolución clonal.....	38
2.	HIPÓTESIS.....	43
3.	OBJETIVOS.....	44
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
4.1.	Muestras biológicas.....	47
4.1.1.	Pacientes.....	47
4.1.2.	Líneas celulares.....	48
4.2.	Procesamiento de muestras.....	48
4.2.1.	Aislamiento de las células en sangre.....	48
4.2.2.	Extracción automática de ADN.....	48
4.2.3.	Aislamiento y extracción de RNA.....	49
4.3.	Análisis de la expresión.....	49
4.3.1.	PCR convencional.....	49
4.3.2.	Determinación del estado mutacional de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas ( <i>IGHV</i> ).....	49
4.3.3.	Determinación del estado mutacional de <i>TP53</i> .....	50
4.3.4.	Secuenciación Sanger.....	50
4.3.5.	Análisis de la clonalidad.....	51
4.3.6.	Next Generation Sequencing Analysis (NGS).....	52
4.4.	Citometría de flujo.....	53
4.5.	Ensayos <i>in vitro</i> . Cultivo celular.....	54
4.5.1.	Cultivos de líneas de estroma de médula ósea HS-5 y HS-27A.....	54
4.5.2.	Cultivos de HUVEC.....	54
4.5.3.	Cultivos de células primarias (PBMCS).....	54
4.5.4.	Co-cultivos.....	55
4.5.5.	Estudio de la capacidad migratoria hacia CXCL12.....	55
4.5.6.	Ensayos de migración transendotelial.....	56
4.5.7.	Análisis de proteínas mediante <i>Western blotting</i> .....	56
4.6.	ELISA.....	57
4.7.	Análisis estadístico.....	57

4.8. Anticuerpos .....	58
4.9. Reactivos.....	58
5. RESULTADOS .....	63
5.1. Características clínicas de los pacientes .....	63
5.2. Análisis de la expresión de CD99 y CD49d bajo el tratamiento con Ibrutinib. ....	65
5.3. Expresión de CD99 y CD49d bajo el tratamiento con Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax. .....	70
5.4. Efecto de Ibrutinib sobre la capacidad de migración de las células de LLC hacia CXCL12 .....	77
5.5. Capacidad de migración transendotelial hacia CXCL12 .....	79
5.6. Caracterización de las proteínas implicadas en la señalización y supervivencia celular .....	81
5.7. Señalización intracelular de las proteínas AKT y MAPs: Erk1/2, p38.....	85
6. DISCUSIÓN.....	89
7. CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	105
ABREVIATURAS .....	139



***RESUMEN***

***SUMMARY***

---



## RESUMEN

**Introducción:** La leucemia linfocítica crónica (LLC) se caracteriza por una acumulación en sangre periférica de linfocitos B CD5+. Progresivamente, los linfocitos se acumulan en los órganos linfoides, principalmente en los ganglios linfáticos, donde reciben señales de supervivencia y migración celular por parte de los componentes que conforman el microambiente tisular. Entre ellos, la molécula transmembrana CD99 está implicada en la adhesión, migración y tráfico de proteínas de las células hematopoyéticas, y se postula como un potencial objetivo terapéutico. Por otro lado, otra molécula implicada en las interacciones del microambiente tumoral de la LLC es CD49d. Se trata de la subunidad  $\alpha 4$  de la integrina  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4), es una molécula de adhesión que tiene un papel importante en el tráfico celular y en la proliferación y supervivencia de los linfocitos B en la LLC. Existe una asociación entre los niveles de expresión de CD49d elevados con un curso clínico más agresivo y peor pronóstico. Así, se ha relacionado con la LLC y se ha demostrado como un regulador crítico de la migración linfocitaria. De tal forma que tanto CD99 como CD49d, son unos prometedores biomarcadores predictivos de respuesta clínica tras terapia con inhibidores de la ruta del BCR como Ibrutinib, Idelalisib. Además, la combinación de Ibrutinib con Venetoclax ha demostrado que actúan en diferentes subpoblaciones de LLC minimizando la enfermedad en todos los lugares anatómicos.

**Objetivos:** En este contexto, y con el fin de encontrar tratamientos que impidan la progresión de la LLC, el trabajo que conforma la presente Tesis Doctoral se organiza en torno a 3 objetivos principales: 1) la caracterización biológica de la expresión de CD99 y CD49d en el ambiente estromal de células de pacientes con LLC sometidas al tratamiento *in vitro* con Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax; 2) la valoración de la influencia del microambiente en la migración y adhesión celular bajo el tratamiento con Ibrutinib, analizando la migración hacia CXCL12 y la expresión de CD99 y CD49d en la adhesión y en la migración a través del endotelio. 3) la caracterización en las vías de señalización: análisis de la influencia de Ibrutinib en las rutas de señalización de AKT y de las MAPKs, en concreto ERK y p38 y valoración sobre las proteínas implicadas en la apoptosis como Bcl-2 y Mcl-1.

**Métodos:** En este estudio se propone establecer el papel potencial de nuevos fármacos dirigidos a dianas celulares específicas en el tratamiento de la LLC, mediante el análisis de la expresión de CD99 y CD49d en células de pacientes en tratamiento con Ibrutinib, Idelalisib o Venetoclax. Se analizaron un total de 55 pacientes y 5 donantes, recogidos en el Hospital Puerta de Hierro secuencialmente entre 2018-2021. La evaluación del nivel de expresión de CD99 se realizó mediante citometría de flujo (CFM) de las células de LLC, tanto individualmente como en co-cultivo con las células estromales HS-5 y HS-27A. Asimismo, se evaluó la quimiotaxis y la migración transendotelial hacia CXCL12. Además, el estado mutacional de los genes *TP53* e *IGHV* se estableció mediante secuenciación masiva (NGS) y Sanger. El análisis de la señalización intracelular se llevó a cabo mediante ELISA de las proteínas AKT, ERK1/2 y p38 comparando la forma fosforilada de la proteína con la proteína total bajo el tratamiento a las 2h y 24h con Ibrutinib. Además, mediante Western blotting se estableció el estado de las proteínas CD99, Bcl-2 y Mcl-1 en células de LLC bajo el tratamiento con Ibrutinib a las 24h y 48h. Se comparó la

influencia de Ibrutinib con Idelalisib y Venetoclax a las 24h en la expresión de CD99, Bcl-2 y Mcl-1.

**Resultados:** La administración de Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax, disminuye la intensidad de fluorescencia de CD99 a las 24h y 48h en linfocitos B, T y monocitos. Por el contrario, la expresión de CD49d no está significativamente disminuida en ninguna de las tres poblaciones. Ibrutinib disminuye a su vez la capacidad migratoria hacia CXCL12 de los linfocitos B, T y monocitos, al igual que la capacidad de migración transendotelial a través de una monocapa de células endoteliales HUVEC. A su vez, la expresión de CD99 y Mcl-1 disminuye a las 24h con la administración de Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax independientemente del estado mutacional de *IgHV* y de *TP53*. Además, la exposición a Ibrutinib disminuye la expresión de CD99 sin observarse cambios en Bcl-2.

Asimismo, la expresión de AKT como P38, tras la incubación de las células de LLC con Ibrutinib, disminuye a las 24h, al contrario que la expresión de ERK que disminuye a las 2h.

**Conclusiones:** Las células de LLC tratadas con Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax en contacto con el estroma, no presentan disminución en los niveles de expresión de CD99 y CD49d. Por el contrario, en ausencia de estroma, Ibrutinib y Venetoclax disminuyeron significativamente los niveles de expresión de CD99, sin que se observen diferencias con Idelalisib tanto en pacientes como en muestras control de donantes. Además, Ibrutinib disminuye los niveles de expresión de CD99 independientemente del estatus mutacional de *TP53* e *IGHV* en los linfocitos B. Mientras la expresión de CD49d permanece sin cambios independientemente del estado mutacional de *IGHV*.

La quimiotaxis de las células de LLC hacia CXCL12 bajo el tratamiento con Ibrutinib disminuye el número de células migradas y disminuye la expresión de CD99 tanto en linfocitos B como T, al igual que ocurre en la migración transendotelial. Además, tras el tratamiento con Ibrutinib, los niveles de Mcl-1 disminuyen sin observarse cambios en Bcl-2, pese a mostrar un aumento con venetoclax. En conjunto, la detección de las proteínas AKT y P38 muestran un descenso a las 2h de incubación de Ibrutinib al contrario que ERK que disminuye a las 24h.

## SUMMARY

**Introduction:** Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by an accumulation of CD5+ B lymphocytes in peripheral blood. Progressively, lymphocytes accumulate in the lymphoid organs, mainly in the lymph nodes, where they receive signals of survival and cell migration by the components that constitute the tissue microenvironment. Among them, the transmembrane molecule CD99 is involved in the adhesion, migration and trafficking of proteins in hematopoietic cells, and is postulated as a potential therapeutic target. On the other hand, another molecule involved in CLL tumor microenvironment interactions is CD49d. The  $\alpha 4$  subunit of integrin  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) is an adhesion molecule that plays an important role in cell traffic and the proliferation and survival of B lymphocytes in CLL. There is an association between elevated CD49d expression levels with a more aggressive clinical course and worse prognosis. Thus, it has been linked to CLL and has been shown to be a critical regulator of lymphocyte migration. Furthermore, both CD99 and CD49d are promising predictive biomarkers of clinical response after therapy with BCR pathway inhibitors such as Ibrutinib, Idelalisib. In addition, the combination of Ibrutinib with Venetoclax has been shown to act on different subpopulations of CLL minimizing disease in all anatomical locations.

**Objectives:** In this context, and in order to find treatments that prevent the progression of the LLC, the work that forms the present Doctoral Thesis is organized around 3 main objectives: 1) The biological characterization of CD99 and CD49d expression in the stromal cell environment of patients with CLL undergoing in vitro treatment with Ibrutinib, Idelalisib and Venetoclax; 2) Assessing the influence of the microenvironment on cell migration and adhesion under Ibrutinib treatment, analysing migration to CXCL12 and expression of CD99 and CD49d in adhesion and migration through the endothelium. 3) Characterisation of signalling pathways: analysis of the influence of Ibrutinib on signalling pathways of AKT and MAPKs, namely ERK and p38 and assessment of proteins involved in apoptosis such as Bcl-2 and Mcl-1.

**Methods:** This study aims to establish the potential role of new drugs targeting specific cell targets in the treatment of CLL by analyzing the expression of CD99 and CD49d in cells of patients on treatment with Ibrutinib, Idelalisib or Venetoclax. A total of 55 patients and 5 donors were analyzed, collected in the Hospital Puerta de Hierro sequentially between 2018-2021. CD99 expression level was evaluated by flow cytometry (CFM) of CLL cells, both individually and in co-culture with HS-5 and HS-27A stromal cells. Chemotaxis and transendotelial migration to CXCL12 were also evaluated. In addition, the mutational status of the TP53 and IGHV genes was established by next generation sequencing (NGS) and Sanger. The analysis of intracellular signaling was carried out by ELISA of AKT, ERK1/2 and p38 proteins comparing the phosphorylated form of the protein with the total protein under treatment at 2h and 24h with Ibrutinib. In addition, Western blotting established the status of CD99, Bcl-2 and Mcl-1 proteins in CLL cells under treatment with Ibrutinib at 24h and 48h. We compared the influence of Ibrutinib with Idelalisib and Venetoclax at 24h in the expression of CD99, Bcl-2 and Mcl-1.

**Results:** The administration of Ibrutinib, Idelalisib and Venetoclax decreases the fluorescence intensity of CD99 at 24h and 48h in lymphocytes B, T and monocytes. Conversely,

CD49d expression is not significantly decreased in any of the three populations. Ibrutinib in turn decreases the CXCL12 migratory capacity of B, T and monocyte lymphocytes, as well as the transendotelial migration capacity through a HUVEC endothelial cell monolayer. In turn, the expression of CD99 and Mcl-1 decreases at 24h with the administration of Ibrutinib, Idelalisib and Venetoclax both regardless of the mutational status of IgHV and TP53. In addition, exposure to Ibrutinib decreases the expression of CD99 without changes in Bcl-2.

Likewise, the expression of AKT and P38, after incubation of LLC cells with Ibrutinib, decreases at 24 h, unlike the expression of ERK that decreases at 2h.

**Conclusions:** CLL cells treated with Ibrutinib, Idelalisib and Venetoclax in contact with the stroma do not show a decrease in CD99 and CD49d expression levels. Conversely, in the absence of stroma, Ibrutinib and Venetoclax significantly decreased CD99 expression levels, without differences with Idelalisib being observed in both patients and donor control samples. In addition, Ibrutinib decreases CD99 expression levels regardless of TP53 and IGHV mutational status in B lymphocytes. While CD49d expression remains unchanged regardless of IGHV mutation status.

Chemotaxis of CLL cells to CXCL12 under Ibrutinib treatment decreases the number of migrated cells and decreases the expression of CD99 in both B and T lymphocytes, as occurs in transendotelial migration. In addition, after *in vitro* treatment with Ibrutinib, Mcl-1 levels decrease without changes in Bcl-2, despite showing an increase with venetoclax.

Overall, the detection of AKT and P38 proteins shows a decrease at 2h of incubation with Ibrutinib in contrast to ERK that decreases at 24h.

# ***INTRODUCCIÓN***

---



# 1. INTRODUCCIÓN

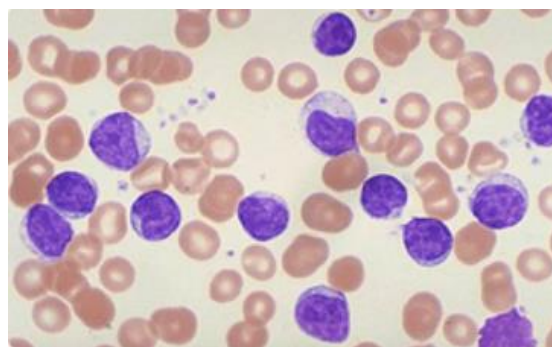
## 1.1. Leucemia linfocítica crónica.

### 1.1.1. Características clínicas principales y epidemiología

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es el síndrome linfoproliferativo más frecuente en adultos de países occidentales (Ishibe et al., 2001; Jemal et al., 2007, 2010), con una incidencia entre la población occidental del 25-30% de todas las leucemias, situándose en 4.88 casos por 100.000 habitantes y año en la Unión Europea (Jeyakumaran et al., 2016). La edad media de diagnóstico es de 72 años y los varones muestran una prevalencia mayor que en mujeres, con un ratio de 1.7:1 (Molica, 2006; L. Watson et al., 2008).

Es una neoplasia monoclonal de linfocitos B que se caracteriza por una proliferación clonal y una acumulación progresiva de linfocitos B maduros CD5 positivos en la sangre, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo (Burger J. A., 2020; Mauro et al., 1999; Rozman & Montserrat, 1995), al tener la vida media alargada. Esto ocurre por alteraciones genómicas a nivel de la célula progenitora que aumentan la resistencia a la apoptosis. (Burger J. A., 2020)

Estos linfocitos se caracterizan por co-expresar CD19, CD22, CD23 y CD5, aunque presentan unos niveles bajos de CD20 y CD79b respecto a los linfocitos B normales (Ginaldi et al., 1998). Muchos pacientes están asintomáticos al diagnóstico y la LLC se detecta al observar linfocitosis accidental en un análisis de rutina. Este signo, ocasionalmente, puede ir acompañado de cierto grado de anemia y/o trombocitopenia (Strati & Shanafelt, 2015). Así pues, el diagnóstico de la LLC requiere la presencia de  $\geq 5 \times 10^9/L$  linfocitos B en sangre periférica, mantenido al menos durante 3 meses. La clonalidad de estos linfocitos B debe ser confirmada por restricción de la expresión de las cadenas ligeras (kappa o lambda) mediante citometría de flujo. De modo que con el panel de CD19, CD5, CD20, CD23,  $\kappa$  y  $\lambda$  sería suficiente para establecer el diagnóstico (Hallek et al., 2018; Rawstron et al., 2018).



**Figura 1 Frotis de LLC.** Tinción Wright-Giemsa al microscopio óptico con objetivo 40x.

Por otra parte, la proliferación y supervivencia de la célula neoplásica depende de los estímulos realizados sobre el receptor de la célula B (BCR) por células del microambiente tisular (macrófagos, linfocitos T, células dendríticas). La vía de señalización del BCR actúa a través de

diferentes quinasas (de Bruton o BTK, esplénica o SYK, ZAP70, quinasas de la familia Src y PI3K), que modulan la supervivencia y proliferación celular.

### 1.1.2. Marcadores pronósticos.

El curso clínico de la LLC es extremadamente variable y por tanto muy heterogéneo, algunos pacientes permanecen libres de síntomas y no precisan tratamiento durante mucho tiempo o nunca, mientras que otros rápidamente desarrollan síntomas, necesitando tratamiento al diagnóstico o poco tiempo después del mismo. Así pues, dada la gran heterogeneidad del curso de la LLC se desarrolló una clasificación de los pacientes para facilitar el manejo clínico y tratar de establecer el pronóstico mediante la aplicación de los sistemas de estadiaje clínico de Rai y de Binet (Binet et al., 1981; Rai et al., 1975)

#### 1.1.2.1. Sistemas de clasificación Rai y Binet

El sistema de clasificación de Rai contempla 5 estadios (0-IV) en el que podemos estratificar, en orden creciente el riesgo según diferentes parámetros como son: la linfocitosis ( $>15 \times 10^9$  linfocitos/L), la anemia medida por la hemoglobina en sangre periférica ( $<110$  g/L), la trombocitopenia ( $<100 \times 10^9$  plaquetas/L), y la presencia o ausencia de linfadenopatía, hepato y/o esplenomegalia (Binet et al., 1981; Rai et al., 1975) (Tabla 1). Por otro lado, el sistema de Binet distingue tres estadios clínicos (A, B y C) en función del número de áreas con infiltración linfoide y la presencia o ausencia de linfocitosis y/o trombocitopenia (Binet et al., 1981) (Tabla 1).

La integración de ambos sistemas de clasificación, se aplican para definir el pronóstico y necesidad de tratamiento y gracias a su integración, se utiliza para definir de forma simplificada el riesgo de los pacientes con LLC en 3 grupos de riesgo: bajo (Rai 0, Binet A), intermedio (Rai I/II, Binet B) y alto (Rai III/IV, Binet C).

Riesgo	SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE RAI		SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE BINET		Mediana supervivencia en años
	Estadio	Parámetros	Estadio	Parámetros	
Bajo	0	Linfocitosis en SP o MO, sin linfadenopatía hepatoesplenomegalia, anemia ( $Hb > 11$ g/dL) o trombocitopenia ( $>100 \times 10^3 / \mu L$ )	A	Una o dos áreas ganglionares afectadas, sin anemia ni trombocitopenia	>10
Intermedio	I	Linfocitosis en SP o MO, con linfadenopatía, sin hepatoesplenomegalia, anemia ( $Hb > 11$ g/dL) o trombocitopenia ( $>100 \times 10^3 / \mu L$ )	B	Más de tres áreas ganglionares afectadas, sin anemia ni trombocitopenia	7
	II	Linfocitosis en SP o MO, con hepatomegalia o esplenomegalia, con/sin linfadenopatía, anemia			

Alto		(Hb>11 g/dL), sin trombocitopenia (>100 x 10 <sup>3</sup> / μ L)			
	III	Linfocitosis en SP o MO, con anemia (Hb< 11 g/dL), con/sin linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, y sin trombocitopenia (<100 x 10 <sup>3</sup> / μ L)	C	Presencia de anemia (Hb< 10 g/dL) y trombocitopenia (<100 x 10 <sup>3</sup> / μ L)	1-4
	IV	Linfocitosis + trombocitopenia (<100 x 10 <sup>3</sup> / μ L)			

**Tabla 1 Clasificación de la LLC en base al sistema de estadios de Rai y Binet con su valor pronóstico.** SP: sangre periférica, MO: médula ósea, Hb: hemoglobina en SP

### 1.1.3. Marcadores moleculares /genéticos

La clasificación de Rai y Binet ayuda a estadificar a los pacientes de acuerdo al riesgo de la enfermedad, aunque hay ciertas limitaciones como puede ser en las etapas más tempranas de la enfermedad o en la respuesta al tratamiento y la predicción de la supervivencia, de modo que hay parámetros biológicos que han sido investigados y descritos como marcadores de mal pronóstico, como es el caso de las alteraciones citogenéticas (deleción 17p, deleción 11q, trisomía 12, deleción 13q), altos niveles de β2-microglobulina (β2M) y de timidín-quinasa (TK) en suero (Hallek et al., 1999) , la expresión de CD38, el estado no mutado de los genes codificantes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (genes *IGHV*), la expresión de ZAP-70 y la subunidad α4 de la integrina VLA-4 (CD49d) (Amaya-Chanaga & Rassenti, 2016; Parikh & Shanafelt, 2016; Rossi et al., 2017).

Hay otros marcadores séricos como pueden ser LPL lipasa lipoproteica, y la expresión de CD23 soluble que se asocian con la infiltración medular de tipo difuso. Pero tanto CD23s, TK y β2-M pueden predecir la supervivencia libre de progresión o la supervivencia global de los pacientes con LLC (Hallek et al., 1999). La β2-microglobulina sérica es una proteína extracelular, altas concentraciones se han asociado con etapas clínicas avanzadas, con elevada carga tumoral y expresión de CD38 y ZAP70. TK es una enzima de la ruta de síntesis del DNA, elevadas concentraciones se correlacionan con etapas clínicas avanzadas y progresión de la enfermedad. CD23 se ha asociado con infiltración medular tipo difuso y mayor carga tumoral. Estos marcadores séricos en la valoración del curso de la LLC son limitantes ya que dependen de las mediciones realizadas entre los laboratorios.

### 1.1.3.1. Alteraciones citogenéticas

Las alteraciones genéticas han sido muy útiles para determinar el curso de la enfermedad, pero al contrario que en otros síndromes linfoproliferativos, en la LLC no hay una alteración genómica específica responsable de la patogénesis. Estas alteraciones son detectadas en más del 80% de los pacientes de LLC (Döhner et al., 2000; Malek, 2013; Stilgenbauer et al., 1999) y tienen un papel importante en el rol de la patogénesis de la enfermedad actuando como marcadores pronósticos. La hibridación in situ fluorescente (FISH) es el método estándar en la detección de las alteraciones cromosómicas en LLC. No obstante, recientemente con los métodos de secuenciación masiva (NGS) se han revelado un gran número de mutaciones génicas en LLC que permiten redefinir nuevos subgrupos pronósticos.

Las alteraciones genéticas más frecuentes son la deleción 13q14 (55%), la trisomía 12 (16%), la deleción de 11q22-q23 (15%) y la deleción de 17p13 (7%). Hay otras aberraciones estructurales no tan frecuentes en esta enfermedad pero que dotan de significado pronóstico como son la presencia de traslocaciones no balanceadas y cariotipos complejos.

La **deleción 13q14**: es la alteración genética más frecuente en la LLC y se observa en el 65% de los casos al diagnóstico y puede estar asociada a un pronóstico favorable con una mayor supervivencia de los pacientes, aunque está asociada a la pérdida de miRNA 15a y 16-1, que tienen un papel relevante como reguladores negativos de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Calin & Croce, 2006), que se encuentra sobre expresada en las células de la LLC, de modo que con la deleción aumenta el nivel de expresión de Bcl-2 (Cimmino et al., 2005). Puede ocurrir tanto de forma monoalélica como bialélica. Los pacientes que poseen la del(13q) tienen un curso clínico de la enfermedad favorable con un tiempo de supervivencia más largo que los pacientes con un cariotipo normal (Döhner et al., 2000). Además, hay gran variabilidad clínica dentro de los pacientes con del(13q) de modo que se pueden dividir en dos grupos pronósticos en función del porcentaje de células con del(13q), aquellos con más del 80% de células que poseen del(13q) tienen una supervivencia media menor que aquellos que tienen menos del 80% (Dewald et al., 2003; Döhner et al., 2000; Hernández et al., 2009; Shanafelt et al., 2006).

La **trisomía 12** es una de las aberraciones consideradas como recurrente, siendo un factor pronóstico de riesgo intermedio en la LLC. La trisomía 12 se puede asociar con mutaciones de *NOTCH1* con un pronóstico menos favorable y se detecta en el 14-20% de pacientes al diagnóstico (Döhner et al., 2000).

La **deleción en 11q22-q23** afecta al gen *ATM* en la gran mayoría de los casos. *ATM* es un gen controlador de las vías de señalización del ciclo celular que es necesario en la respuesta ante el daño celular y para la estabilidad genómica. Esta deleción está asociada con una rápida progresión y se detecta en el 10-15% de los casos (Austen et al., 2007; Döhner et al., 2000)

La **deleción de 17p13** se encuentra en el 5-8% de los pacientes al diagnóstico y en hasta el 35-50% en pacientes en recaída o refractariedad al tratamiento y afecta al gen *TP53*. Este gen codifica una proteína que actúa como supresora de tumores, en respuesta ante diversos estímulos de estrés celular y está implicada en la inducción de apoptosis, senescencia,

reparación de DNA o cambios en el metabolismo y en la LLC se asocia con mal pronóstico y supervivencia reducida. Adicionalmente, la incidencia de mutaciones de *TP53* en el alelo restante es mayor en aquellos casos con del17p, y corresponde con el 90% de los casos (Döhner et al., 2000)(Dicker et al., 2009; Zenz et al., 2008).

Además de estas alteraciones genéticas recurrentes detectadas por FISH, el estudio cromosómico revela la presencia de un cariotipo complejo (presencia de al menos 3 anormalidades numéricas y/o estructurales detectables) en el 24-35% de los casos (Baliakas et al., 2014, 2019) y representa un factor predictivo de respuesta pobre al tratamiento y supervivencia corta en muchos casos.

### 1.1.3.2. Estado mutacional de IgHV

El estado mutacional de los genes codificantes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (genes *IGHV*) es el primer marcador biológico que puede predecir significativamente el pronóstico de la enfermedad permitiendo clasificar a los pacientes en dos grupos de pronóstico diferencial: *IGHV* no mutado y *IGHV* mutado. Las mutaciones en los genes *IGHV* son resultado de la hipermutación somática de los linfocitos B normales como consecuencia de una mayor afinidad de los anticuerpos por los antígenos con un posterior reconocimiento antigénico que podría desencadenar la patología (Zenz, Mertens, et al., 2010). Este estado mutacional de *IGHV* permanece constante a lo largo del tiempo (Kröber et al., 2002). La prevalencia de los genes *IGHV* mutados, definidos como aquellos que presentan menos del 98% de identidad comparada con la secuencia de nucleótidos de la línea germinal, es mayor entre los nuevos casos diagnosticados de LLC y en los pacientes asintomáticos (~60%) mientras que la prevalencia de los genes *IGHV* no mutados, que son aquellos que presentan más del 98% de identidad respecto a la secuencia nucleotídica de la línea germinal, es mayor entre los pacientes en los que progresa la enfermedad (~50%-60%) y en aquellos pacientes en recaída/refractarios (~70-80%) (Gaidano & Rossi, 2017). De manera que los que presentan mutaciones en *IGHV* tienen una evolución mejor que aquellos que no tienen estas mutaciones en *IGHV*. Además, estos casos con *IGHV* no mutado se han asociado con una alta expresión de ZAP70, CD38 y con alteraciones genéticas desfavorables como las deleciones 11q y 17p (Hamblin et al., 1999).

Además, cabe destacar la presencia en la LLC de receptores estereotipados, con alta homología en la secuencia amioacídica de la región determinante de la complementariedad en las inmunoglobulinas, HCDR3. En función de qué receptor estereotipado se exprese tendrá diferencias en la evolución de la enfermedad puesto que se ha descrito que los receptores que pertenecen al grupo estereotipado 2 (*IGHV3-21*) poseen un peor pronóstico incluso en aquellos casos en los que presenten *IGHV-M*, es decir, *IGHV3-21* se ha asociado con un curso clínico más agresivo de la enfermedad con independencia del estado mutacional (Baliakas et al., 2015; Stamatopoulos et al., 2007) y también cabe destacar aquellos que presentan el grupo estereotipado 8 (*IGHV4-39*) se ha relacionado con la transformación al síndrome Richter. Estos receptores estereotipados son más frecuentes en los casos de LLC que no poseen mutaciones somáticas en *IGHV* (Stamatopoulos et al., 2007).

### 1.1.3.3. Expresión de CD38

**CD38** es una proteína transmembrana que puede funcionar como una ecto-enzima que sintetiza componentes determinados en la regulación de los niveles de calcio intracitoplasmáticos o como receptor del ligando CD31 que está involucrada en los procesos de adhesión, proliferación y supervivencia celular en LLC (Damle et al., 1999; Deaglio et al., 2005; Malavasi et al., 2008). Su expresión es dinámica y cambia en respuesta al contacto con linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Brachtl et al., 2014). Así pues, puede actuar como una enzima o como un receptor en función del microambiente. En LLC, la expresión de CD38 se asocia con varios factores pronósticos adversos como el estado avanzado de la enfermedad, alta incidencia de linfadenopatías, hepatomegalia, alteraciones citogenéticas de alto riesgo, elevada  $\beta$ 2M, un espacio de tiempo corto desde el diagnóstico al inicio del primer tratamiento, una respuesta pobre a la terapia y supervivencia corta (D'Arena et al., 2001; Hamblin et al., 2002). Además, se ha visto que la alta expresión de CD38 en LLC sería un pronóstico independiente de las mutaciones de los genes IGHV, pero se correlaciona con una enfermedad más agresiva (más de un 30%) (Hamblin et al., 2002).

### 1.1.3.4. Expresión de ZAP70

**ZAP70** es una quinasa que pertenece a la familia Scr. Está implicada en procesos de activación, diferenciación y proliferación de los linfocitos T y también, en la estimulación del receptor de linfocitos T (TCR). Su expresión es constante durante el transcurso de la enfermedad, está asociada con el estado de IGHV no mutado y en general se correlaciona con menor supervivencia en los pacientes (Claus et al., 2014; Crespo et al., 2003; Rassenti et al., 2004; Wiestner et al., 2003).

### 1.1.3.5. Expresión de CD49d

**CD49d** es la subunidad  $\alpha$ 4 que forma parte del heterodímero de la integrina  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (VLA-4) tratándose de un receptor de membrana que promueve las interacciones con el microambiente de las células de LLC (Burger, 2012; Zucchetto et al., 2006, 2012). Es una molécula de adhesión que tiene un importante rol en el tráfico celular entre las células sanguíneas y los órganos linfoides, además se ha visto que participa en la proliferación y supervivencia de los linfocitos B dentro de los órganos linfoides al actuar como un receptor de unión célula-matriz o célula-célula a través de los ligandos VCAM-1 y la fibronectina Brachtl et al., 2014).

Esta molécula favorecería la supervivencia celular de la LLC, así pues, un alto nivel de expresión de CD49d está asociado con un curso clínico más agresivo y peor pronóstico de la enfermedad. Se ha visto que la expresión de CD49d, siendo mayor del 30%, se correlaciona con una supervivencia peor en cohortes de pacientes tratados con quimio-inmunoterapia y con lbrutinib (Bulian et al., 2014; Tissino et al., 2018, 2020). Dado el papel que tiene en la interacción con el microambiente, la expresión alta de CD49d, podría contrarrestar el efecto de la

redistribución de las células leucémicas del compartimento linfoide a la sangre periférica tras la administración de inhibidores de BCR, de tal manera que tras la administración de Ibrutinib disminuye el número de linfocitos absolutos en sangre y se reduce la masa de los ganglios linfáticos (Tissino et al., 2020). Así, podría tratarse de un prometedor biomarcador predictivo bajo la terapia con Ibrutinib, al ser capaz de inhibir el tráfico celular derivado de la activación de la ruta canónica del BCR.

### 1.1.3.6. Mutaciones genéticas

Gracias a las nuevas técnicas de estudio se ha podido identificar la presencia de mutaciones en genes implicados en la patogénesis de la LLC como es el caso de *TP53*, *ATM*, *NOTCH1*, *BIRC3*, *SF3B1* y *MYD88*.

***TP53*** se trata de un gen supresor de tumores que es el responsable de mantener la estabilidad y la integridad del genoma. Se activa tras la ruptura de la doble hebra del DNA e induce la apoptosis celular y/o detención del ciclo celular. Este gen se localiza en el cromosoma 17p13.1. Se encuentran en un 10% de los pacientes sin del17p, pero en más del 80% de los casos que presentan la del17p monoalélica y mutación del segundo alelo de *TP53* (Rossi et al., 2014; Zenz, Eichhorst, et al., 2010). La implicación pronóstica de la desregulación de *TP53*, está asociada a la resistencia a agentes que causen daño en el DNA como la quimioterapia o radioterapia, y la presencia de esta lesión genética está asociada con una disminución del tiempo hasta el primer tratamiento y una supervivencia global desfavorable. Así la inactivación de *TP53* es determinante en la toma de decisiones terapéuticas.

***ATM*** es una proteína activada por la rotura de la doble hebra del DNA y fosforila varias proteínas que inician la vía de control del daño en el DNA, llevando a parada del ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis (Campregher & Hamerschlag, 2014). El gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (11q22-23) y codifica para una proteína que pertenece a la superfamilia de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Las mutaciones en *ATM* pueden ser sustituciones *nonsense* o *missense*, deleciones o inserciones *in-frame* o *frameshit* y pueden causar falta de la función de la proteína *ATM* que afecta al pronóstico de los pacientes (Austen et al., 2007; Guarini et al., 2012). Las mutaciones de *ATM* están presentes en 25% de pacientes con LLC al diagnóstico y están asociadas con los genes de *IGHV* no mutados, la expresión de ZAP-70 y del(11q) Austen et al., 2007; Lozano-Santos et al., 2017). Hay estudios que revelan que deleciones de 11q22-q23 están relacionadas con una mayor quimio-refratariedad (Rossi & Gaidano, 2012).

***NOTCH1*** es una proteína transmembrana codificada por el gen *NOTCH1* localizado en el cromosoma 9q34.3, y está involucrado en la regulación del desarrollo celular hematopoyético (Suresh & Irvine, 2015). En la LLC está expresada de manera constitutiva y la mayoría de las mutaciones afectan al dominio PEST intracelular resultando en una degradación menor con la consecuente acumulación (Rosati et al., 2009). Las mutaciones en *NOTCH1* se caracterizan por ser deleciones *frameshit* en la región C-terminal (exón 34), siendo la mutación c.7541\_7542delCT la más frecuente. Esta mutación genera una isoforma estable, activa y truncada de la proteína *NOTCH1* que se acumula debido a la degradación defectuosa que

conduce a la activación constitutiva de la vía *NOTCH1* (Willander et al., 2013). Las mutaciones en el gen de *NOTCH1* ocurren entre el 4-10% de los pacientes al diagnóstico, 20% en pacientes con LLC refractarios a fludarabina, y en el 30% aproximadamente en pacientes con síndrome de Richter (RS) (Fabbri et al., 2011; Rossi, Rasi, et al., 2012) y se asocian a marcadores como *IGHV* no mutado, alta expresión de ZAP-70, CD38 positivo y trisomía 12 (Landau et al., 2015; Puente et al., 2011; Rosati et al., 2009).

Aquellos pacientes que presentan mutaciones en *NOTCH1* tienen un tiempo de respuesta al tratamiento menor desde el diagnóstico en estadios Binet B y C más avanzados en comparación con los *NOTCH1* en línea germinal. Esto podría deberse a que las mutaciones en *NOTCH1* están asociadas a otros marcadores de mal pronóstico como por ejemplo *IGHV* no mutado, alta expresión de ZAP-70, CD38 +, y trisomía 12. Además, hay estudios que sugieren que *NOTCH1* en la agresividad de la enfermedad tiene el mismo impacto que *TP53*, mientras que otros proponen que el impacto es menor e independiente de *TP53*, no obstante, en una comparación de varios marcadores pronósticos con *NOTCH1*, *SF3B1*, demostraron que las mutaciones de *TP53*, así como el estado mutacional de *IGHV* son los factores más importantes seguidos de *NOTCH1* (Nadeu et al., 2016).

***SF3B1*** se encuentra en la región del cromosoma 2q33.1 y codifica para la subunidad 1 de la proteína *SF3B1* del factor 3b de splicing, una ribonucleoproteína nuclear que trabaja en conjunto con otras ribonucleoproteínas para crear el spliceosoma responsable del splicing del RNA mensajero. Las mutaciones de *SF3B1* resultan de mutaciones *missense*, o menos frecuente de deleciones *in-frame*, siendo los codones Lys666, Lys700 y Gly742 los más mutados (Rossi et al., 2011; Wang et al., 2011). Las mutaciones en *SF3B1* pueden encontrarse en el 10% de los pacientes de LLC al diagnóstico y en un 17% en los pacientes refractarios a fludarabina. Hay estudios que muestran que solo el 6% de los pacientes con Síndrome Richter presentan mutaciones en *SF3B1* y juega un papel menor en la agresividad de la enfermedad (Rossi et al., 2011).

***BIRC3*** se encuentra en la región 11q22.2 y corresponde con 6Mb del gen *ATM*. Se trata de un gen de supresión tumoral, que codifica para las proteínas principales que regulan negativamente a la quinasa MAP3K14, que es una proteína canónica en la vía de señalización de NF- $\kappa$ B (no canónica). Las mutaciones de *BIRC3* al diagnóstico son poco frecuentes, menos del 4%, pero se encuentra presente en numerosos pacientes refractarios (Rossi, Fangazio, et al., 2012).

El gen ***MYD88*** se localiza en el brazo corto (p) del cromosoma 3 en la posición 22 (3p22) y codifica para una proteína citosólica adaptadora que juega un papel en la respuesta inmunitaria adaptativa e innata. Esta proteína funciona como un transductor esencial de la señal en la vía de señalización del receptor Toll-like (TLR) y en la interleuquina 1 (IL-1). Esta vía regula la activación de numerosos genes proinflamatorios (Rawlings et al., 2012). Las mutaciones en el gen de *MYD88* se encuentran en baja frecuencia (3%-5%), y en contraste con las mutaciones en los genes de *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53* y *ATM*, los pacientes con mutaciones en *MYD88* tienen resultados favorables. Estas mutaciones están asociadas con mutaciones en los genes *IGHV*, bajos niveles de ZAP-70 y expresión de CD38, y niveles normales de  $\beta$ 2M. Es más frecuente encontrarlo en pacientes jóvenes (edad media 47 años) independientemente del estado clínico.

Además, el tiempo para el siguiente tratamiento es significativamente más largo en pacientes con mutaciones en *MYD88* (Martínez-Trillos et al., 2014).

MARCADOR	ESTADO	PRONÓSTICO
Estado mutacional de los genes IGHV	Mutado	Favorable
	No mutado	Desfavorable
Anomalías citogenéticas	del17p13 [TP53]	Desfavorable
	del11q23 [ATM]	Desfavorable
	Trisomía 12	Favorable
	del13q14 [miR-15a, miR-16-1]	Favorable
Mutaciones en los genes <i>TP53, ATM, NOTCH1, SF3B1, BIRC3</i>	Mutado	Desfavorable
	No mutado	Favorable
Expresión de ZAP-70	Positiva (> 20%*)	Desfavorable
	Negativa (< 20%*)	Favorable
Expresión de CD38	Positiva (> 30%*)	Desfavorable
	Negativa (< 30%*)	Favorable
Expresión de $\alpha 4$	Positiva (> 30%*)	Desfavorable
	Negativa (< 30%*)	Favorable

**Tabla 2.** Principales marcadores pronósticos en LLC.

## 1.2. MICROAMBIENTE

El microambiente celular es un conjunto de células que trabajan de manera conjunta a través del contacto célula-célula y gracias a los factores solubles dotan al compartimento celular donde residen, de un ambiente proclive para la supervivencia celular.

De tal manera que el microambiente tumoral favorece el crecimiento y permite a las células neoplásicas evadir la apoptosis o al sistema inmune, teniendo un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, en la LLC las células se encuentran en fase G0 del ciclo celular y su supervivencia es debida a la resistencia frente a la apoptosis ya sea por las características genéticas intrínsecas como es el caso de las mutaciones de *TP53* o de *ATM* (Landau et al., 2015), o por los factores externos del microambiente que promueven la supervivencia y la proliferación.

Así pues, las células de LLC recirculan entre la sangre periférica, medula ósea y los tejidos linfoides secundarios (bazo y ganglios linfáticos). Se ha estudiado ampliamente que la médula ósea y los tejidos linfoides secundarios son nichos privilegiados, donde las células de LLC están protegidas, observándose que se acumulan *in vivo*, pero si se llega al cultivo de las mismas *in vitro*, sufren apoptosis espontánea, incluso en condiciones favorables para el crecimiento de otras líneas de células B humanas (Collins et al., 1989). Determinando así que el microambiente juega un papel crítico en la LLC.

Además, esta protección se ve en la formación de los pseudofolículos o centros de proliferación en los órganos linfoides secundarios, en los cuales es más común que las células de LLC expresen Ki-67 o posean una morfología parainmunoblástica o prolinfocítica, comparado con la población celular quiescente que circula por la sangre periférica (Ponzoni et al., 2011), representando entre el 1-2% del clon completo (Herishanu et al., 2011; Messmer et al., 2005).

Es en estos pseudofolículos donde las células de LLC reciben señales de supervivencia y proliferación celular (Hartmann et al., 2016; Herndon et al., 2017). La expansión y alta proliferación de los centros o pseudofolículos tienen una relación directa con un comportamiento más agresivo de la enfermedad (Cicone et al., 2012).

El *homing*, la retención o alojamiento en los tejidos está regulada estrechamente. De modo que las células se dirigen a los tejidos dependiendo de la interacción entre las quimioquinas, secretadas por las células del estroma dentro de los tejidos. Así, las quimioquinas atraen y retienen a las células LLC en los tejidos, gracias a los receptores correspondientes. Esto ocurre además gracias a la cooperación con distintas moléculas de adhesión en la superficie de las células de LLC y a sus ligandos en los tejidos (Hanahan & Weinberg, 2011).

Se ha observado que el perfil de expresión génica de las células recuperadas de los órganos linfoides, comparada con las que se encuentran en circulación en la sangre periférica es diferente, incluyendo la activación de genes implicados en la vía de señalización del receptor de células B (BCR) (Messmer et al., 2005).

De tal manera que tanto la médula ósea como los tejidos linfoides secundarios están formados por diferentes tipos celulares. Todas estas células forman un entramado celular del microambiente celular especializado, donde las células de LLC se expanden e interactúan con diferentes poblaciones existiendo una comunicación bidireccional, a través de una red de moléculas de adhesión, receptores de quimioquinas, miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) y factores solubles.

Así pues, este microambiente en la LLC está formado por varios **componentes celulares** como son los monocitos derivados de células tipo nodriza (*nurse like cells*, NLCs), las células estromales de médula ósea mesenquimales (*bone marrow mesenchymal stromal cells*, BMMSC), células foliculares dendríticas (FDCs), células endoteliales y linfocitos T y NK.

### 1.2.1. Tipos celulares o componentes implicados en el microambiente:

**Monocitos derivados de células tipo nodriza (NLCs)** son monocitos derivados de células similares a macrófagos asociados a tumores que encontramos en bazo y tejidos linfoides secundarios. Estas células derivan de monocitos, diferenciados espontáneamente *in vitro* tras el co-cultivo de células sanguíneas mononucleadas de LLC. En la LLC presentan activadas las vías de señalización del BCR y del factor nuclear kappa B (NF-κB). Son capaces de inducir la quimiotaxis y promueven la supervivencia celular de las células de LLC a través de la secreción de quimioquinas CXCL12 y CXCL13, y de la expresión de miembros de factores activadores de célula B de la familia de TNF (BAFF) y ligandos que inducen la proliferación (APRIL) (Burger, 2013;

Burger et al., 1999, 2000; Bürkle et al., 2007; Nishio et al., 2005). Además, las NLCs expresan antígenos que pueden activar el BCR de las células de la LLC como son la vimentina y la calreticulina (Binder et al., 2010), mientras que en la membrana las NLCs expresan CD31, ligando de CD38 expresado en las células de LLC.

No obstante, el componente principal y más abundante son las **células del estroma de medula ósea de origen mesenquimal (BMMSC)** (Kurtova et al., 2009). Se localizan en las zonas próximas a la vasculatura de la medula ósea (nicho vascular) o del endostio (nicho osteoblástico) (Sugiyama et al., 2006) y tienen un papel muy importante en la regulación de la hematopoyesis. Las encontramos en los tejidos linfoides secundarios y son capaces de proporcionar a las células de la LLC de señales que promueven la migración, proliferación y supervivencia celular de tal modo que se inhibe la apoptosis *in vitro* de las células de la LLC (Lagneaux et al., 1998) y de la apoptosis inducida por drogas (Kurtova et al., 2009; Lagneaux et al., 1998). Así pues, estas células estromales aportan un microambiente óptimo al generar nichos para el crecimiento y la supervivencia celular de las células B *in vitro*, ya que en co-cultivo y en contacto directo evitarían la entrada en apoptosis (Lagneaux et al., 1998), aunque también aportan un efecto protector ante condiciones de estrés producidas por agentes citotóxicos, protegiendo a las células leucémicas primarias de la apoptosis inducida por fármacos (Kurtova et al., 2009). De tal forma que llevaría a pensar que estos mecanismos protectores contribuirían de alguna manera a la enfermedad mínima residual y por tanto el entendimiento podría permitir el desarrollo de terapias capaces de erradicar completamente las células B malignas.

Las células estromales secretan de manera constitutiva quimioquinas, las cuales organizan el tráfico celular y el *homing* o la retención en los tejidos (Burger et al., 2009) y proporcionan señales adicionales que apoyan la supervivencia de las células de la LLC promoviendo la resistencia a los fármacos. Las células estromales inducen el aumento de los marcadores de la enfermedad más agresivos, incluyendo ZAP70 y CD38, así como la disminución del receptor CXCR4 (Purroy et al., 2015). Pero no solo las células de la LLC se benefician del contacto con el estroma de la medula ósea, sino que las células estromales se activan gracias al contacto con las células de la LLC e inducen la expresión de la proteína quinasa C beta II (PKC $\beta$ II) y la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Lutzny et al., 2013), lo que respalda la interacción bidireccional entre las células de LLC y las células del estroma. Y, por otra parte, las células estromales de los tejidos linfoides secundarios expresan constitutivamente quimioquinas como CXCL12 y CXCL13 que aportan señales para el correcto posicionamiento de las células B dentro de los compartimentos del ganglio linfático y también median la adhesión celular de la LLC a las BMMSCs a través de la unión de las integrinas  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 y  $\alpha$ L $\beta$ 2.

Además, hay otros tipos celulares en el microambiente de la LLC que incluyen las células dendríticas foliculares (FDCs) y las células endoteliales, que son esenciales para el *homing* o la retención en los tejidos.

La adhesión a las **células endoteliales** microvasculares promueve la supervivencia, activación y resistencia a fármacos (Badoux et al., 2011; Hamilton et al., 2012; Maffei et al., 2012), de tal forma que las células de los endotelios vasculares son otro componente muy importante para la supervivencia de las células LLC *in vitro* a través del contacto directo o gracias a los factores solubles que se llevan a cabo tras el contacto. Además, en la superficie de las

células endoteliales microvasculares se unen a las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (Maffei et al., 2012) y a través de CD40 con su ligando CD40L expresado en las células de LLC, se induce una mayor secreción de BAFF y APRIL por parte de las células del endotelio, las cuales promueven la viabilidad celular de la LLC incrementando la expresión de CD40L (Cols et al., 2012).

Otro componente son las **células dendríticas foliculares FDCs**. Al cultivar *in vitro* las células de LLC con FDCs y gracias al contacto directo de ambas se promueve el rescate de las células de LLC de la apoptosis inducida, dependiendo de la unión de CD44 en las células de LLC y el posterior aumento de MCL1, un miembro de la familia de proteínas antiapoptóticas de Bcl2 (Pedersen et al., 2002). También interacciona con otras proteínas de membrana, incluyendo CD38, CD49d, MMP9 y ZAP-70 (S. Zhang et al., 2013). Además, se ha descrito que la comunicación recíproca entre FDCs y células de CLL a través de la vía de señalización mediada por CXCR5-CXCL13 y el receptor linfotóxina beta (LT $\beta$ R)/linfotóxina alpha beta (LT $\alpha\beta$ ) es esencial para el posicionamiento de las células de LLC dentro de los folículos linfoides y para la progresión *in vivo* en el modelo de ratón E $\mu$ TCL1 de CLL (Heinig et al., 2014).

Hay otro tipo celular que forma parte de este entramado celular como son los **linfocitos T y NK**. La interacción entre las células B que expresan CD40 con su ligando CD40L en los linfocitos T activados CD4<sup>+</sup> es muy importante en la presentación de antígenos y en la inducción de respuesta de las células B normales (van Kooten & Banchereau, 2000). En la LLC, la mayoría de los linfocitos T circulantes tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> aumentan, aunque su funcionalidad está comprometida. Este aumento está asociado con un estadio más avanzado de la enfermedad y muestran marcadores de expresión de agotamiento incluyendo la proteína de muerte celular programada PD-1 (Brusa et al., 2013) por lo que las células de LLC en respuesta expresan altos niveles de su ligando PD-L1 (Brusa et al., 2013). A lo largo de los años, se ha descrito en varios estudios que las células NK tiene una función defectuosa en la LLC. La sobreexpresión de la molécula Human leukocyte antigen G (HLA-G) en el plasma de pacientes con LLC (Rizzo et al., 2014) induce la apoptosis de las células NK y altera la citotoxicidad mediada por las células NK. De tal manera que estos hallazgos indican que tanto los linfocitos T y NK poseen actividades reductoras efectoras, las cuales pueden explicar la evasión de la destrucción de las células de LLC por parte del sistema inmune.

El tráfico celular y el *homing* en el microambiente de los tejidos está altamente regulado, involucrando principalmente a los receptores de **quimioquinas y moléculas de adhesión** en las células de la LLC. La quimiotaxis de las estas células hacia las células estromales se ve favorecida gracias a la quimioquina CXCL12 o SDF-1 (stromal cell derived factor 1) secretada tanto por BMSCs como NLCs (Burger et al., 2000). Además, las células NLCs secretan la quimioquina CXCL13 (Bürkle et al., 2007), que atrae a las células gracias a la interacción con su receptor CXCR5. En la LLC se ha visto que hay una asociación entre altos niveles de CXCR4 con un riesgo mayor de infiltración de órganos linfoides y peor resultado de la enfermedad, así como una mayor capacidad de respuesta a la estimulación de BCR (Calissano et al., 2009; Coelho et al., 2013). La expresión de CXCR4 en la superficie es baja en los ganglios linfoides y medula ósea de pacientes con LLC, donde los niveles de CXCL12 sean altos. El CXCR4 está próximo a CD38 en la superficie de la célula de LLC, y actúa de manera sinérgica en la señalización con CXCR4 para favorecer la quimiotaxis hacia CXCL12 y el *homing* (Vaisitti et al., 2010).

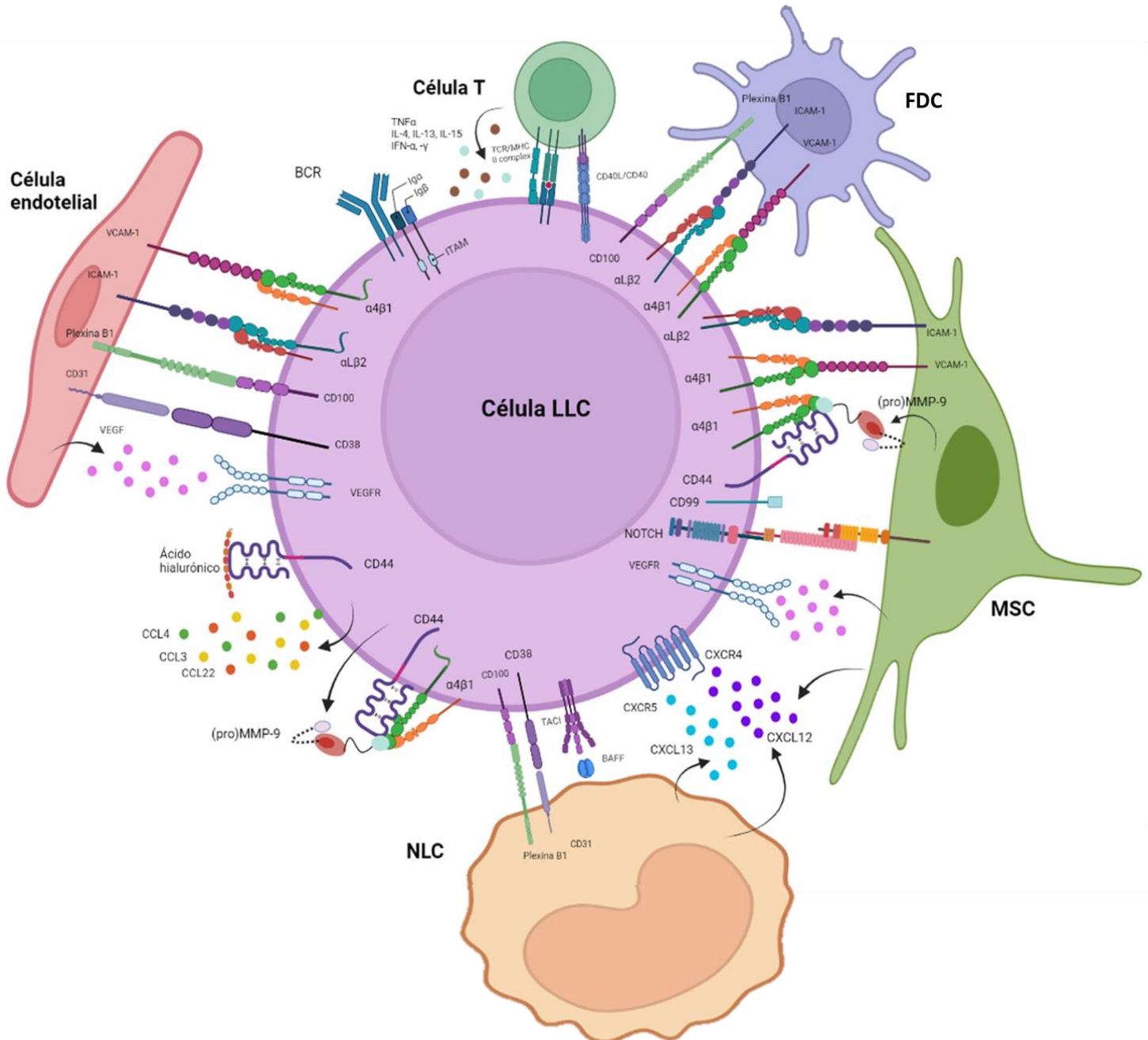
Las células de LLC que expresan altos niveles de ZAP70 (Richardson et al., 2006), CD38 y VLA-4 muestran una mayor quimiotaxis hacia CXCL12, y un mayor grado de extravasación en un modelo *in vitro* de migración (Walsby et al., 2014). La estimulación de CXCR4 está asociada con una mayor supervivencia celular *in vitro* (Burger et al., 2000) y una activación de las quinasas ERK y del factor de transcripción STAT-3. La integrina VLA-4 interacciona con la molécula de CD38 y está implicada en la adhesión de la célula LLC con el estroma y su expresión está asociada con una respuesta clínica menor (Burger et al., 2001; Gattei et al., 2008).

Además, las **quimioquinas** propiamente secretadas por parte de la célula de la LLC como son la CCL3, CCL4 y CCL22, añaden más complejidad en las interacciones al contribuir al reclutamiento de linfocitos T y monocitos o macrófagos a los sitios de interacción en los tejidos (Bystry et al., 2001). Las quimioquinas se unen a sus receptores, los cuales pertenecen a una familia de proteínas de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G receptores de superficie celular (GPCR). Después de la activación, los dominios intracelulares provocan la disociación de las proteínas-G, las cuales están compuestas de tres subunidades diferentes. Esto lleva a la formación de segundos mensajeros como el inositol trifosfato DAG, que conduce a la movilización del calcio citoplasmático y a la activación de múltiples cascadas de señalización como las vías de señalización de PI3K/AKT y ERK1/2.

No obstante, tanto los linfocitos B como T expresan en la membrana los receptores para estas quimioquinas, y su expresión y función se modula durante la diferenciación y activación linfocitaria (Butcher & Picker, 1996). Los linfocitos circulantes interactúan de forma transitoria y reversible con el endotelio vascular a través de moléculas de adhesión (selectinas, integrinas) en un proceso llamado *rolling o rodamiento*. Las citoquinas de la superficie luminal endotelial activan a los receptores de las células rodantes, que llevan a la activación de las integrinas (Springer, 1994), acabando así en la detención (*arrest*), la adhesión firme y la migración transendotelial a los tejidos, donde los gradientes de quimioquinas guían la localización y retención de las células (Campbell et al., 1998). Estos pasos son a los que nos referimos con "*homing*" y son esenciales para el desarrollo normal del organismo, organización y función del sistema inmune y el remplazo de los tejidos. Además, unos niveles altos de CCL3 y CCL4 en el plasma de pacientes de LLC están asociadas con una menor respuesta clínica.

Otro componente que conduce a la adhesión y migración celular son las **integrinas** y tienen un papel importante no solo en la migración-adhesión, sino que también en la sinapsis inmune y señalización, proliferación, supervivencia, angiogénesis y diferenciación celular (Cox et al., 2010; Schwartz et al., 1995). Una función importante de las integrinas es el control de la adhesión celular y la migración, ya que regulan el tráfico molecular y endocitosis, la transición epitelio mesenquimal, la polarización celular, el reordenamiento del citoesqueleto, la actividad y localización de las metaloproteasas y el papel entre las células neoplásicas y el microambiente que las rodea (Hamidi et al., 2016). Las integrinas son una superfamilia de glicoproteínas, que consisten de varias subunidades  $\alpha$  (de 1 a 11) y  $\beta$  (de 1 a 6), cuyas funciones son mediar la adhesión célula-célula y célula-matriz en varios tipos celulares. Son receptores heterodiméricos con dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , tienen un dominio extracelular, una región transmembrana y un tallo citoplasmático, asociado con componentes del citoesqueleto como actina, talina o tensina; y transductores de señal como FAK entre otros. Junto con las quimioquinas son de los mayores

grupos de proteínas involucradas en la adhesión celular. Uno de los más estudiados es la señalización entre VLA-4 y VCAM-1 y el eje CXCR4/CXCL12, con la consecuente activación de las vías del BCR, y la activación de la vía de NF $\kappa$ B y la consecuente expresión de genes proinflamatorios, creando un microambiente estromal pro-tumorigénico dependiente (Hamidi et al., 2016).



**Figura 1: Interacciones moleculares de la célula de LLC con las poblaciones celulares encontradas en el microambiente celular.** El contacto entre las células de LLC y FDCs (foliculares dendríticas), endoteliales, células T, NLCs, se establece y se mantiene por las diferentes moléculas de adhesión, y las interacciones entre los receptores y la secreción de moléculas solubles como las quimioquinas. Las interacciones moleculares entre células de LLC y células estromales y células T son importantes en el microambiente para la supervivencia, homing y proliferación. Las NLCs y MSC secretan CXCL12 y CXCL13 importantes para el homing en el microambiente de la médula ósea y los órganos linfoides secundarios. NLC secretan tanto CXCL13 como CXCL12 mientras que MSC secreta CXCL12. estas quimioquinas

atraen a las células de LLC por la unión de los receptores acoplados a proteínas G como son CXCR4 y CXCR5, altamente expresados en la superficie de la célula de LLC. Los receptores de las integrinas, en particular VLA-4 se expresa en la superficie de la célula de LLC coopera con los receptores de las quimioquinas al promover la retención en los tejidos debido al establecimiento del contacto celular con los ligandos como VCAM-1 y fibronectina por parte de las células estromales. Las células de LLC secretan CCL3, 4 y 22 que son quimio atrayentes de linfocitos T, permitiendo a las células T moverse por el microambiente y favorecer las señales de supervivencia para las células de LLC. Las células T interactúan con la célula de LLC al producirse la ligación con CD40L y con la secreción de IL-4. Las NLCs también favorecen las señales de supervivencia al expresar miembros de la familia TNF, BAFF y APRIL y mediante sus receptores expresados en la célula de la LLC. Además, la expresión en la LLC de CD38 permite la interacción con su receptor CD31 expresado en células estromales y NLCs. De esta ligación resulta la activación de ZAP70 y las vías de señalización. Ilustración generada con *Biorender*.

### 1.2.2. Microambiente tumoral en la LLC. Integración

Los linfocitos B clonales recirculan entre la sangre periférica y los tejidos, principalmente los tejidos linfoides secundarios, ganglios linfáticos y la medula ósea, donde reciben señales de proliferación y supervivencia. Estas interacciones son cruciales y ocurren de manera principal en los centros de proliferación de los ganglios linfáticos, que además de linfocitos B, contienen células foliculares dendríticas (FDC), linfocitos T y otras células estromales.

El *homing* de los linfocitos hacia y en el interior de los órganos secundarios linfoides no es estático, es un proceso altamente dinámico con los linfocitos en constante movimiento. De tal forma que las células malignas explotan el mecanismo fisiológico de migración de los linfocitos normales y de *homing* en los órganos secundarios linfoides para acceder a los nichos del microambiente celular. Desde la sangre entran en los tejidos secundarios linfoides donde se organizan en folículos de linfocitos B y zonas de linfocitos T. Dentro de los respectivos compartimentos, los linfocitos T y B continúan migrando para localizar el antígeno. Esta búsqueda y la consecuente migración de los linfocitos se debe en gran medida a los miembros de las quimioquinas.

Los linfocitos entran a través del endotelio por las vénulas endoteliales altas (HEV) a los órganos linfoides secundarios. Este proceso implica el rodamiento por las selectinas o integrinas, y la activación de las integrinas mediada por las quimioquinas y la adhesión mediada por las integrinas (Cyster et al., 1999, 2000). Para la entrada linfocitaria es muy importante la quimioquina CCL21 expresada por HEV (Gunn et al., 1998) y las quimioquinas CXCL12 y CXCL13 (Beck et al., 2014). Una vez atraviesan el endotelio hacia los órganos linfoides secundarios, las quimioquinas dirigen a los linfocitos hacia sus respectivas zonas. El *homing* de los linfocitos B en los folículos es dependiente del receptor CXCR5 expresado en la superficie, cuyo ligando es CXCL13 expresado por las células estromales dentro de los folículos (Allen & Cyster, 2008; Gunn et al., 1998). La migración de los linfocitos T depende de CCR7 y sus dos ligandos CCL19 y CCL21 (Gunn et al., 1998). Una vez en sus respectivas zonas, las quimioquinas ayudan a los linfocitos a detectar las células presentadoras de antígenos y poner en estrecho contacto los antígenos con otras células. Tras la activación con el antígeno, los linfocitos T y B sufren cambios en el posicionamiento en sus respectivas zonas. Estos cambios permiten las interacciones entre ambas en las zonas T y en el borde del folículo de las zonas B (Cyster et al., 1999).

Así, el microambiente tendría un papel muy importante en la patogénesis de la LLC ya que las células se acumulan rápidamente *in vivo* y al cultivarlas *in vitro* entran en apoptosis implicando que hay una resistencia a la apoptosis *in vivo* que recae sobre los factores externos que favorecen la supervivencia en vez de ser un factor intrínseco de la célula LLC por sí misma. De tal manera que indica que el microambiente es importante al prolongar la supervivencia celular de la LLC *in vivo*, aunque además se ha observado que el microambiente confiere un efecto protector bajo ciertas condiciones como agentes terapéuticos. Además, la LLC permanece como una enfermedad incurable ya que muchos de los pacientes progresan a partir de la enfermedad residual tras tratamiento erradicador; y hay evidencia de que el microambiente albergaría células malignas que evitan los efectos citotóxicos de la quimioterapia, actuando de manera similar a un reservorio a través del cual podría ocurrir la recaída. La mayoría de las células circulantes se encuentran en G0 o fase inicial de G1 del ciclo celular, y la proliferación celular ocurre en los compartimentos especializados conocidos como pseudofolículos siendo clústeres de células CD19+ pero conteniendo otras células tumorales, siendo áreas de interacción entre las diferentes poblaciones.

Los componentes principales, como ya hemos detallado, junto con los diferentes factores solubles forman parte de este microambiente en el cual las células de LLC por ellas mismas secretan citoquinas y son capaces de participar en la atracción de las células accesorias protectoras, cuya interacción es compleja involucrando distintas vías de señalización, tipos celulares y factores solubles.

Los linfocitos de la LLC circulantes en sangre son capaces de entrar en sus nichos protectores, al modificar los mecanismos en el microambiente, para favorecer el *homing*. Debido a las señales quimiotácticas que son enviadas por las células estromales de la médula ósea y de los órganos linfoides secundarios, los cuales atraen a las células hacia el microambiente. Las células de LLC expresan receptores CXCR4 y CXCR5 de las quimioquinas CXCL12 y CXCL13, respectivamente, al igual que los linfocitos B y T en sujetos normales (Burger et al., 2009), estas quimioquinas son liberadas por una gran variedad de células estromales dentro del microambiente. En función de los gradientes de quimioquinas las células de LLC migran dirigiéndose fuera de la sangre hacia el interior del microambiente protector, de tal forma que un nivel mayor de los receptores de quimioquinas indicaría que la célula pasaría de la sangre hacia los tejidos mientras que unos niveles bajos en la superficie pueden indicar que las células que estaban en ese microambiente pasarán a la sangre hasta que recobren la expresión de ese receptor y se preparen para volver a entrar (Calissano et al., 2009; Coelho et al., 2013).

Las células tumorales en los centros de proliferación aumentan la expresión aguas abajo de la señalización del BCR, la activación de NFκ, citoquinas y proteínas antiapoptóticas y marcadores relacionados con la proliferación. Las diferentes rutas de señalización desencadenadas por la interacción de las células de la LLC con los diferentes tipos celulares que forman parte del estroma, formarían parte de un entramado celular que permite tanto el establecimiento de la enfermedad como la progresión de la misma, de modo que para intentar bloquear las interacciones o bloquear la señalización desencadenada por las mismas se han diseñado diferentes estrategias. De tal forma que la ruta del BCR es un punto clave del

microambiente de la LLC al ponerse en marcha con su estimulación, una cascada de señalización que conduce a la proliferación celular y consiguiente expansión del clon leucémico.

### 1.3. RECEPTOR DE LINFOCITOS B (BCR)

#### 1.3.1. Origen molecular. Ontogenia del linfocito B

A pesar de que hay cierta controversia en el establecimiento del fenotipo de las células B que se expande clonalmente para generar la célula de LLC, es importante conocerlo para comprender la evolución y el desarrollo de la enfermedad identificando las alteraciones que ocurren.

Hay múltiples líneas que sugieren que las alteraciones genéticas y epigenéticas que ocurren al inicio en la célula madre hematopoyética (HSCs) son las que dan lugar a la célula de la LLC. De tal manera que, los linfocitos B reconocen gran diversidad de antígenos diferentes generados por la interacción con el receptor de membrana (BCR) y por los procesos de recombinación genética V(D)J e hipermutación somática (SHM). Estos procesos se dan en dos etapas diferentes de la vida del linfocito B, así pues, a partir de una célula madre hematopoyética (HSC) se diferencian al progenitor linfoide común (CLP) que pasa al estadio pro-B donde tiene lugar la recombinación activa de los segmentos V(D)J, de tal forma que se forma la cadena pesada  $\mu$  teniendo lugar este proceso en la médula ósea.

Posteriormente en la siguiente etapa, en los tejidos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos, bazo y placas de Peyer, durante la formación del centro germinal como respuesta al contacto con el antígeno se produce la acumulación de cambios puntuales de las bases y el reordenamiento de las cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  en el estadio pre-B donde la célula comienza a dividirse aumentando la variedad de Igs pasando a un estadio de linfocito B inmaduro. Son células *naive* al no estar en contacto con antígenos y estar en estado G0 del ciclo celular. Las cadenas pesadas y ligeras se reordenan y se expresan en la superficie celular para dar lugar a un BCR maduro. Posteriormente, los linfocitos migran a los órganos linfoides secundarios donde son expuestos a antígenos en los centros germinales. Aquí los linfocitos B maduros sufren hipermutación somática para aumentar y diversificar el repertorio genético (Figura 2).

Durante el desarrollo y diferenciación normal de los linfocitos B hay una gran variedad de cambios en los genes de la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Así, la presencia o ausencia de mutaciones en los genes pueden influir en el entendimiento del origen celular de la LLC. Si hay una homología de más del 98% con la línea germinal se consideraría genes *IGHV* no mutados y si la homología con la línea germinal es menor del 98%, con una gran variedad, estos serían *IGHV* mutados. Estos genes contribuyen a las hipótesis del desarrollo tumoral: una de ellas postula que las mutaciones oncogénicas se inician en etapas tempranas y en etapas de diferenciación., sugiriendo que el subtipo *IGHV* mutado deriva de una célula del centro germinal (CG) tras la exposición a un antígeno al presentar un perfil de expresión genético similar a las células B memoria CD5+CD27+ (post-CG) y que derivan de la estimulación inmune T dependiente. En cambio, el subtipo *IGHV* no mutado parece originarse

de células previas al establecimiento de las mismas en el CG al presentar un perfil de expresión génica similar al de células CD5+CD27-, de manera que se propone que derivan de células B *naive* o de un linaje separado de los precursores de células B o de células B de memoria que no han pasado por el centro germinal (pre-GC) en la estimulación inmune T dependiente (Fabbri & Dalla-Favera, 2016).

Las alteraciones genéticas comunes en la LLC como tri(12), del(13q) y mutaciones de *SF3B1*, *NOTCH1*, y *XPO1* se han encontrado en progenitores hematopoyéticos de algunos pacientes (Damm et al., 2014; Gahn et al., 1997). Los mecanismos que dan lugar a estos cambios tempranos en la expansión clonal de las células maduras de la LLC no se conocen del todo, pero con la ayuda de ensayos inmunogenéticos del BCR indican que la selección antigénica tiene un papel muy importante (Agathangelidis et al., 2012; Stamatopoulos et al., 2017). Así, uno de los factores determinantes de la heterogeneidad de la LLC es el diferente origen celular de los 2 subtipos moleculares de la enfermedad en relación con el estado mutacional de *IGHV* (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999).

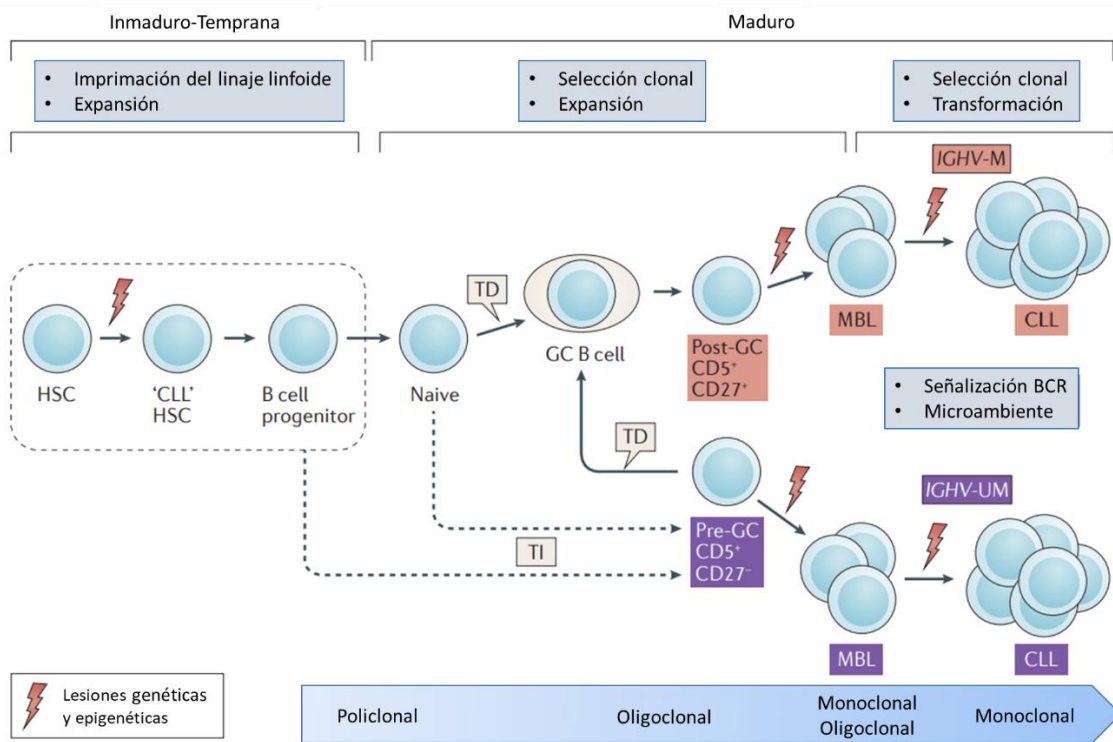


Figura 2. Desarrollo y ontogenia del linfocito B. Modificado de (Fabbri & Dalla-Favera, 2016).

### 1.3.2. BCR

El receptor de los linfocitos B es un complejo multimérico que juega un papel importante en la supervivencia celular en la LLC. Este receptor está conectado a una red de quinasas y fosfatasa que hacen que se amplifique su activación (Seda & Mraz, 2015; Stevenson et al., 2011). Cada célula B madura tiene un único sitio de unión al antígeno como resultado del reordenamiento de los segmentos de los genes IGH e IGL. La probabilidad de que dos clones independientes presenten el mismo BCR es extremadamente pequeña. Sin embargo, aproximadamente el 30% de los pacientes con LLC expresan BCR similares, si no idénticos, con características comunes (estereotipados) (Stamatopoulos et al., 2017) basado en la estructura similar de las regiones determinantes de la complejidad (CDR). Se han identificado hasta la fecha alrededor de 200 subconjuntos estereotipados diferentes, con 19 subconjuntos que representan el 10% de todas las LLCs.

De modo que sugiere que estas células son seleccionadas basándose en la estructura de los dominios de unión al antígeno de las Ig de superficie de membrana, debido al reconocimiento de antígenos similares que podrían estar asociados con la patogénesis de LLC. Los pacientes englobados bajo un subconjunto estereotipado del BCR tiene un curso clínico similar. Además, cabe destacar la relación entre el estado mutacional de los genes de la región variable de la cadena pesada (*IGHV*) ya que se ha visto que los pacientes con menos del 2% de mutaciones (*IGHV*-NM) presentan un BCR muy polirreactivo, una enfermedad más agresiva con biomarcadores pobres y la supervivencia más corta (Damle et al., 1999; Hamblin et al., 1999).

La continua señalización del BCR se traduce en la fosforilación de miembros intermediarios y vías secundarias como AKT, ERK y NF- $\kappa$ B (Stevenson et al., 2011). Esta señalización es debida al reconocimiento de antígenos o componentes del medio como DNA, células apoptóticas, la cadena pesada de la miosina citoesquelética (IIA) y LPS (Burger & Chiorazzi, 2013). Además, el receptor BCR es capaz de unirse a otros e inducir la señalización, lo cual es un rasgo peculiar observado solo en algunos BCR de células murinas B1 polirreactivas (Minden et al., 2012). Finalmente, la unión de BCR inicia la señalización por fosforilación de Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  por Lyn y otras quinasas de la familia de Src. Entonces Syk, BTK y PI3K se activan, modulando varias vías que afectan la supervivencia, la proliferación y migración de células CLL.

### 1.3.3. Señalización del BCR

El receptor BCR está formado por una inmunoglobulina de membrana, que normalmente se trata de IgM o IgD, y el heterodímero CD79a/CD79b que contienen colas citoplasmáticas con motivos de activación basados en inmunorreceptores de tirosina (ITAM). Además, el BCR está asociado a unas moléculas que actúan como correceptores regulando la señal, ya sea de forma positiva como CD21, CD19 o CD81 o de manera negativa, inhibiendo la señal con el receptor Fc de la IG (Fc $\gamma$ RIIB) y la molécula CD22 (Treanor, 2012; Yang & Reth, 2010).

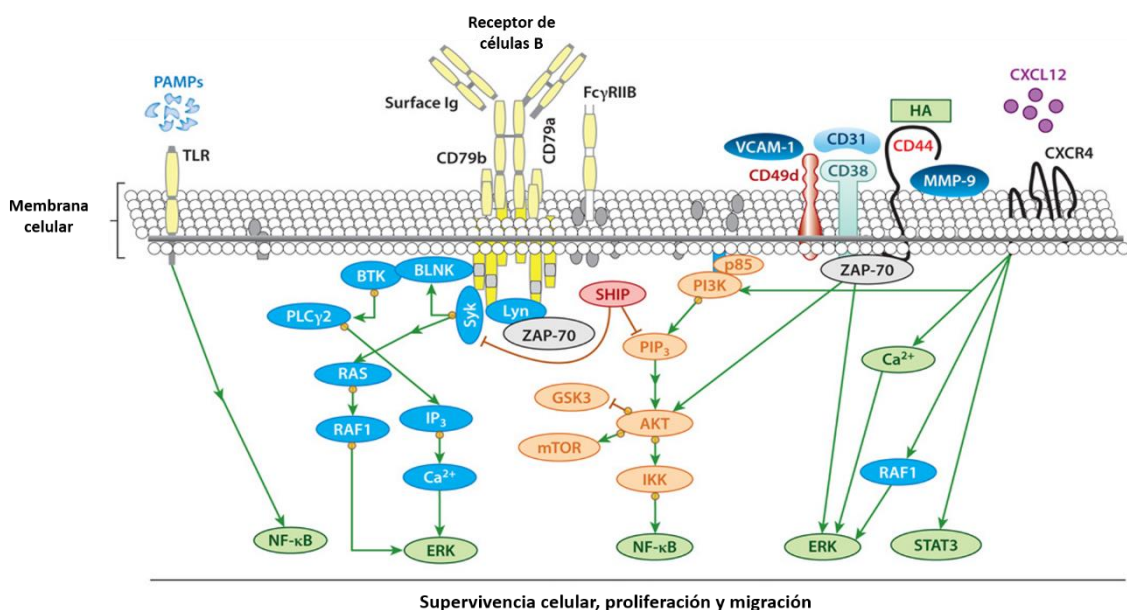
La estimulación del BCR activa un complejo molecular de diferentes elementos incluyendo la tirosina quinasa de Bruton (BTK), la fosfolipasa C $\gamma$ 2 (PLCG2) y la fosfatidilinositol 3-quinasa

(PI3K) que propagan la señal aguas abajo, promoviendo la supervivencia celular, proliferación, liberación de quimioquinas y el aumento de la migración celular.

De modo que los pasos iniciales en la respuesta a la activación del BCR son la fosforilación de los motivos ITAM de CD79 por las quinasas de la familia Src, como es el caso de Lyn, seguido del acoplamiento de Syk y la consecuente activación de diferentes componentes del signalosoma.

Syk se fosforila, se activa y recluta a la proteína adaptadora BLNK hacia el BCR y a la proteína BTK. BTK es la responsable de fosforilar a PLC $\gamma$ 2 que se activa y hace que el PIP2 se transforme (hidrolise) en diacilglicerol DAG y en inositol trifosfato 1,4,5 (IP3). Este IP3 es un segundo mensajero que regula los niveles de calcio intracelular, facilitando la salida del Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplasmático (RE) hacia el citoplasma, el cual activará a otras moléculas como la proteína quinasa C (PKC) y las proteínas MAP quinasas como JNK y p38 (Longo et al., 2008). Con esta movilización del calcio se activa el factor de transcripción NF $\kappa$ B y al factor de transcripción NFAT gracias a la vía de la calcineurina y calmodulina. Por otro lado, el DAG activa a la proteína quinasa C de los linfocitos B (PKC $\beta$ ) que induce la activación de varios miembros de la familia de las MAP quinasas como ERK, c-JUN, JNK y p38, y factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (Cuní et al., 2004) y NF-AT. Además de la actividad de PI3K se genera PIP3, un segundo mensajero que interacciona con BTK movilizándola hacia la membrana y con AKT. Para la activación de AKT se requiere su fosforilación en dos posiciones gracias a PDK1 y al complejo mTOR2, de modo que una vez fosforilada vuelve al citoplasma y es capaz de promover la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis, gracias a los factores de transcripción NFAT y FOXO que está unido a promotores de genes implicados en proliferación y supervivencia.

En este contexto del BCR, se han generado varias moléculas pequeñas inhibitoras de la ruta de señalización del BCR, teniendo como objetivo principal a las quinasas BTK, PI3K y Syk y han mostrado tener una excelente actividad clínica (Woyach et al., 2012) cambiando el panorama del tratamiento de los pacientes con LLC.



**Figura 3. Vías de señalización principales.** El BCR está compuesto por una inmunoglobulina unida a la membrana, unido a un resto de transducción de señales CD79 $\alpha$ /CD79 $\beta$ . Tanto CD79 $\alpha$  como CD79 $\beta$  contienen motivos de activación de tirosina de inmunorreceptores (ITAM) que se fosforilan cuando un antígeno se une a la inmunoglobulina. Esta fosforilación la lleva a cabo Lyn, y conduce al reclutamiento de Syk. La activación de Syk produce un complejo de señalización asociado a la membrana conocido como el signalosoma. El signalosoma consta de Syk, BTK, PLC $\gamma$ , PI3K y otras moléculas en la superficie de la membrana. La activación de PI3K requiere que el coactivador CD19 sea fosforilado por Lyn. El signalosoma coordina y regula los eventos celulares aguas abajo en la célula que llevan a la supervivencia, la migración, la proliferación y la apoptosis. Modificado de (S. Zhang & Kipps, 2013)

### 1.3.3.1. Tirosina quinasa de Bruton BTK

BTK es una tirosina quinasa de la familia de las quinasas Tec y tiene un papel importante en la señalización de BCR. El gen que codifica BTK se encuentra en el cromosoma X y fue descubierto en la agammaglobulinemia asociada al X (Vetrie et al., 1993). BTK se expresa en las células hematopoyéticas particularmente en las células B, pero no en T ni en células plasmáticas (Genevier et al., 1994).

BTK participa en la señalización de otros receptores relacionados con la migración y la adhesión, como los receptores de quimioquinas CXCR4 y CXCR5 y moléculas de adhesión (integrinas) (de Gorter et al., 2007; Ortolano et al., 2006; Spaargaren et al., 2003).

#### 1.3.3.1.1. Inhibidores de BTK

Ibrutinib, PCI-32765 es el primer inhibidor de BTK que se une de manera específica e irreversible al residuo de cisteína del dominio quinasa de BTK e inhibe su fosforilación y su actividad enzimática. Pero conforme se ha avanzado en el estudio de BTK se han diseñado nuevos agentes como son acalabrutinib y zanabrutinib

#### 1.3.3.1.2. Ibrutinib

Es un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) autorizado por la Agencia europea de medicamentos para el tratamiento de pacientes adultos con LLC en primera línea o que hayan recibido un tratamiento previo, independientemente del status de *TP53*, para aquellos casos en los que la inmunoterapia no se considere apropiada, linfoma de células del manto (LCM) refractario o en recidiva.

Se trata de la primera molécula pequeña disponible de manera oral que inhibe a BTK, se une covalentemente a la cisteína 481, localizada en el sitio activo de la enzima, de tal modo que previene su fosforilación y se produce una pérdida de la actividad quinasa (Honingberg et al. 2010) cuya concentración inhibitoria 50% de 0,5nM.

Este fármaco es capaz de superar las señales de supervivencia del microambiente in vitro, incluyendo aquellas generadas del contacto con NLCs ligación de CD40, BAFF, fibronectina (FN), IL-6, IL-4, TNF $\alpha$  y la estimulación del BCR. Ibrutinib inhibe la proliferación celular (Ponader

et al., 2012), la quimiotaxis hacia CXCL12 y CXCL13 (de Rooij et al., 2012; Ponader et al., 2012), la adhesión mediada por integrinas (de Rooij et al., 2012).

Ibrutinib se ha probado solo y en combinación con quimioterapia incluyendo rituximab o bendamustina y rituximab, o fludarabina ciclofosfamida y rituximab (Brown et al., 2015). Uno de los efectos esperables es la linfocitosis absoluta ( $\geq 50\%$  de incremento de la cifra basal de linfocitos con un valor al menos de  $>5.000$  linfocitos/ $\text{mm}^3$ ) cabe considerarla derivado de su mecanismo de acción ( $>70\%$  pacientes con LLC y alrededor del 30% de los pacientes con LCM). La linfocitosis asociada a Ibrutinib se ha estudiado en detalle recientemente (Woyach, Smucker, et al., 2014) demostrando que los pacientes que tienen una respuesta con linfocitosis tienen la misma supervivencia libre de progresión que aquellos con respuesta sin linfocitosis. La mediana a normalización de la linfocitosis asociada al Ibrutinib es de 6 meses (IC 95% 4 – 8 meses), aunque en algunos pacientes persiste  $>12$  meses. Esta linfocitosis representa la egresión de los linfocitos de los ganglios y no suponen una evolución clonal de los linfocitos. Con los tratamientos de inmunquimioterapia la obtención de una RC con negatividad de la enfermedad mínima residual (EMR) es importante para obtener una prolongada supervivencia libre de progresión. En el caso del Ibrutinib, la eliminación de la EMR o incluso linfocitosis evidente puede no ser necesaria para obtener una prolongada SLP dado el mecanismo de acción.

#### 1.3.3.1.3. Otros inhibidores de BTK, de última generación

Además de Ibrutinib se han llegado a identificar nuevas moléculas como son acalabrutinib (ACP-196) o zanabrutinib, siendo inhibidores de BTK de última generación que actualmente están siendo probados (Bond & Woyach, 2019; de Novellis et al., 2021).

Acalabrutinib (ACP-196) aprobado en 2018 para el tratamiento del linfoma de célula del manto, parece tener un mejor perfil de toxicidad que Ibrutinib debido a su mayor especificidad, y, por lo tanto, menos efectos off-target en otros receptores.

#### 1.3.3.2. PI3K

La fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) se describió inicialmente en asociación con polyoma middle T protein (Whitman et al., 1985). Esta enzima está implicada en diferentes procesos como son la diferenciación, supervivencia, proliferación y el metabolismo (Cuní et al., 2004). La activación del receptor BCR induce al reclutamiento de CD19 junto con PI3K a la membrana para así poder propagar amplificar la señalización.

PI3Ks están divididas en 3 clases de la I a la III, estando la clase I compuesta de 4 diferentes isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) que forman la subunidad catalítica y la subunidad reguladora formada por p85 y p101/55. La forma predominante en las células hematopoyéticas es la PI3K $\delta$ , que actúa en la homeostasis de la célula B.

El principal inhibidor de PI3K es Idelalisib, aunque hay otros dos inhibidores que están en desarrollo clínico avanzado como son Duvelisib (IPI-145) que se trata de un inhibidor dual de PI3K  $\gamma$  y  $\delta$ , y TGR-1202 que es un inhibidor de PI3K $\delta$  de última generación con reducida toxicidad

hepática y colitis comparadas con otros inhibidores de PI3K $\delta$  (Balakrishnan et al., 2015; Mato et al., 2018) .

#### 1.3.3.2.1. Idelalisib

Idelalisib (CAL-101, GS-1101) es el primer inhibidor oral competitivo de la isoforma PI3K $\delta$ , es capaz de bloquear la supervivencia y las señales de *homing* en la LLC incluyendo aquellas producidas por el BCR y por los receptores de quimioquinas CXCR4 y CXCR5 (Brown et al., 2014; Lannutti et al., 2010) .

#### 1.3.3.3. Bcl-2

Bcl-2 se trata de una proteína implicada en la apoptosis celular o muerte celular programada. Esta apoptosis es crítica para el correcto desarrollo y prevención de la tumorigénesis. El principal mecanismo de resistencia a la terapia es el escape de la apoptosis programada (Hanahan & Weinberg, 2011) . La apoptosis está formada por 2 vías: la extrínseca, iniciada por la ligación de receptores de muerte celular, y la intrínseca, en la cual hay señales intracelulares que controlan el balance de proteínas anti-apoptóticas, como son los miembros de la familia de Bcl-2, y proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak para iniciar la permeabilización de la membrana mitocondrial. Estas dos vías acaban en la activación de la familia de proteasas caspasas (Strasser et al., 2011). Así pues, en la LLC la supervivencia prolongada está asociada con una apoptosis defectuosa y señales mediadas por el microambiente como por ejemplo CD40L, BAFF, APRIL, CXCL12 y VCAM-1 que desencadenan en las vías de señalización de PI3K/AKT y NF- $\kappa$ B (Kipps et al., 2017).

De tal forma que, Bcl-2 es una proteína presente en la membrana externa mitocondrial que promueve la supervivencia celular por la unión de proteínas pro-apoptóticas. Los inhibidores de Bcl-2 actúan uniéndose a Bcl-2, desplazando a las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak y promoviendo la apoptosis derivada de mitocondrias a través de la liberación de moléculas como el citocromo C y las especies reactivas de oxígeno (Hockenbery et al., 1990) (Hockenbery et al. 1990). El secuestro de Bax y Bak puede llevarse a cabo por miembros de la familia de BH3 como Bim, Puma, Bid, Bad y Noxa al unirse y antagonizar con las proteínas de la familia de Bcl-2.

La expresión de Bcl-2 en el 90% de los pacientes con LLC es elevada, de manera que el tratamiento con el inhibidor de Bcl-2, venetoclax, ha sido una ganancia en la terapia de los pacientes previamente tratados ya sea en monoterapia o en combinación con rituximab.

#### 1.3.3.3.1. Venetoclax

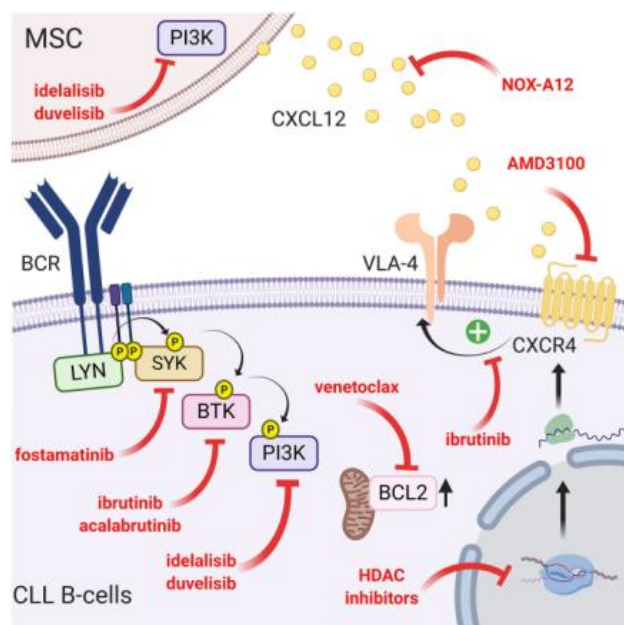
Venetoclax es una molécula diseñada para bloquear la actividad de supervivencia de Bcl-2 al emular al dominio BH3. Inhibe el crecimiento *in vivo* de los tumores dependientes de Bcl-2. Una sola dosis oral de venetoclax en 3 pacientes con LLC refractaria acaban en lisis tumoral en

el transcurso de 24 horas de tal forma que la administración escalada es recomendada para prevenir estos eventos.

### 1.3.3.4. Mutaciones en la vía del BCR

La señalización del BCR es muy importante en las células tumorales de LLC, ya que resulta en la actividad de las proteínas aguas abajo Syk, Lyn, BTK y PI3K (Woyach et al., 2012). Así, los inhibidores de BTK, Ibrutinib y acalabrutinib, inhiben la señalización intracelular aguas abajo que involucra a la fosfolipasa C (PLC $\gamma$ 2) y los inhibidores de PI3K como Idelalisib, actúan sobre un paso crítico de la fosforilación en la vía de señalización. No obstante, hay refractariedad a la inhibición de BTK, debido a la disminución en la respuesta tras cierto tiempo en tratamiento. Hay varias mutaciones puntuales en la ruta de señalización del BCR que se han identificado en los casos de refractariedad como son C481S en *BTK* que interrumpe la unión covalente entre Ibrutinib y BTK y también las mutaciones puntuales de PLC $\gamma$ 2 que interrumpe la señalización del BCR aguas abajo que incluyen 3 mutaciones como son R665W, L845F T S707Y asociadas con ganancia de función, permitiendo la señalización incluso cuando BTK está bloqueada. Estas mutaciones no se observan en pacientes que no han recibido tratamiento con Ibrutinib previamente y parecen que son seleccionadas durante la terapia (Woyach et al., 2017; Woyach, Furman, et al., 2014).

Las resistencias a venetoclax son debidas a las señales que proporciona al microambiente, promueven la expresión de Mcl-1 y Bcl-XL, reduciendo la eficiencia del fármaco, especialmente en tejidos linfoides secundarios (Bose et al., 2017). No obstante, la combinación con inhibidores de la vía de señalización del BCR como Ibrutinib llevan a un descenso en los niveles de la proteína Mcl-1 en las células de LLC, justificando de esta manera el mecanismo de la combinación con venetoclax.



**Figura 4. Señalización del BCR con las dianas terapéuticas diseñadas.** Representación de como los inhibidores del BCR potencialmente pueden tener varios objetivos al estar interconectadas las vías con el

BCR, pudiendo explicar cómo la estimulación del BCR resulta en un incremento de la migración y la adhesión. Modificado de (Ferrer & Montserrat, 2018).

#### 1.4. CD99

La molécula CD99 es una proteína transmembrana codificada por el gen MIC2 (Goodfellow et al., 1988). *CD99* se localiza en la región autosomal (PAR) del cromosoma Y (Yp11-Ypter) y X (Xp22.33-Xpter) (Aubrit et al., 1989; Banting et al., 1989). El gen de *CD99* codifica para dos proteínas distintas en función del procesamiento resultante del splicing alternativo que sufre la región citoplasmática: la forma wild-type o isoforma larga (CD99-L) con 185 aminoácidos (peso molecular de 32 kDa) y la isoforma truncada (CD99-S) con 161 aminoácidos (peso molecular de 21 kDa). El transcrito de la isoforma CD99-S contiene una inserción de 18pb entre los exones 8 y 9 que lleva a un codón stop en el marco de lectura (*in-frame*) y da como resultado un polipéptido truncado. La isoforma corta resultante tiene un dominio extracelular y dominio transmembrana similar a los de la isoforma larga pero varía en el dominio citoplasmático (Hahn et al., 1997) (Figura 5).

La proteína de CD99 es rica en residuos de prolina y tiene una organización típica de una proteína de membrana que comprende un dominio extracelular de 100 aminoácidos, un dominio transmembrana y un dominio C-terminal corto de 38 aminoácidos. Se ha visto que el dominio citoplasmático de la isoforma larga contiene dos sitios de fosforilación, una serina en el residuo del aminoácido 168 (S168) y una treonina en el residuo del aminoácido 181 (T181). Estos potenciales sitios de fosforilación pueden ser importantes para la señalización intracelular y para las interacciones moleculares extracelulares. De hecho, el residuo S168 de la isoforma larga de CD99 está asociado con ser un sitio para la fosforilación de PKC y se requiere para la función onco-supresora en las células de CD99 en osteosarcoma (Scotlandi et al., 2007)

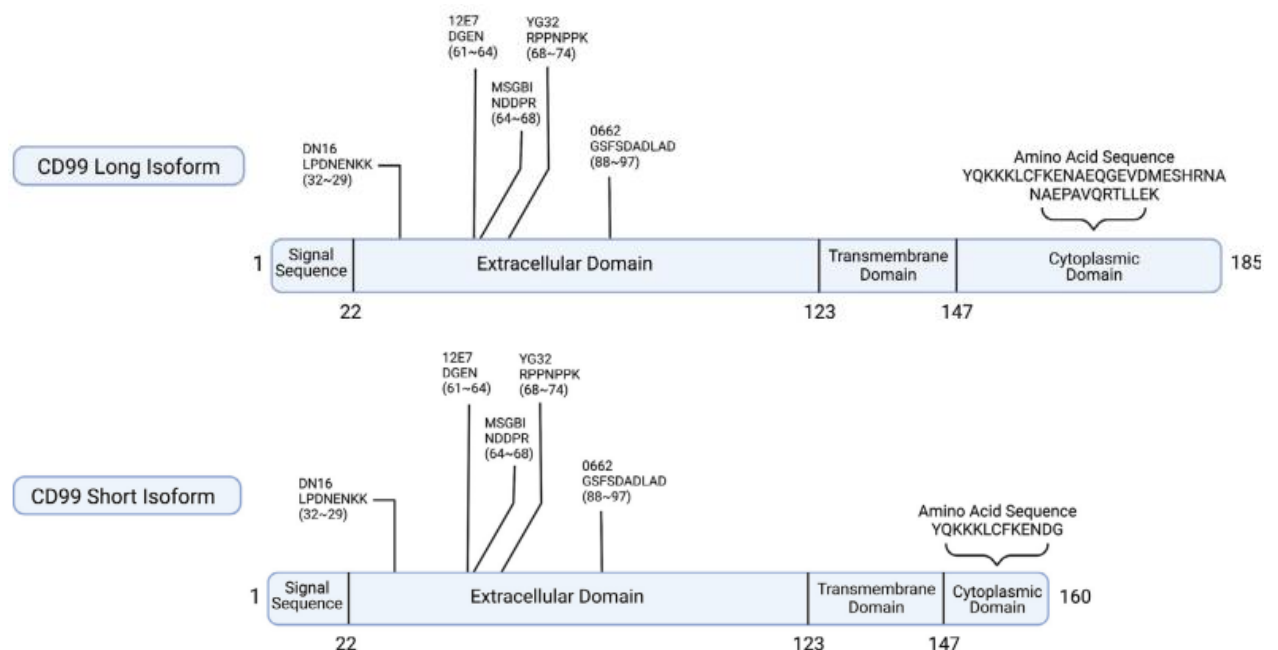


Figura 5. Estructura de las dos isoformas codificadas por el gen *CD99*. (Ali et al., 2022)

Se trata de una molécula implicada en diferentes procesos como diferenciación celular, adhesión, migración y tráfico de proteínas. CD99 se expresa de diferente manera en la superficie de las células hematopoyéticas tanto en el linaje mieloide como en el linfoide.

CD99 tiene una expresión ubicua en células y tejidos normales. Mediante estudios de inmunohistoquímica de varios tejidos humanos se obtiene una alta expresión en timocitos corticales, un subgrupo de linfocitos presentes tanto en médula ósea como en ganglios linfáticos; células endoteliales de los vasos sanguíneos; células de Langerhans en el páncreas; células testiculares como las células de Sertoli y células de Leydig; células granulosas del ovario y células endodermales del cerebro y del canal espinal. Esta molécula se expresa en todos los tipos celulares de leucocitos en timo, médula ósea y sangre periférica y su expresión está inversamente correlacionada con el estado de diferenciación del linaje linfoide y granulocitario (Dworzak et al., 1999). En los tejidos normales se expresa principalmente en linfocitos T. Está involucrado en varios procesos que afectan a la adhesión de los linfocitos T regulando la formación de rosetas y aumentando la unión de linfocitos T y linfocitos activados de sangre periférica a las células vasculares endoteliales (A. Bernard et al., 1988; G. Bernard et al., 2000, 1997). También contribuye a la diapédesis de los leucocitos a través de la interacción homotípica de CD99 expresado en leucocitos y células endoteliales (Dufour et al., 2008). Además, CD99 regula el tráfico intracelular de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase 1 y tiene un papel en la apoptosis y la diferenciación celular de timocitos inmaduros (G. Bernard et al., 1997; Sohn et al., 2001).

En otros tejidos, CD99 es conocido principalmente por su expresión aumentada (*up-regulation*) en el sarcoma de Ewing, para el que se considera un marcador diagnóstico (Baldauf et al., 2017; Rocchi et al., 2010). Sin embargo, en los últimos años también reportaron diferentes roles para CD99 en osteosarcoma (Sciandra et al., 2014), cáncer de mama (Baccar et al., 2013; Byun et al., 2006), adenocarcinoma pancreático (Goto et al., 2004), gliomas malignos (Cardoso et al., 2019) y cánceres epiteliales (Yoo et al., 2005). Más recientemente, hay estudios que han destacado el papel de CD99 presentando esta proteína como una potencial diana terapéutica en neoplasias hematológicas como la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfoblástica aguda de linaje T (LLA-T) (Chung et al., 2017; Dworzak et al., 1999; Enein et al., 2016; Vaikari et al., 2020; P. J. Zhang et al., 2000).

En la LLC la isoforma larga es la que más se expresa mientras que la forma corta apenas está presente (Aguilera-Montilla et al., 2019). Además, hay estudios en los que describen que la isoforma larga está relacionada con la migración de las células de LLC (Aguilera-Montilla et al., 2019) y que esta isoforma también regula la función de las integrinas en la LLC al regular la adhesión de las células de LLC a los ligandos de la integrina  $\alpha 4 \beta 2$ . CD99 está regulado por la metaloproteinasa 9 (MMP9) y el silenciamiento de la MMP9 resulta en una mayor expresión de CD99 en la superficie de las células de la LLC (Aguilera-Montilla et al., 2019).

Así CD99 tendría un papel importante en varias patologías hematopoyéticas, por tanto, se presenta como un potencial objetivo terapéutico. Hay algunas terapias desarrolladas aprovechando esta característica, una de ellas es el uso de monoclonales contra CD99 (anti-CD99 mAb), como es el caso de HO36-1.1 pero este monoclonal induce citotoxicidad *in vitro* en las células madre de AML (Chung et al., 2017; Vaikari et al., 2020). Los anticuerpos anti-CD99

también demostraron ser efectivos en la inducción de citotoxicidad en líneas celulares de leucemia mieloide como MOLM-13 (Chung et al., 2017; Vaikari et al., 2020).

CD99 puede actuar como una molécula de adhesión e inducir la expresión de otras moléculas de adhesión como son LFA-a,  $\alpha 4\beta 1$ , ELAM-1, VCAM-1 y ICAM-1 (Alberti et al., 2002; G. Bernard et al., 2000; Hahn et al., 1997; Dustin & Springer, 1989), asociadas con la adhesión leucocitaria y la migración transendotelial, pasos críticos durante el proceso inflamatorio. CD99 se expresa en los bordes intracelulares de las células endoteliales (Schenkel et al., 2002) y la interacción homofílica entre el CD99 endotelial con el CD99 leucocitario facilitaría la migración transendotelial a través de la activación de la proteína quinasa A (PKA) vía/a través de un complejo de señalización formado con la cola citoplasmática rica en lisina de CD99, la proteína de anclaje ezrina A-quinasa y la soluble adenilatociclasa (sAC)(L. Watson et al., 2008) . PKA puede estimular el tráfico a través de la membrana, facilitando el paso de los leucocitos a través del endotelio. Además, CD99 es un importante factor de migración transendotelial inversa, un proceso similar a la diapédesis, a través del cual las células dendríticas migran de los sitios de inflamación a los ganglios linfoides (Torzicky et al., 2012).

El ligando natural de CD99 permanece por descubrirse, siendo necesaria la utilización de anticuerpos monoclonales (mAbs) para estudiar sus funciones efectoras aguas abajo.

## **1.5. TRATAMIENTO DE LA LLC**

### **1.5.1. Antecedentes de la evolución de los tratamientos**

Durante varias décadas, el tratamiento estándar para la LLC ha sido el Clorambucilo (Clb). Se trata de un agente alquilante que afecta a la replicación del DNA y a la transcripción del RNA por la alquilación y la unión de las hebras de DNA (Eichhorst et al., 2009; Han et al., 1973; Knospe et al., 1974). Hay otros agentes alquilantes que se han utilizado en la terapia de la LLC como son la Ciclofosfamida o Bendamustina.

Posteriormente, se han empleado las combinaciones de análogos de purinas, que afectan a la síntesis del DNA por la inhibición de la DNA polimerasa y ribonúcleo reductasa o inhiben la adenosina desaminasa, como son la fludarabina o pentostatina.

Como los análogos de purinas y los agentes alquilantes tienen diferentes mecanismos de acción y no poseen perfiles de toxicidad superpuestos, parece lógico combinar los dos para adquirir efectos sinérgicos. De tal manera que la utilización de la fludarabina junto con ciclofosfamida posee una citotoxicidad sinérgica (Bellosillo et al., 1999) y han mejorado la profundidad y duración de la respuesta clínica (Catovsky et al., 2007; Eichhorst et al., 2006; Flinn et al., 2007).

Posteriormente, se desarrolló una terapia que consiste en la combinación de la fludarabina y ciclofosfamida con rituximab, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 (FCR), generándose así el primer tratamiento que prolongaría la supervivencia media en los pacientes con LLC (Hallek et al., 2010). También se observó que en los pacientes mayores con comorbilidades tratados con Clorambucilo a los que se les añadió rituximab, aumentaron su

supervivencia (Goede et al., 2014, 2015). Entre los anticuerpos anti-CD20 aprobados para el tratamiento de la LLC se encuentran Obinutuzumab, Ofatumumab y rituximab. Estos agentes son utilizados solos o en combinación con quimioterapia, utilizándose rituximab con terapias dirigidas como son Idelalisib y Venetoclax; y Obinutuzumab (GA101) en combinación con Venetoclax. El tratamiento estándar actual, tanto en primera línea como en recaída, es el empleo de fármacos dirigidos a dianas moleculares específicas (inhibidores de BTK, Venetoclax, Idelalisib) bien en monoterapia o en combinación con anticuerpos anti-CD20 (Rituximab, Obinutuzumab)

### 1.5.2. Elección del tratamiento y criterios de inicio.

Muchos de los pacientes con LLC son diagnosticados accidentalmente en un análisis de rutina por incremento del recuento linfocitario. Aun así, hay otros pacientes que tienen linfadenopatías de crecimiento rápido o que presentan síntomas causados por esplenomegalia masiva o citopenias por infiltración medular. Aproximadamente el 5% - 10% de los pacientes presentan síntomas típicos (Hallek et al., 2018), pero hay pacientes que permanecen asintomáticos o se encuentran en estadios tempranos (Rai 0, Binet A) los cuales están bajo control y observación de la enfermedad, sin recibir terapia alguna. Se ha visto que el inicio de la terapia en estas etapas tempranas no resulta beneficioso para incrementar la supervivencia. La terapia se recomienda en la progresión sintomática de la enfermedad, es decir, cuando haya evidencias de enfermedad activa (Hallek et al., 2018).

Como la LLC es una enfermedad incurable en la mayoría de casos, el objetivo principal de la terapia es mejorar la calidad de vida y prolongar la supervivencia. De modo que el objetivo terapéutico implica la inducción de respuesta hacia una remisión clínica completa duradera y con una calidad de vida óptima. En la rutina diaria, los puntos importantes al terminar un tratamiento en los ensayos clínicos serían la tasa de respuesta, el estado de la enfermedad mínima residual, o la supervivencia libre de progresión (PFS), que pueden ser más relevantes para aquellos pacientes jóvenes y *fit* que en los pacientes más mayores y con comorbilidades relevantes.

No todos los pacientes requieren tratamiento al inicio de la enfermedad, de tal manera que se observan en intervalos de 1 a 3 meses. Se deben iniciar el tratamiento en aquellos casos que cumplan con uno de los criterios del *International workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL)* cuando la enfermedad esté activa (Hallek et al., 2018):

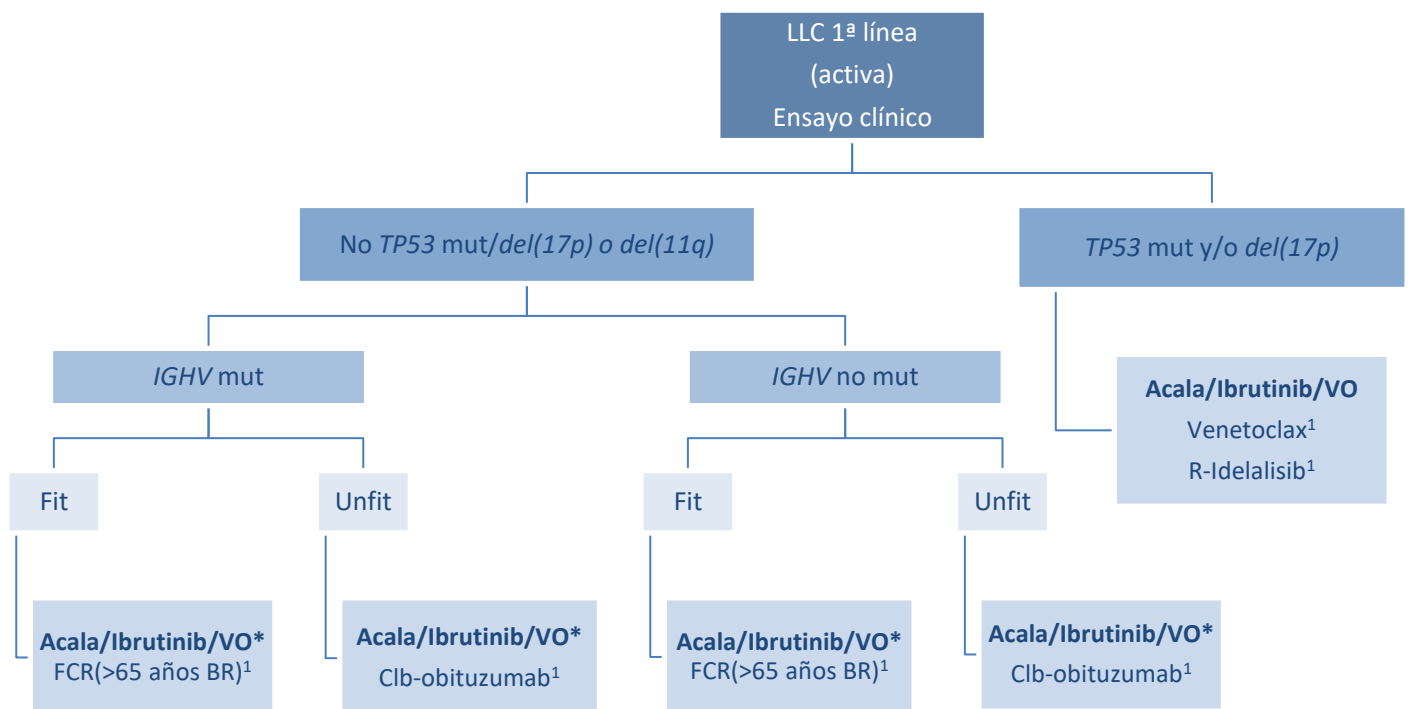
1. Insuficiencia medular progresiva, presencia o empeoramiento de anemia o trombocitopenia. Generalmente se utilizan valores de Hb <10 g/dL o recuento plaquetas <100x10<sup>9</sup> /L, pero en ocasiones pacientes con plaquetas <100x10<sup>9</sup> /L pueden permanecer estables durante un largo periodo de tiempo, sin necesidad de tratamiento.
2. Esplenomegalia masiva (>6 cm por debajo del reborde costal) progresiva o sintomática.
3. Adenopatías de gran tamaño (> 10 cm) o de crecimiento progresivo o sintomático.
4. Tiempo de duplicación linfocitario ≤6 meses o incremento >50% de la linfocitosis en 2 meses (únicamente aplicable con linfocitosis >30x10<sup>9</sup>/L). Se deben excluir otros factores

que puedan explicar aumento en la cifra de linfocitos (infecciones, uso de esteroides, etc.).

5. Anemia y/o trombocitopenias autoinmunes que no responden al tratamiento con corticoides.
6. Afectación sintomática o funcional de otros órganos o tejidos: piel, riñón, pulmón.
7. Pérdida de peso (>10% en 6 meses), astenia, (ECOG  $\geq$ 2), fiebre >38°C (sin infección durante >2 semanas) o sudoración nocturna (> 1 mes sin evidencias de infección o fatiga).

La hipogammaglobulinemia, la existencia de una paraproteína monoclonal, la presencia de alteraciones citogenéticas de alto riesgo o la leucocitosis por sí sola no constituyen criterios para iniciar tratamiento.

La recaída de la enfermedad, el aumento del recuento de linfocitos de manera asintomática sin otros signos de progresión no son indicadores de empezar la terapia a menos que muestren síntomas de enfermedad activa. Así pues, las segundas y sucesivas líneas de tratamiento deben iniciarse siempre que se reúnan los criterios de enfermedad activa detallados para la primera línea.



**Figura 6. Opciones de terapia de primera línea.** Acala: Acalabrutinib, BR, Bendamustina + rituximab; Clb, Clorambucilo; R, Rituximab, FCR, fludarabina; ciclofosfamida y rituximab, VO: venetoclax + obinutuzumab; IGHV genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. El criterio fit o unfit se basa en la capacidad del paciente de poder recibir quimio inmunoterapia (FCR o BR). <sup>1</sup> En los casos que no pueden administrarse los fármacos recomendados como primera opción terapéutica. \* Las líneas no indican orden de preferencia y los fármacos están listados por orden alfabético. La selección se hará en bases a criterios clínicos y biológicos. GELLC. *Guías de tratamiento de LLC vs 18 abril 2023*; Available from: [https://www.gellc.es/images/pdf/PPT\\_GUIAS\\_GELLC-V1.pdf](https://www.gellc.es/images/pdf/PPT_GUIAS_GELLC-V1.pdf).

### 1.5.2.1. Seguimiento, Respuesta y evaluación.

A los dos meses de haber finalizado el tratamiento, se evaluará la respuesta en la inmunoterapia y a los dos meses de haber alcanzado la máxima respuesta para el tratamiento continuado.

Estos factores pronósticos adversos para determinar la respuesta al tratamiento y la supervivencia incluyen valores séricos de LDH y  $\beta$ 2-M, patrón de infiltración medular, marcadores de expresión de ZAP-70 y CD38. Además, se utilizan los marcadores genéticos como el estado mutacional de los genes *IGHV* y alteraciones citogenéticas como *del(11)q* y *del(17p)*.

### 1.5.3. Tratamiento en pacientes R/R segunda línea

En algunos casos hay pacientes que no responden a la segunda línea de quimio-inmunoterapia como son aquellos que han generado resistencia al tratamiento de quimio-inmunoterapia de primera línea, aquellos tras la quimio-inmunoterapia basada en fludarabina cuyo tiempo de progresión es de 2-3 años, o aquellos que presentan *del(17p)* o mutaciones de *TP53*. En este caso estos pacientes deberían seguir un régimen no quimioterápico o entrar en un ensayo clínico siempre que sea posible. No obstante, en ciertos casos el trasplante alogénico de células hematopoyéticas podría ser considerado.

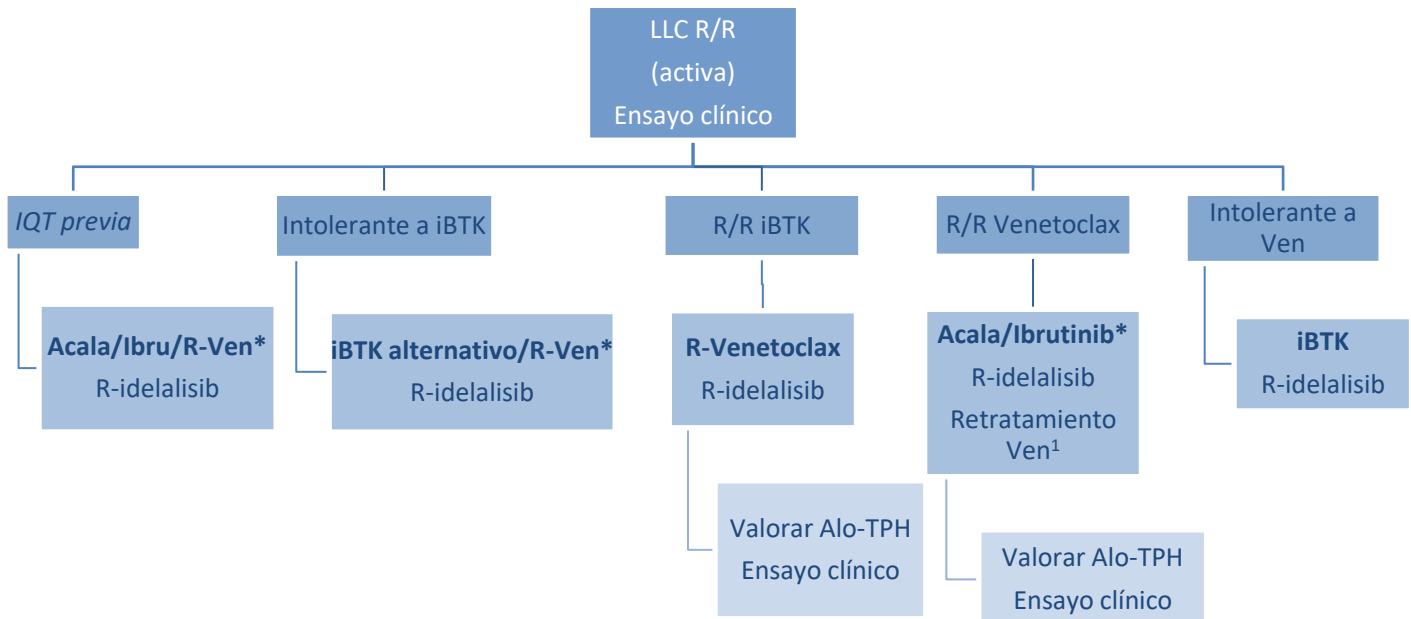
Los pacientes con una recaída temprana tras la primera línea de quimioterapia o de quimio-inmunoterapia tiene un pronóstico adverso que ha mejorado con la administración de terapias dirigidas a dianas específicas. Esto se debe a la evolución clonal de la LLC tras el tratamiento de primera o segunda línea y un enriquecimiento de alteraciones genéticas adversas como la alteración de *TP53*, lo que lleva a una selección clonal durante la quimioterapia en algunos casos.

La transformación a linfoma difuso de células B (DLBCL) ocurre en el 2-15% de los pacientes dentro del trascurso de la enfermedad, en algunos casos después de varias líneas de tratamiento de quimio-inmunoterapia.

La selección del tratamiento correcto en los pacientes R/R depende del tipo de terapia previa, la respuesta al tratamiento previo y los efectos secundarios, comorbilidades y el riesgo de toxicidad asociada a los fármacos

Actualmente la terapia recomendada se basa en las nuevas terapias con inhibidores de quinasas como Ibrutinib, Idelalisib, el antagonista de *BCL-2* venetoclax o los anticuerpos monoclonales. Estos fármacos han supuesto una mejora en el pronóstico de los pacientes en recaída o refractarios (R/R) mostrando una gran eficacia clínica, incluso en los pacientes con mal pronóstico, especialmente aquellos que son refractarios a la terapia de regímenes que contienen fludarabina y aquellos que poseen mutación en *TP53* o *del17p* (Smolewski & Robak, 2021). La combinación de los nuevos agentes terapéuticos puede aumentar la eficacia, reducir el riesgo de resistencia y la toxicidad. Además, el tratamiento combinado puede producir una mayor respuesta y puede utilizarse durante un periodo limitado, sin embargo, sólo está

aprobada la combinación de venetoclax y rituximab para un determinado periodo de duración concreta en los pacientes R/R.



**Figura 7. Opciones de terapia de rescate en paciente R/R.** Acala: Acalabrutinib, IQT: inmunoquimioterapia, iBTK: inhibidor de BTK (Acalabrutinib o Ibrutinib), Ibru: Ibrutinib, R: Rituximab, Alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyético, R/R: recaído/refractarios, ven: venetoclax. \* Las líneas no indican orden de preferencia y los fármacos están listados por orden alfabético. La selección se hará en bases a criterios clínicos y biológicos. <sup>1</sup> Si recaída tardía. GELLC. *Guías de tratamiento de LLC vs* 18 abril 2023; Available from: [https://www.gellc.es/images/pdf/PPT\\_GUIAS\\_GELLC-V1.pdf](https://www.gellc.es/images/pdf/PPT_GUIAS_GELLC-V1.pdf).

### 1.5.3.1. Resistencias al tratamiento

La resistencia a los inhibidores de BTK o a los inhibidores de BCL-2 es un problema común en los pacientes R/R. Los pacientes que desarrollan resistencia a Ibrutinib es, en algunos casos, debido a una mutación en el sitio de unión covalente a Ibrutinib (C481S) que le confiere un peor resultado frente al tratamiento. Además, hay pacientes que adquieren resistencia a venetoclax, hay una mutación puntual (Gly101Val) que disminuye la afinidad de Bcl-2 y reduciría la unión de venetoclax. A pesar de las altas tasas de respuesta clínica, la mayoría de los pacientes que reciben un tratamiento previo intenso antes de comenzar con venetoclax finalmente experimentan una recaída o sufren transformación Richter a linfoma difuso de células B grandes (Anderson et al., 2017). Esta mutación se ha observado en pacientes que ocurre durante la progresión de la enfermedad, de modo que podría ser un potencial biomarcador de la recaída clínica en la LLC. De la misma manera tiene lugar en paralelo la mutación Asp103Glu durante la terapia con venetoclax (Blombery et al., 2019, 2020).

### 1.5.3.2. Evolución clonal

La evolución clonal y la heterogeneidad son fundamentales en la dinámica del cáncer, mediante un proceso reiterado de proliferación clonal, diversificación y selección. Las células se adaptan dentro del microambiente adquiriendo y acumulando progresivamente características que permiten su desarrollo y expansión. La heterogeneidad intratumoral favorece esta evolución al dotar de una gran variedad de subclones, de los cuales el subclón más apto se selecciona de la generación parental y se propaga a la generación posterior. Esta heterogeneidad intratumoral es respaldada por la heterogeneidad genética de los diferentes subclones tumorales, en los que cada uno alberga un conjunto de alteraciones genéticas, así pues, estudiando la evolución clonal se podría identificar el inicio y la progresión tumoral que se lleva a cabo en respuesta al tratamiento posterior y la recaída.

La LLC tiene una dinámica de mutaciones variable y heterogénea llevando a una composición clínica diversa desde una rápida progresión, refractariedad al tratamiento y transformación de alto grado (González-Rincón et al., 2019), o un curso clínico altamente estable o incluso la regresión espontánea de la enfermedad en el extremo opuesto, no obstante gracias al transcurso prolongado de la enfermedad permitiría descifrar la evolución clonal. La distribución de mutaciones o de alteraciones genómicas en los genes *TP53*, *SF3B1*, *ATM*, *POT1*, *RPS15* son más frecuentes en aquellos pacientes que entran en ensayos clínicos. La aparición de clones en recaída después de la quimioterapia, suelen estar caracterizados por tener mutaciones en genes como *TP53*, *IKZF3* o *NRAS*, precedida por la presencia de subclones mutados que pueden ser detectados antes del tratamiento (Landau et al., 2013, 2015). Al contrario, las mutaciones asociadas con la resistencia a Ibrutinib observada en *BTK* o *PLCδ2*, no son comunes detectarlas antes del tratamiento o en una muy baja frecuencia (inferior a dos en un millón) (Burger et al., 2016). No obstante, emergen progresivamente postratamiento y pueden ser detectadas 3-15 meses antes de la progresión clínica (Kwok & Wu, 2021; Woyach, Furman, et al., 2014). Muchos casos tienen una heterogeneidad intratumoral compleja que influencia la evolución de la enfermedad. Las alteraciones clonales tempranas parecen corresponder con las alteraciones clásicas en el número de copias (CNA) del(13q), tri(12) y del(11q) seguidas de la adquisición de mutaciones en diferentes genes *TP53*, *SF3B1*, *ATM*, *POT1*, *RPS15* (Landau et al., 2013, 2015; Nadeu et al., 2016). La secuenciación de gran cobertura ha aumentado la detección de pequeños subclones mutados en prácticamente todos los genes mutados (Landau et al., 2013; Nadeu et al., 2016, 2018; Rossi et al., 2014).

Además, el aumento del número de mutaciones empeora en la evolución de los tumores al diagnóstico y en la recaída tanto en tumores clonales como subclonales (Landau et al., 2013; Nadeu et al., 2018). La influencia del número de mutaciones en el acortamiento del tiempo hasta el primer tratamiento parece independiente de los drivers específicos (*TP53*, *SF3B1*, *ATM*), de la composición clonal/subclonal de los tumores y de las mutaciones en *IGHV* (Nadeu et al., 2018). El aumento del número de alteraciones subclonales confiere una supervivencia global menor, pero parece estar relacionado con el estado de *IGHV* o mutaciones de *TP53* (Landau et al., 2013; Nadeu et al., 2016, 2018). Las relaciones entre las alteraciones genómicas y epigenómicas (Oakes et al., 2016) y la evolución dinámica de las poblaciones clonales y subclonales se conocen poco. Estos mecanismos son clínicamente relevantes ya que la quimioterapia selecciona los

subclones más aptos de alto riesgo, mientras que las nuevas terapias promueven la aparición de clones resistentes (Burger et al., 2016; Landau et al., 2013, 2015b).



# ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

---



## 2. HIPÓTESIS

Los linfocitos B clonales presentes en la médula ósea y en los ganglios linfáticos de la LLC, expresan mayores niveles de MMP-9 en su superficie que los circulantes en sangre periférica (Kamiguti et al., 2004; Vandooren et al., 2013). En estudios previos, se ha visto que las vías de señalización reguladas por las MMP son amplias destacando las rutas de las MAPKs (p38MAPK y ERK1/2). Por otra parte, la MMP-9 se ve regulada por los ejes CXCL12/CXCR4 y CCL21/CCR7 que aumentan su expresión vía ERK1/2/c-fos (Bailón et al., 2018; Kamiguti et al., 2004; Redondo-Muñoz, Ugarte-Berzal, et al., 2010).

Además, las células de LLC expresan altos niveles del receptor de la quimioquina CXCL12 (CXCR4) en sangre periférica pero bajos niveles en tejidos periféricos. Esta quimioquina posee un rol crucial en el reclutamiento de las células LLC a la médula ósea, y también a través de la activación de las vías MEK/ERK y PI3K y de la fosforilación de STAT3, es capaz de inducir la supervivencia de estas células (Amigo-Jiménez et al., 2015; Lozano-Santos et al., 2015; Redondo-Muñoz, Escobar-Díaz, et al., 2010; Redondo-Muñoz et al., 2006).

Previamente se ha demostrado que CD99 es una molécula transmembrana y se postula como una nueva diana terapéutica al intervenir en procesos de adhesión y migración de las células de la LLC y también en el tráfico de proteínas intracelular y en la diapédesis leucocitaria hacia el endotelio vascular inflamado. Además, CD99 guarda una relación estrecha con la MMP-9, de tal forma que nos planteamos ampliar el conocimiento del efecto de las nuevas terapias sobre CD99 ya que hasta el momento no hay apenas información sobre CD99 en la LLC, salvo su relación con la MMP-9 (Aguilera-Montilla et al., 2019).

Por tanto, en primer lugar, hipotetizamos que CD99 podría tener un papel regulador en la LLC, en la migración y adhesión celular a través de vías de señalización intracelular de las MAPs y que, además, podría tener una relación sinérgica junto con la MMP9 cuya relación con CD99 ha sido estudiada previamente.

En segundo lugar, planteamos el estudio del papel de CD99 sobre la expresión de CXCL12, en células de LLC tratadas con Ibrutinib, de tal manera que muestre el impacto sobre la supervivencia celular y la migración. Puesto que CXCR4 media la regulación de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) reteniendo las células de LLC en los ganglios linfáticos, bazo y médula ósea; y, además, la reducción en la membrana de CXCR4 producida al inhibir BTK con Ibrutinib, postulamos que desencadenaría una rápida redistribución de las células LLC desde el bazo y los ganglios linfáticos.

### 3. OBJETIVOS

El microambiente estromal en la LLC es un punto clave en la resistencia al tratamiento de esta enfermedad. Con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares que contribuyen a esta resistencia, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterización biológica de la expresión de CD99 y CD49d en el ambiente estromal de células de pacientes con LLC sometidas al tratamiento *in vitro* con Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax.
2. Valoración de la influencia del microambiente en la migración y adhesión de células LLC bajo el tratamiento con Ibrutinib, analizando la migración hacia CXCL12 junto con la expresión de CD99 en la adhesión y en la migración a través de células endoteliales HUVEC.
3. Caracterización de las vías de señalización implicadas, bajo la influencia de Ibrutinib, en concreto AKT, ERK y p38 y la valoración sobre las proteínas involucradas en la apoptosis como Bcl-2 y Mcl-1.

# ***MATERIAL Y MÉTODOS***

---



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Muestras biológicas.

#### 4.1.1. Pacientes

Todas las muestras que se utilizaron en este ensayo fueron proporcionadas por el Hospital Puerta de Hierro de Majadahonda, previo consentimiento informado de los pacientes y respetando el anonimato de los mismos, contando con la aprobación del Comité ético del Hospital Puerta de Hierro (Comité Ético de Investigación Clínica Hospital Puerta de Hierro Majadahonda), llevado a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki.

Se analizaron muestras biológicas de los pacientes recién diagnosticados, muestras consecutivas al diagnóstico, y durante la progresión de la enfermedad, y muestras de pacientes que recibieron tratamiento previo. Las muestras control fueron tomadas de individuos sanos provenientes del Biobanco del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, tras la firma del consentimiento informado para el estudio.

En total los pacientes incluidos en el estudio fueron 55 cuyas características están detalladas en la *Tabla 3* y se incluyeron 5 muestras control de donantes sanos.

CARACTERÍSTICAS		N= 55
<b>Estadio Rai</b>	0	18
	I-II	26
	III-IV	11
<b>IGHV</b>	M	15
	NM	27
	NS	13
<b>TP53</b>	M	8
	NM	35
	NS	12
<b>SF3B1</b>	M	3
	NM	38
	NS	14
<b>NOTCH1</b>	M	7
	NM	35
	NS	13
<b>BIRC3</b>	M	2
	NM	33
	NS	20
<b>ATM</b>	M	0
	NM	4
	NS	51

**Tabla 3.** Pacientes incluidos en el estudio. NM: no mutado, M: mutado, NS: no determinado

#### 4.1.2. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en este estudio fueron: líneas primarias de estroma HS-5 (fibroblastoide) y HS-27A (epitelioide) obtenidas del Biobanco ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA), cultivadas en RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Pailey, Escocia) con 10% de suero bovino fetal (FBS, Sigma Áldrich, St. Louis, MO). Estas células estromales fueron inmortalizadas a partir de aspirado de medula ósea de donantes normales (Roeklein & Torok-Storb, 1995). Línea celular HUVEC (Human Vascular Endothelial Cells) donadas generosamente por Dra. Laura Sanz Alcober, cultivadas en medio ECGM-2 suplementado (Gibco, Invitrogen, Pailey, Escocia)

#### 4.2. Procesamiento de muestras

##### 4.2.1. Aislamiento de las células en sangre.

La purificación de los linfocitos B se realiza a partir de las muestras de sangre periférica mediante la centrifugación en gradiente de Ficoll (Ficoll-Plaque™ PLUS, GE Healthcare Bio-Science). Se centrifugaron las muestras previamente diluidas 1:1 con RPMI sin suero o con PBS 1X estéril sobre el Ficoll, durante 15 minutos a 2.100 revoluciones por minuto (rpm) sin freno en la centrífuga y a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación, se recoge la fracción mononuclear de la interfase (PBMC) resultante de la centrifugación, en un halo donde encontramos los linfocitos B. Para evitar la presencia de eritrocitos en la fracción leucocitaria, lisamos el pellet con Buffer de Lisis, (Quiagen, Hilden, Germany) durante 15 minutos para después centrifugar la suspensión a 1.200 rpm durante 5 min y resuspender el pellet en RPMI sin suero.

Las células obtenidas se conservaron en N<sub>2</sub> líquido hasta su uso, 20 millones de células por criotubo en medio de congelación conteniendo 10% DMSO, 60% suero fetal bovino (FBS) y 30% medio RPMI.

Además, se realiza la determinación del inmunofenotipo con CD19 y CD5 para determinar el porcentaje de linfocitos B clonales en la muestra mediante citometría de flujo.

##### 4.2.2. Extracción automática de ADN

El ADN genómico fue extraído de los linfocitos B previamente obtenidos mediante la purificación por Ficoll.

Este método fue empleado en la extracción del ADN de todos los individuos mediante el kit de purificación Maxwell 16 Blood ADN (Promega, Madison, CA, USA), cuyo mecanismo de acción se basa en la utilización de partículas magnéticas que se unen al DNA y posteriormente se eluye en condiciones de baja salinidad. Tras esta extracción, se determina la cantidad y la calidad del ADN obtenido mediante el espectrofotómetro Quantus (Promega, Madison, CA, USA).

### 4.2.3. Aislamiento y extracción de RNA

La extracción del RNA total se realiza tras el aislamiento de la fracción mononuclear del apartado anterior, en al menos 10 millones de células. Se emplea el kit simplyRNA Cells para Maxwell (Promega, Madison, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La calidad y la cantidad del RNA extraído se valora mediante la lectura de la absorbancia en el Nanodrop (NanoDrop Technologies, Newark, USA) a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 260 y 280, para determinar la ratio  $A_{260}/A_{280}$ , considerando valores óptimos a los comprendidos entre 1,8 y 2. Y posteriormente se tomará 1  $\mu$ g de dicho RNA para elaborar el cDNA en la RT-PCR.

Para el estudio de la integridad del RNA, y de los productos obtenidos tras la RT-PCR, se realiza electroforesis en gel de agarosa, con una concentración de agarosa del 1-1,5%. Se visualizó mediante el software Quantity One 4.5.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

## 4.3. Análisis de la expresión

### 4.3.1. PCR convencional

Fue empleada en las muestras para llevar a cabo la amplificación del gen *TP53* y de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas *IGHV* con su posterior secuenciación.

### 4.3.2. Determinación del estado mutacional de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (*IGHV*)

Para determinar la familia del gen *Vh* (Fais et al., 1998), se utilizó 2  $\mu$ L de DNA amplificado utilizando primers específicos de la región *FR* junto con el primer *antisense Jh* de la tabla 4 y 5. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L utilizando un termociclador Verity (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo el programa: desnaturalización a 94°C durante 45s, alineamiento 65°C durante 45s y elongación 72°C durante 45s. Después de 35 ciclos, la elongación se continua durante 10 min adicionales. Los primers utilizados para la secuenciación de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas fueron los detallados en la Tabla 4 y Tabla 5 para la región codificante  $V_H$ : FR1 y para la región Leader (Fais et al., 1998) respectivamente.

<i>IGHV FR1</i>		
Región amplificada	Dirección	Primers (5' > 3')
VH1 FR1	F	GGC CTC AGT GAA GGT CTC CTG CAA G
VH2 FR1	F	GTC TGG TCC TAC GCT GGT GAA ACC C
VH3FR1	F	CTG GGG GGT CCC TGA GAC TCT CCT G
VH4 FR1	F	CTT CGG AGA CCC TGT CCC TCA CCT G
VH5 FR1	F	CGG GGA GTC TCT GAA GAT CTC CTG T
VH6 FR1	F	TCG CAG ACC CTC TCA CTC ACC TGT G
JHconsensus	R	CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C
JHconsensus	R	6-FAM-CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C

Tabla 4. Primers de la región FR1 de VH

<i>IGHV LEADER</i>		
Región amplificada	Dirección	Primers (5' > 3')
VH1 y VH7	F	ATGGACTGGACCTGGAGG
VH2	F	CACRCTCCTGCTGCTGACCA
VH3a	F	GCTGGGTTTTCTTGTTC
VH3b	F	ATGGAGTTKGGRCTGAGCTG
VH4	F	GCTCCAGATGGGGTCCTG
VH5	F	CTCCTCCTGGCTGTTCTCC
VH6	F	CTGTCTCCTTCCTCATCTTCC
JH CONSENSUS	R	CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C

Tabla 5. Primers de la región Leader de VH

#### 4.3.3. Determinación del estado mutacional de *TP53*

Para determinar el estado mutacional de *TP53*, se llevó a cabo una amplificación de los exones 4, 5-6, 7, 8-9, 10 siguiendo las recomendaciones (Malcikova et al., 2018).

<i>TP53</i>			
Región amplificada	Primer (5' > 3')	Dirección	Longitud producto
Exón 4	TGCTCTTTTCACCCATCTAC	F	353 bp
	ATACGGCCAGGCATTGAAGT	R	
Exones 5-6	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	F	467 bp
	TTAACCCCTCCTCCCAGAGA	R	
Exón 7	CTTGCCACAGGTCTCCCAA	F	237 bp
	AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA	R	
Exón 7	AGGCGCACTGGCCTCATCTT	F	177 bp
	TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC	R	
Exones 8-9	TTGGGAGTAGATGGAGCCT	F	445 bp
	AGTGTAGACTGGAACTTT	R	
Exón 10	CAATTGTAACCTGAACCATC	F	260 bp
	GGATGAGAATGGAATCCTAT	R	

Tabla 6. Primers de *TP53*

#### 4.3.4. Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger nos permite identificar la secuencia de bases de la muestra a analizar. Se realiza mediante el marcaje fluorescente de los dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), siendo diferente para cada base y emitiendo fluorescencia en una longitud de onda diferente cada una facilitando la correcta determinación.

Tras la amplificación con los cebadores específicos descritos anteriormente, se lleva a cabo una purificación de 5 µL del producto de PCR con la muestra de DNA de inicio, junto con 2 µL del reactivo Exosapit (G&E Healthcare Bio-Science) durante 15 min a 37°C y 15 min a 75°C en un termociclador.

Las secuencias fueron determinadas al reamplificar 1 µL del producto de PCR purificado obtenido en el paso anterior con 2 µL del reactivo Big Dye 1.1 (Applied Biosystems, Foster City,

CA) para fragmentos inferiores a 400 pb, 1  $\mu$ L del primer forward o reverse, 1  $\mu$ L de Buffer de elución y 5 $\mu$ L de agua. Estas reacciones de secuenciación se llevaron a cabo siguiendo el siguiente programa: desnaturalización 94°C durante 45s, alineamiento 62°C durante 30s, elongación 72°C durante 45s. Después de 30-32 ciclos la elongación se continua durante 10 min adicionales.

Estos productos de PCR son secuenciados directamente tras la purificación con resina (BDx) empleando 2 $\mu$ L de cada muestra con 10  $\mu$ L BDx terminator y 45  $\mu$ L de buffer en un agitador de placas durante 30 minutos. A continuación, las muestras fueron analizadas utilizando un secuenciador automatizado ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizó el programa Chromas (Technelysium, Australia) y en el caso de las secuencias de *IGHV* se compararon con aquellas en el directorio de la base Vquest IMGT/V-QUEST program version: 3.5.31 (Giudicelli et al., 2011)

#### 4.3.5. Análisis de la clonalidad

Para el análisis de fragmentos, se lleva a cabo un análisis de la clonalidad de aquellas muestras con *IGHV* varias poblaciones. De tal manera que el análisis de los fragmentos clonales se basa en el marcaje con fluorocromos de uno de los primers con los que se realiza la PCR, en este caso se marca el primer JHconsensus-6-FAM. Después de la amplificación por PCR, los productos amplificados son separados en una electroforesis en capilares de polímero (POP7) en el secuenciador ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Así pues, añadiendo 1 $\mu$ L del producto amplificado con 0,8  $\mu$ L de un patrón de tamaño de fragmentos GeneScan 400-RDX para cuantificar los fragmentos de DNA de un rango de nucleótidos de 50-400 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 10  $\mu$ L de formamida desionizada, para permitir la separación por desnaturalización del ADN en cadenas simples. De tal forma que tras incorporarlo en un secuenciador automático de ADN ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) se detectan automáticamente debido a la fluorescencia por el sistema láser del secuenciador.

Para la interpretación de los datos obtenidos, consideramos los fragmentos monoclonales si se obtiene un pico de la longitud del fragmento estimada (pares de bases) que esté en consonancia con el producto amplificado. Si hay 2 picos, la altura del pico debe ser al menos del doble de la distribución normal de los picos policlonales, correspondientes a las células reactivas acompañantes. Si se detectan 2 picos de longitud de onda igual o x2 veces el pico inicial, se considera biclonal el resultado. Si se detectan de 3 a 5 picos puede ser un resultado oligoclonal y si son más de 5 picos de longitudes diferentes se considera un resultado policlonal.

#### 4.3.6. Next Generation Sequencing Analysis (NGS)

Se lleva a cabo para la determinación del estado mutacional de *TP53*. Se emplea un panel Archer VariantPlex (Illumina, San Diego, CA, USA, USA) por el cual se generan unas librerías que son analizadas con el secuenciador MiSeq (Illumina) y los archivos fastq generados, en concreto .bam.bai generados son analizados con el software proporcionado por Archer.

La técnica se basa en la secuenciación por síntesis mediante la terminación reversible cíclica, donde se utilizan terminadores de cadena marcados fluorescentemente, cuyo nucleótido bloqueado por un grupo 3'-O-azidometilo marcado con un fluoróforo (F) específico de cada base, que es eliminado tras la obtención de la imagen y al estar libre el carbono del extremo 3', la cadena acepta una nueva base y se continua la reacción de secuenciación. Durante cada ciclo. Los fragmentos incorporan solo un nucleótido ya que el grupo 3' impide incorporaciones adicionales. El fluoróforo se escinde y el 3'-OH se regenera con el agente reductor Tris fosfina, de tal manera que tras esto el ciclo de adición, elongación y escisión de nucleótidos comienza de nuevo.

La técnica consiste en un primer lugar en la fragmentación del DNA de las muestras a estudiar con la posterior ligación de adaptadores, que permiten la hibridación de las muestras a secuenciar sobre la superficie de la flow cell, y de índice que permitirían la identificación de las muestras de manera individual. Tras la ligación se produce la amplificación elaboración de una mezcla de cada muestra a una concentración determinada para proceder a la carga en el secuenciador MiSeq (Illumina) y su secuenciación.

En este caso se utiliza un panel dirigido en estudiar en concreto para el gen *TP53* VariantPlex Archer, de tal forma que se emplea un panel de amplicones basado en la amplificación mediante PCR de los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 mediante la unión de los primers específicos. Así pues, partimos de 50 ng de DNA y en la obtención de las librerías se generarán amplicones mediante amplificación por PCR y se ligara en los extremos de cada amplicón un índice único (molecular barcode o MBC) específico de cada fragmento de DNA específico de cada muestra, y un adaptador.

Para la cuantificación de las librerías generadas se utilizan varios métodos para su precisión, KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems, Roche), Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific), y Quantus.

Para la visualización se utiliza el software comercial de Archer y además se utiliza el programa IGV para la carga y visualización de los datos y evitar la pérdida de información relevante y los falsos positivos.

La interpretación de las variantes analizadas se realiza siguiendo las recomendaciones del Grupo ERIC utilizando la información de las bases de datos recomendadas (Malcikova et al., 2018) para establecer el significado clínico de la variante estudiada. Para confirmar las variantes mutacionales se realiza consultando las bases de datos ClinVar, COSMIC, IARC (*ClinVar*, n.d.; IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, n.d.; Forbes et al., 2017)

#### 4.4. Citometría de flujo

Para el estudio de la expresión de CD99 y CD49d en las células de donantes y pacientes de LLC se recurrió a la técnica de citometría de flujo, empleando un citómetro modelo NAVIOS (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), equipado con 3 láseres, que emiten luz a una longitud de onda de 488 nm, 638 nm y 405 nm, y con detectores que permiten determinar el tamaño celular, la complejidad citoplasmática y la fluorescencia de los fluorocromos.

Esta técnica se basa en el marcaje de las células con anticuerpos conjugados a fluorocromos que de manera específica reconocen antígenos humanos de la superficie celular.

Brevemente, se seleccionaron los anticuerpos marcados con diferentes fluorocromos que al ser excitados con el láser adecuado producen una emisión de luz en determinada longitud de onda que permitan la detección simultánea de la expresión de varios antígenos de superficie de una única muestra.

Fluorocromo	Longitud de onda de excitación nm	Longitud de onda de emisión nm
<b>APC (aloficocianina)</b>	633-638	775
<b>PC5.5 (ficoeritrina-cianina 5 )</b>	488	692
<b>PC7 (ficoeritrina-cianina 7 )</b>	488	770
<b>FITC (isotiocianato de fluoresceína)</b>	488	525
<b>PE (ficoeritrina)</b>	488	575
<b>ECD (ficoeritrina Texas Red)</b>	488	613

Tabla 9. Fluorocromos empleados

Las células se centrifugaron y resuspendieron en 300µL del buffer FACS IsoFlow (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) con BSA para impedir la formación de uniones inespecíficas de los anticuerpos. El marcaje de las células se realizó añadiendo a la suspensión celular el volumen indicado por la casa comercial de cada anticuerpo específico: 5µL de los anticuerpos monoclonales CD3-PE, CD45-PC7, CD19-PC5.5, CD5-FITC, CD49d-APC, CD99-ECD y utilizando los respectivos controles de isotipo IgG2-ECD (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Tras incubar las muestras durante 15-30 min a temperatura ambiente y en oscuridad se analizaron  $5 \times 10^5$  células.

La adquisición de las muestras se realizó con un citómetro de flujo FACS NAVIOS EX. BEC (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) manteniendo la velocidad constante y el número de eventos en 100.000 eventos para los casos de la evaluación del efecto del fármaco, mientras que para los ensayos de migración se tuvo en cuenta solo el tiempo de adquisición de manera constante y previamente fijado para determinar el número de células. El posterior análisis de los datos resultantes de las citometrías se realiza con el Software Kaluza Analysis versión 2.4 (Beckman Coulter).

#### 4.5. Ensayos *in vitro*. Cultivo celular

##### 4.5.1. Cultivos de líneas de estroma de médula ósea HS-5 y HS-27A

Las líneas celulares fueron adquiridas en el biobanco ATCC (*American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA*), fueron cultivadas en RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Peisley, UK) con 10% de suero fetal bovino (SBF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y con 1% antibiótico (100 U/mL Penicilina y 100 µg/mL de Estreptomina (GIBCO).

Estas líneas celulares de estroma inmortalizadas con los genes E6/E7 del virus del papiloma humano (Roecklein & Torok-Storb, 1995), están establecidas a partir de un donante normal, y por ello tiene características de estroma primario. La línea HS-5 tiene una morfología fibroblástica, es capaz de secretar factores solubles y es la única capaz de sostener la proliferación de progenitores hematopoyéticos co-cultivados. No obstante, la línea HS-27A posee una morfología epitelial, con una secreción menor de factores de crecimiento y no promueve la proliferación de progenitores, pero tiene gran potencialidad para las uniones intercelulares. Seleccionadas así para representar el microambiente estromal.

Estas líneas celulares fueron cultivadas en RMPI-completo en condiciones estándar, siendo desdobladas hasta un máximo de 8 pases.

##### 4.5.2. Cultivos de HUVEC

Como modelo de células endoteliales para los estudios *in vitro*, se seleccionó la línea celular procedente de células endoteliales de vena de cordón umbilical humana (*Human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) generosamente prestadas de la Dra. Sanz-Alcober (UNIM) procedentes de ATCC. Para el cultivo de las células se empleó el medio de cultivo EGM-2, compuesto del medio de cultivo basal EBM-2 (Lonza, Wokingham, UK) conteniendo el 2% FBS, y suplementado con VEGF, FGF, EGF, factor de crecimiento tipo insulina I (R3-IGF-1), hidrocortisona, ácido ascórbico, gentamicina sulfato y anfotericina-B (Lonza).

##### 4.5.3. Cultivos de células primarias (PBMCS)

Las células mononucleadas obtenidas en la extracción de sangre periférica, corresponden con la población de linfocitos B con una pureza  $\geq 90\%$  CD19+, determinada mediante citometría de flujo. Estos linfocitos aislados fueron preservados en N<sub>2</sub> líquido y fueron descongelados posteriormente en RPMI 1640 con 10% FBS a 37°C y centrifugadas a 1.500rpm durante 5 min y se resuspenden en medio de cultivo completo con RPMI 1640 con L-glutamina (GIBCO) suplementado con 10% SFB y penicilina (100U/mL)/estreptomina 100µg/L (GIBCO). Tras la descongelación se establece la viabilidad celular mediante trypan blue junto con el conteo celular en una cámara de Neubauer estableciendo la concentración celular para cada experimento.

Las células se mantuvieron en cultivo durante al menos 1h antes de adicionar el fármaco correspondiente en una atmosfera húmeda a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

#### 4.5.4. Co-cultivos

Las líneas estromales HS-5 y HS-27A de estroma primario, fueron plaqueadas. No obstante, las células HS-27A tienen que ser estimuladas para poder expresar en la membrana el ligando VCAM-1, de modo que tras 4-6h de incubación a 37°C. se estimulan con 15ng/mL de TNF $\alpha$  durante 16h a 37°C. Los cultivos estromales fueron incubados para establecer monocapas confluentes durante la noche a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

Tras la incubación (HS-27A estimuladas 25x10<sup>3</sup> células/pocillo y HS-5 40x10<sup>3</sup> células/pocillo), se comprueba la integridad de las monocapas en un microscopio de contraste de fases y se añaden las células de LLC. Las células LLC (1-2 x 10<sup>6</sup>/mL) preincubadas o no con inhibidores químicos en RPMI 0.1%FBS, se añadieron sobre las monocapas estromales, con un ratio de cocultivo 1:4 a 1:10 o fueron cultivadas en suspensión para su control y comparación. Se incubaron previamente durante 2h a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> para establecer la adhesión entre los diferentes tipos celulares y trascurrido este tiempo se añadieron los fármacos Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax según correspondiera, cultivándose durante 24h o 48h a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. La recogida de las células LLC para su posterior análisis fue llevada a cabo mediante lavados con RPMI cuidadosamente para mantener la integridad de las monocapas de las células estromales.

La contaminación residual con células estromales fue determinada por citometría de flujo siendo inferior al 2-4%.

#### 4.5.5. Estudio de la capacidad migratoria hacia CXCL12

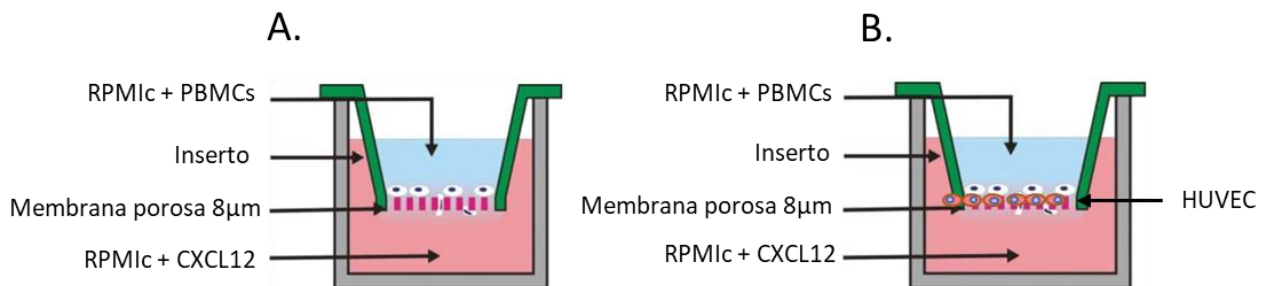
Mediante la utilización de placas transwell de 24 pocillos (Corning Incorporated, NY, USA), los cuales están formados por una cámara de dos compartimentos, superior e inferior, separados por un filtro de tereftalato de polietileno (PET), con un tamaño de poro de 5 $\mu$ m.

En el compartimento inferior se añadieron 600 $\mu$ L de medio completo RPMI 1640 suplementado con 10% SFB y 1% penicilina (100U/mL) / estreptomina 100 $\mu$ g/L (Sigma-Aldrich) con la quimioquina CXCL12 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) a concentración de 200ng/mL y en el compartimento superior se añadieron 3x10<sup>5</sup> células de LLC en 100 $\mu$ L del mismo medio completo previamente pretratadas con Ibrutinib durante 2h de incubación a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se tomaron como control otros pocillos con 600 $\mu$ L sin CXCL12 y la misma cantidad de células, además esos experimentos se realizaron por duplicado.

Así se dejaron las células migrando durante 24h a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se evaluaron las células con capacidad migratoria que atravesaron el filtro pasando del compartimento superior al inferior. Para lo cual las células se recogieron mediante el lavado de la cámara inferior y fueron marcadas con anticuerpos específicos para su posterior evaluación y conteo por citometría de flujo determinando en un tiempo determinado (60s) el número de las células adquiridas. Esta evaluación se llevó a cabo tanto de las células migradas como de aquellas no migradas.

#### 4.5.6. Ensayos de migración transendotelial

En los estudios de migración de las células de LLC hacia la citoquina CXCL12 (SFD-1), se realizó un ensayo de cámara modificada de Boyden que está formada por dos compartimentos, uno superior y otro inferior, separados por un filtro de tereftalato de polietileno (PET) con un diámetro de poro de  $5\mu\text{m}$ .



**Figura 7. A. Ensayo de quimiotaxis hacia CXCL12. B. Ensayo de migración transendotelial a través de monocapa de HUVEC hacia CXCL12**

Sobre el filtro se cultivaron las células HUVEC a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/pocillo, hasta alcanzar una monocapa de células confluyentes. Tras 6h se añadió TNF $\alpha$  15ng/mL para estimular la expresión de VCAM-1 en la membrana. Fueron incubadas durante 24h a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%.

Tras las 24h de cultivo de las HUVEC se añade a la parte superior de la cámara las células de LLC en RPMI completo, pretratadas durante 2h con Ibrutinib a 10nM y a la cámara inferior se añade el medio RPMI completo con CXCL12 a 200ng/mL y se incuban durante 24h a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. En este tiempo las células con capacidad migratoria atravesaron el filtro pasando del compartimento superior al inferior. Se recogieron las células migradas y no migradas siendo marcadas para su análisis y conteo mediante citometría de flujo en un tiempo determinado (60s) de adquisición.

#### 4.5.7. Análisis de proteínas mediante *Western blotting*

Para la obtención de los lisados celulares  $7 \times 10^6$  células de LLC fueron cultivadas durante 24 y 48h con o sin fármacos en un tampón de lisis (NP40), suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas Halt (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las muestras fueron incubadas a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 min, tras lo cual se centrifugaron durante 10 min a 3.000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  para obtener el sobrenadante con la fracción de los lisados celulares para analizar.

Para la electroforesis se emplearon geles comerciales de acrilamida con un gradiente del 10-12% al depender del tamaño de la proteína para analizar durante 2h a 120V o 225V durante 45min. La transferencia fue llevada a cabo en membranas de nitrocelulosa (Invitrogen) utilizando el equipo iBlot (Bio-Rad) durante 7 min. A continuación, se realiza el bloqueo de las membranas con TBS-Tween 1X con 5% BSA durante 1h en agitación. Tras esto se incuban con los anticuerpos primarios (Tabla 8) correspondientes en TBS-Tween 0,1% con 5%BSA durante 26h a

4°C en agitación. Posteriormente las membranas fueron lavadas 4 veces durante 5 min con TBS-Tween 1X.

Para la detección de las proteínas se lleva a cabo con el analizador Odissey (LI-COR, Lincoln, NE, USA) y la cuantificación de las bandas proteicas se llevó a cabo mediante el programa Image Studio (LI-COR). En estos ensayos se utiliza como control de carga la  $\beta$ -actina para representar las cuantificaciones relativas de las proteínas en estudio.

#### 4.6. ELISA

Para la detección de las proteínas MAPKs (ERK1/2, p38) y AKT se realizaron ensayos mediante la técnica ELISA que permite la cuantificación relativa de la proteína total y la forma fosforilada en un mismo ensayo. De tal modo que se realizó siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante. Brevemente se lisaron  $20-40 \times 10^3$  células, incubadas previamente durante 2h y 24h con Ibrutinib y se cuantificó las formas fosforiladas y las no fosforiladas de las proteínas.

Las proteínas fueron inmovilizadas en placas de 96 pocillos y la lectura colorimétrica a 460-620nm fue realizada con el lector de placas Multiskan EX (Thermo Electron Corporation) tras realizar los lavados correspondientes, añadir el sustrato y obtener la reacción.

#### 4.7. Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos en los diferentes ensayos fue realizado utilizando diferentes estadísticos en función de las características específicas de los valores a comparar.

En los estudios de experimentos independientes, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para la comparación de dos medias entre muestras independientes se utilizó el test paramétrico T de Student cuando la distribución seguida por los datos obtenidos era normal y tenían una varianza homogénea, y si estas condiciones no se cumplían se empleó el test no paramétrico U de Mann-Whitney. La significancia estadística de los experimentos se valoró mediante el estadístico *T-Student*, para muestras pareadas o no pareadas, con una o dos colas de distribución de forma correspondiente. Se realizaron análisis de regresión simple para determinar la correlación entre variables continuas. Para comprobar la significancia estadística de variables en los que no se puede asumir una distribución normal, utilizamos la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Tanto para el análisis de los resultados como para la representación gráfica de los mismos se utilizó el software de análisis GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) y los datos obtenidos fueron representados como la media +/- el error estándar (SE), considerando diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvieron valores de  $p < 0,05$ . Las diferencias estadísticamente significativas se representan en base a los siguientes valores: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,005$ .

#### 4.8. Anticuerpos

Anticuerpos utilizados en el presente trabajo:

Proteína reconocida	Procedencia	Referencia	Especie reconocida	Grado especificidad
<b>Anticuerpos primarios</b>				
CD99	Cell Signaling Technology	#16121	Ratón	Monoclonal
Bcl-2	Cell Signaling Technology	D44G8 #4223	Ratón	Monoclonal
Mcl-1	Cell Signaling Technology	#4572	Ratón	Monoclonal
$\beta$ -Actina	Cell Signaling Technology	8H10D10 #3700	Conejo	Policlonal
<b>Anticuerpos secundarios</b>				
Goat Anti-Mouse IgG Conjugated to IRDye 680RD	LI-COR	926-68070	Conejo	Policlonal
Goat Anti-Rabbit IgG Antibody Conjugated to IRDye 800CW	LI-COR	926-32211	Ratón	Policlonal
Donkey Anti-Rabbit IgG Conjugated to IRDye 800CW	LI-COR	926-32213	Ratón	Policlonal

**Tabla 10.** Anticuerpos utilizados

#### 4.9. Reactivos

Los reactivos utilizados en el trabajo fueron los siguientes

Descripción	Procedencia	Aplicación
Albumina de suero bovino (BSA)	Roche Diagnostics	Estabilización
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	Vehículo
Factor $\alpha$ de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ )	R&D Systems	Estimulación de células estromales
Idelalisib/CAL-101	Selleck Chemicals	Inhibición de PI3K $\delta$
Venetoclax	Selleck Chemicals	Inhibición de Bcl-2
Ibrutinib	Selleck Chemicals	Inhibición de BTK
Cocktail inhibidor de proteasas y fosfatasa	ThermoFisher	Inhibición de proteasas y fosfatasa en el lisado celular
CXCL12	Peptidech	Migración celular
Sybr green	Applied Biosystems	qPCR
Trypan Blue		Determinación viabilidad celular
TrisGlicina Tween		Tampón de correr geles
NP40	ThermoFisher	Lisados celulares

Kit ELISA	Invitrogen	Detección de AKT/pAKT, ERK1/2/pERK1/2, P38/pP38
NuPAGE geles	Invitrogen	Gel WB
PBS		
Blocking Buffer Odyssey TBS	LI-COR	Bloqueo membranas
Stacks de nitrocelulosa	Invitrogen	Membranas transferencia gel
SeeBlue Page Regular	Invitrogen	Estándar de pesos moleculares para la detección de proteínas en WB

**Tabla 11. Reactivos empleados**



# ***RESULTADOS***

---



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características clínicas de los pacientes

Un total de 93 muestras de 55 pacientes han sido incluidos en este estudio, 22 mujeres y 33 hombres. La media de edad de estos pacientes era de 64 años, con una media de edad al diagnóstico de 60 años. Si subdividimos en función del sexo, la media de las mujeres era de 63 años, siendo inferior a la de los hombres que fue de 66 años.

Se seleccionaron pacientes con LLC que se encontrasen en tratamiento con inhibidores de BTK: Ibrutinib (n=25), pacientes con Acalabrutinib (n=2) y con Zanabrutinib (n=2) así como 2 pacientes progresaron en el seno de tratamiento con Ibrutinib y que necesitaron otra terapia de rescate (R-CHOP o rituximab + venetoclax). Adicionalmente, se incluyeron 24 pacientes que no habían recibido ningún tratamiento. Además, se seleccionaron muestras de 5 donantes tomados del Biobanco del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, tras la firma del consentimiento informado para el estudio.

Los pacientes de este estudio se caracterizan por tener alteraciones moleculares que se deben tener en cuenta durante el transcurso y evolución de la enfermedad. De los 55 pacientes estudiados, 8 pacientes presentaban mutación de *TP53* (*TP53-M*), 15 pacientes mutación de *IGHV* (*IGHV-M*), de los cuales 6 presentaban *TP53-M* e *IGHV-NM* siendo estas alteraciones las que se correlacionan con un pronóstico adverso. 2 pacientes presentaban *TP53-M* e *IGHV-M*. 7 pacientes presentaban alteraciones en el gen *NOTCH1* de los cuales 2 presentaban también *TP53-M*. De los 55 pacientes, 3 presentaban mutación en el gen *SF3B1*, 1 de ellos con alteración en el gen *TP53*. Además, 2 pacientes presentaban alteración en el gen *BIRC3*, como se indica en la *Tabla 12*.

PACIENTE	RAI	BINET	TP53	IGHV	NOTCH1	SF3B1	BIRC3	ATM
LLC#1	II	B	NM	NM	NM	NM	M	NM
LLC#2	III	B	M	NM	NM	M	NS	NS
LLC#3	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#4	II	B	NM	M	NM	NM	NM	NS
LLC#5	0	A	NM	NM	NM	NS	NS	NS
LLC#6	II	B	NM	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#7	II	B	NM	NM	M	NM	NM	NS
LLC#8	IV	C	NM	NM	M	NM	NS	NS
LLC#9	II	B	M	NM	M	NM	NS	NS
LLC#10	II	B	NM	M	NM	NM	NM	NS
LLC#11	0	A	NM	NM	NS	NS	NS	NS
LLC#12	II	B	NM	M	NM	NM	NS	NS
LLC#13	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#14	IV	C	NM	M	NM	NM	NM	NS
LLC#15	II	B	NM	M	M	M	NS	NS
LLC#16	III	C	NM	NM	NM	NM	NM	NS

*Impacto de las alteraciones biológicas y moleculares en el microambiente estromal de la leucemia linfocítica crónica tratada con nuevos fármacos*

LLC#17	I	B	NM	M	NM	NM	NS	NS
LLC#18	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#19	II	B	M	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#20	II	B	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#21	II	B	NM	M	NM	NM	NM	NS
LLC#22	II	B	NM	M	NM	NM	NM	NS
LLC#23	II	B	NM	M	NM	NM	NM	NS
LLC#24	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#25	IV	B	NM	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#26	II	B	M	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#27	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#28	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#29	0	A	NM	NM	NM	M	NM	NS
LLC#30	II	B	NM	NM	NM	NM	NM	NM
LLC#31	II	B	NM	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#32	III	C	NM	M	NM	NM	NM	NS
LLC#33	0	A	NM	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#34	IV	C	M	M	M	NM	NM	NS
LLC#35	II	B	M	M	NM	NM	NM	NS
LLC#36	II	B	NM	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#37	IV	C	NM	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#38	II	B	NM	NM	M	NM	NM	NM
LLC#39	IV	C	NM	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#40	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#41	IV	C	NM	NM	NM	NM	NM	NM
LLC#42	III	C	NM	NS 2 clones	NM	NM	NM	NS
LLC#43	0	A	NM	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#44	II	B	NM	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#45	II	B	M	NM	NM	NM	NM	NS
LLC#46	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#47	I	B	NM	NM	NM	NM	M	NS
LLC#48	0	A	NM	M	NM	NM	NM	NS
LLC#49	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#50	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#51	0	A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
LLC#52	I	B	NM	M	NM	NM	NM	NS
LLC#53	0	A	NM	NM	M	NM	NM	NS
LLC#54	I	B	NM	M	NM	NM	NM	NS
LLC#55	I	B	M	NM	NM	NM	NM	NS

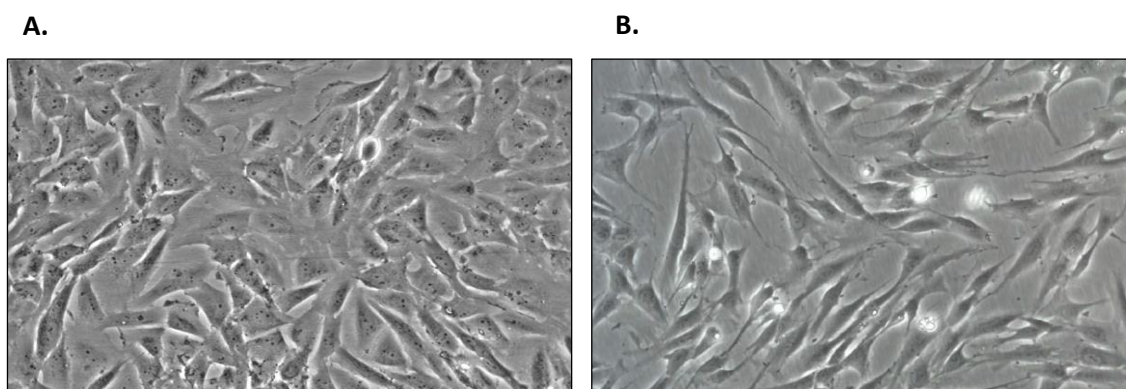
**Tabla 12.** Características moleculares de los pacientes analizados en el estudio. M: mutado, NM: no mutado, NS: no determinado.

## 5.2. Análisis de la expresión de CD99 y CD49d bajo el tratamiento con Ibrutinib.

El microambiente estromal de la médula ósea tiene un papel muy importante durante el transcurso de la enfermedad dada la importancia del buen funcionamiento de la misma, para preservar la producción de precursores hematopoyéticos. Además, también tiene un papel destacado en la adhesión, migración y apoptosis de los Linfocitos B clonales. Como las células estromales son el principal componente de la médula ósea, nos propusimos estudiar la influencia de las señales del microambiente en la respuesta de las células de LLC a los tratamientos dirigidos a dianas específicas, estudiando primero la respuesta a Ibrutinib y posteriormente a Idelalisib y Venetoclax.

En nuestro estudio utilizamos las líneas celulares de HS-27A y HS-5 que replican las condiciones *in vivo* del microambiente tumoral de manera *in vitro*.

Así pues, con el fin de establecer cuál es el papel que tendría el microambiente tumoral de la LLC en la terapia con los nuevos inhibidores de la ruta del BCR, estudiamos en primer lugar el efecto de Ibrutinib en la expresión de CD99 y CD49d en células de LLC morfonucleadas de sangre periférica (PBMCs) cocultivadas con células de estroma.



**Figura 8. Cultivo primario de células estromales.** Imagen al microscopio óptico de contraste de fases de A. la línea de cultivo primario HS-5 y B. la línea de cultivo primario HS-27A.

Para este estudio se han incluido muestras de 5 controles sanos y 55 pacientes. Se cultivaron las células de LLC en suspensión sobre células HS-5, en presencia de 10 $\mu$ M Ibrutinib, se determinó la viabilidad celular por trypan blue previo al cultivo conjunto y así como a las 24h y 48h de cocultivo.

Se analizaron por citometría de flujo los niveles de CD99 y CD49d a partir de las IMF obtenidas y se representa su incremento en forma de ratio (figura 9), referenciándolo al control del isotipo y diferenciando las subpoblaciones establecidas: linfocitos B (LB), linfocitos T (LT) y monocitos (MON).

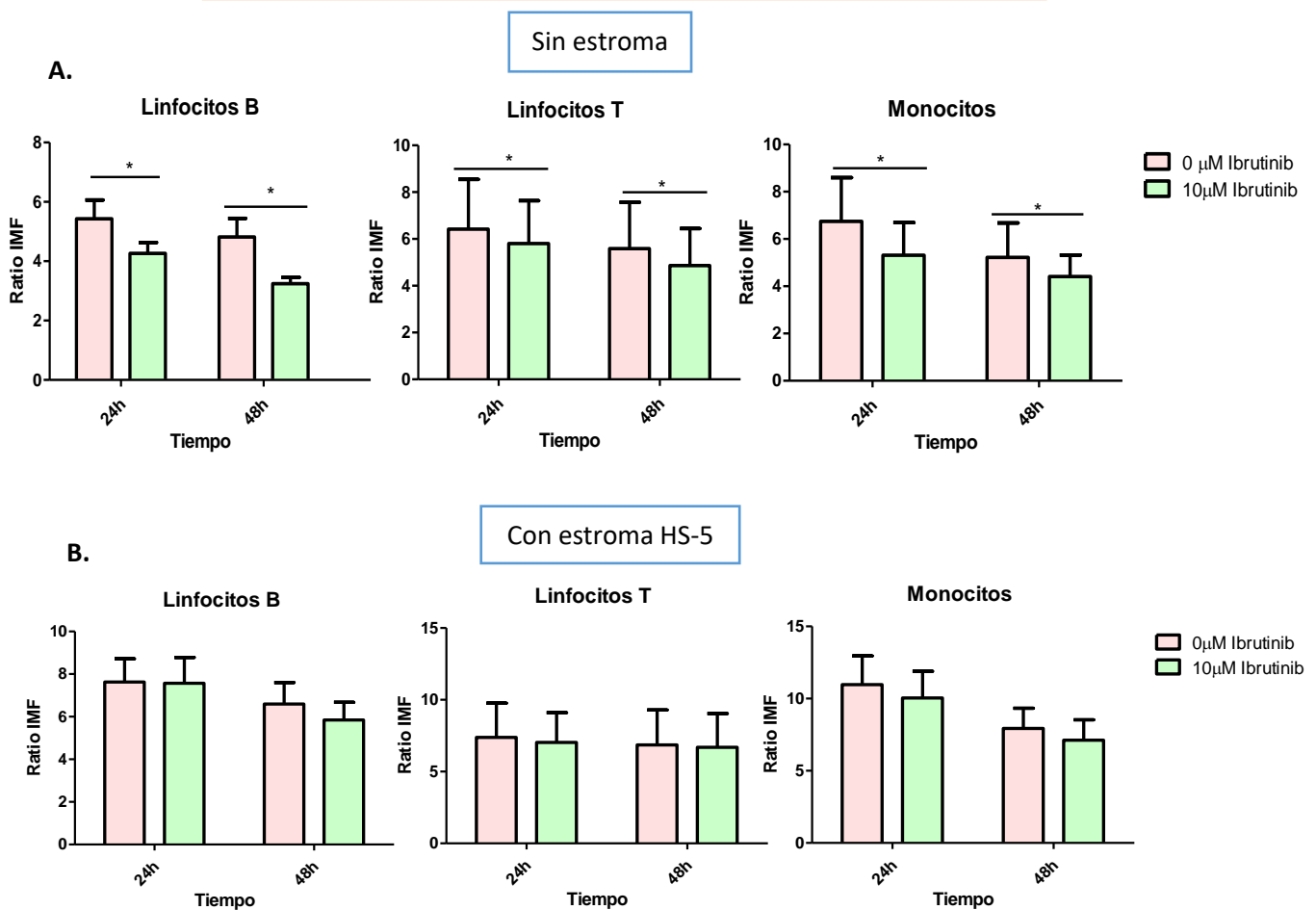
Cuando cocultivamos las células de la LLC preincubadas durante 2h con Ibrutinib, en concreto las poblaciones de linfocitos B, T y monocitos, en presencia de células del estroma, observamos a distintos tiempos, tanto a las 24h como a las 48h, que las diferencias de expresión

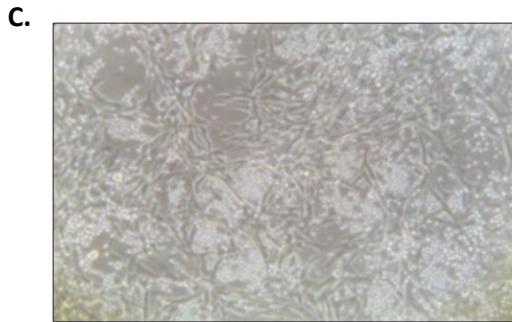
de CD99 no eran significativas (Figura 9 B), mientras que en ausencia de estroma HS-5, las 3 poblaciones celulares, presentan un cambio en la expresión de esta proteína (Figura 9 A).

A continuación, estudiamos si las células HS-27A producían el mismo efecto sobre las células de LLC expuestas a Ibrutinib. Las células HS-27A también contribuyen en la reducción de la apoptosis al observar la viabilidad de las células mediante trypan blue. De tal forma que en el cocultivo del estroma HS-27A con las células de LLC, la reducción de la expresión de CD99 no es significativa en comparación con el cultivo de las células de LLC en ausencia de estroma. (HS-27A  $P=0,76$  y HS-5  $P=0,58$ ).

Los linfocitos B (LB) de los pacientes con LLC presentan una expresión menor de CD99 al igual que ocurre en linfocitos T (LT) y monocitos (MON) como se muestra en la figura 9. ( $P=0.0027$ ). Siendo el ratio Linfocitos B (LB)-24h=6; ratio LB-24h+IB=4; ratio LB-48h=4,8; ratio LB-48h+IB=3,1; ratio Linfocitos T (LT)-24h=6,4; ratio LT-24h+IB=5,8; ratio LT-48h=5,6 ratio LT-48h+IB=4,7; ratio Monocitos (MON)-24h=6,74; ratio MON-24h+IB=5,3; ratio MON-48h=5,2 ratio MON-48h+IB=4,3 .

### Expresión de CD99 en células LLC tratadas con Ibrutinib 24h y 48h

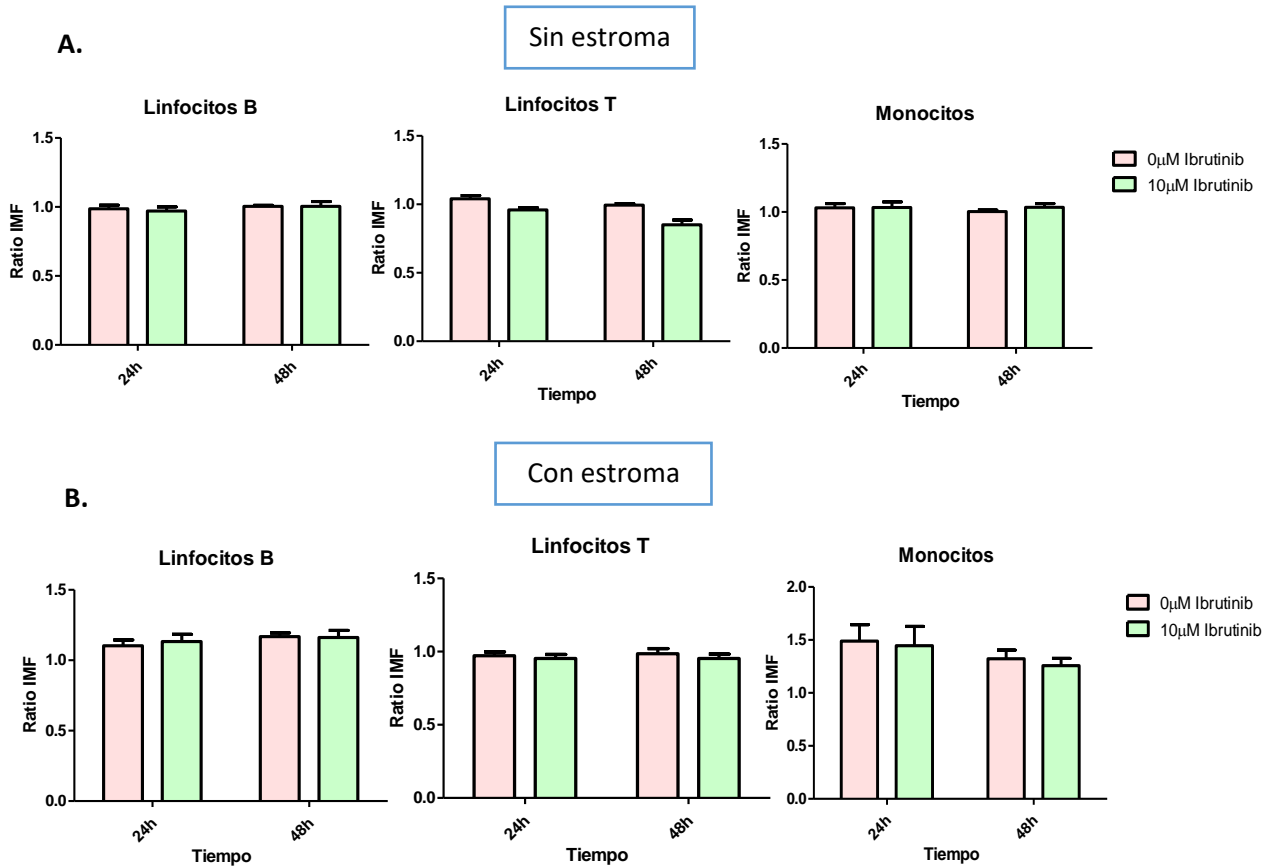




**Figura 9:** A. Ratio IMF de CD99 en la población Linfocitos B, T y monocitos sin estroma, \*P≤0.05  
 B. Ratio IMF de CD99 en la población Linfocitos B, T y monocitos con estroma \*P≤0.05. N=86 muestras de N=55 pacientes  
 C. Cocultivo de PBMCs con línea primaria de estroma HS-5 al microscopio de contraste de fases aumento X20.

En el estudio de la expresión de CD49d en el cultivo durante 24h y 48h con Ibrutinib observamos que no presentaban diferencias significativas al igual que bajo el cocultivo con células de estroma HS-5 (Figura 10).

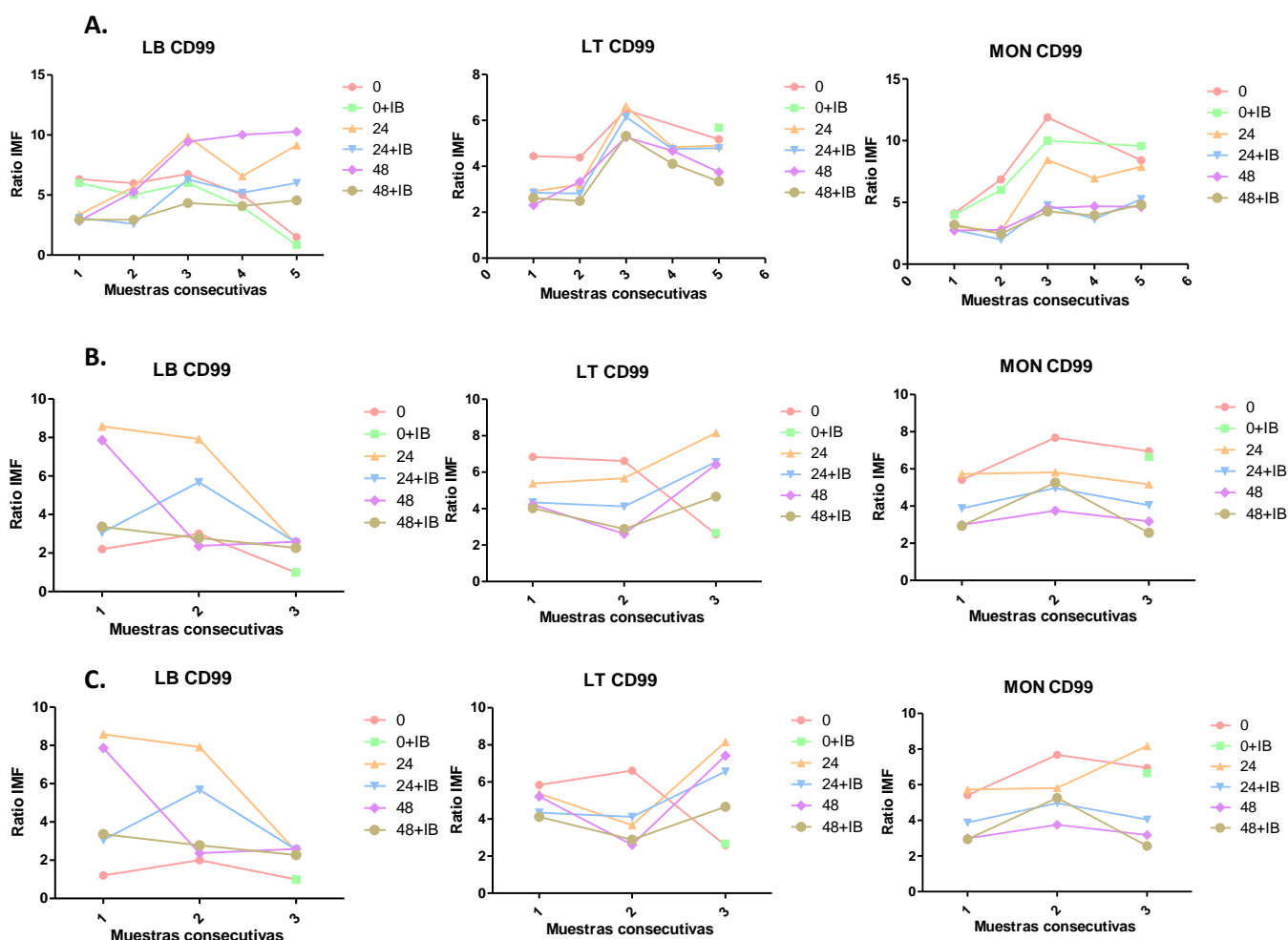
Expresión de CD49d en células LLC tratadas con Ibrutinib 24h y 48h

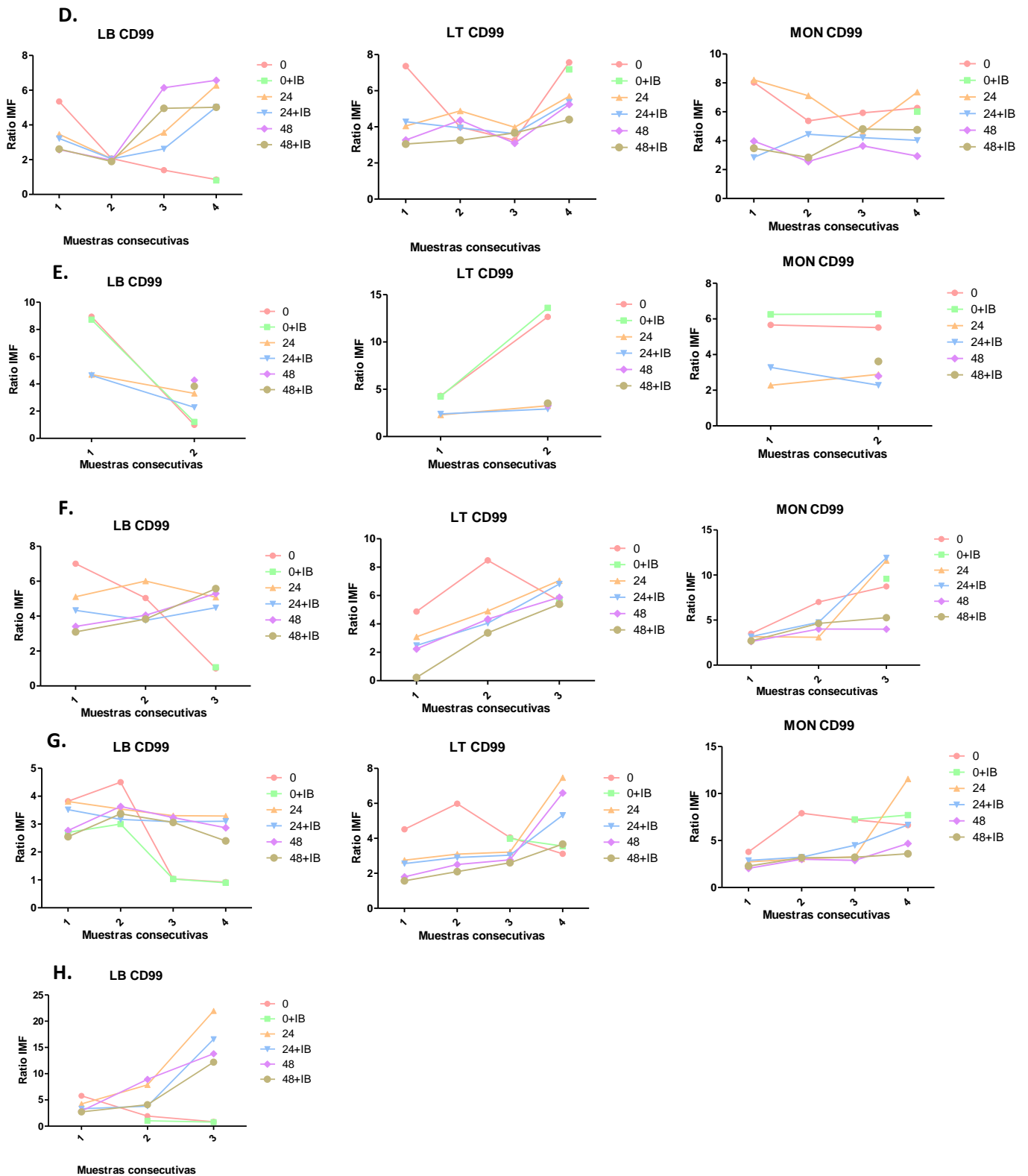


**Figura 10:** A. Ratio IMF de CD49d en la población Linfocitos B, T y monocitos sin estroma. B. Ratio IMF de CD49d en la población Linfocitos B, T y monocitos con estroma HS-5. N=86 muestras de N=55 pacientes.

Además, profundizando en el estudio del nivel de expresión, de las muestras consecutivas de los pacientes, observamos que había una progresión en la disminución de CD99 tras el tratamiento *in vitro* con Ibrutinib. No obstante, seleccionando los pacientes, vimos que con el paciente A tratado con Ibrutinib (figura 11A) del cual tomamos muestras cada 3 meses, del paciente B del que tomamos muestras cada mes y del paciente C, CD99 se comporta de distinta manera, pero podemos ver que la administración de Ibrutinib *in vitro* en todos los casos disminuye el nivel de expresión de CD99. Al igual que ocurre con los pacientes no tratados figura 11 D, E, F en los que tras el tratamiento *in vitro* con Ibrutinib disminuyen los niveles de CD99.

Así podemos concluir que el nivel de expresión de CD99 de cada paciente es diferente debido a la heterogeneidad intratumoral característica de la LLC, pero al analizar todos los resultados de manera conjunta observamos que CD99 disminuye tras la incubación *in vitro* con Ibrutinib como muestra la figura 9.





**Figura 11.** Representación del nivel de expresión de CD99 en una selección de pacientes: A. Paciente tratado con Ibrutinib, B. Paciente tratado con Ibrutinib, C. Paciente tratado con Ibrutinib, D. Paciente no tratado, E. Paciente no tratado, F. Paciente no tratado, G. Paciente no tratado, H. Paciente no tratado.

Por otro lado, el nivel de expresión de CD49d del conjunto de los pacientes tras el tratamiento con Ibrutinib, no muestra diferencias entre muestras consecutivas de pacientes tratados o sin tratar, como muestra la figura 10.

### 5.3. Expresión de CD99 y CD49d bajo el tratamiento con Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax.

Para el estudio del papel de los nuevos fármacos como Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax en las células de LLC, evaluamos la diferencia de expresión de CD99 y CD49d mediante citometría de flujo, al estar ambas moléculas implicadas en la migración celular y la invasión de tejidos, favoreciendo así la progresión tumoral.

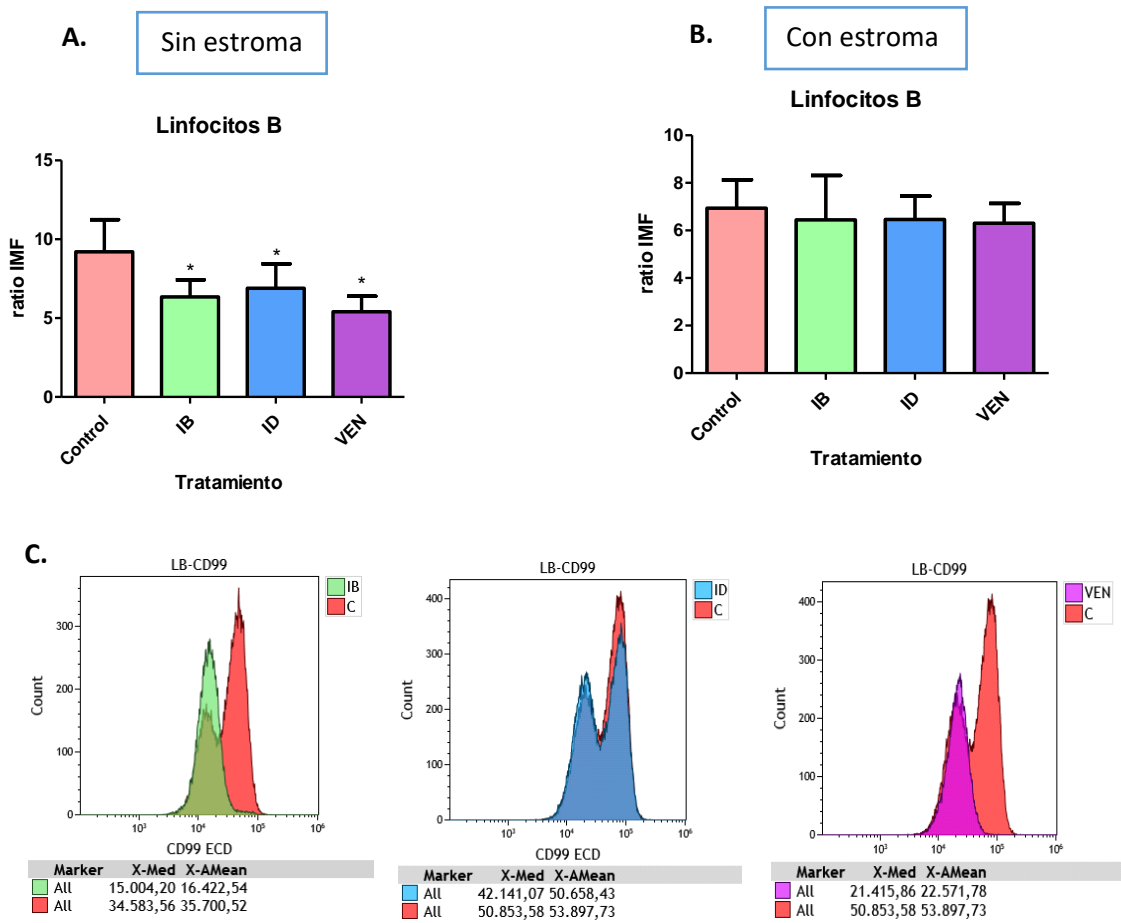
Como anteriormente se valoró la influencia de los fármacos a las 2h, las 24h y las 48h y vimos que las células de LLC tratadas *in vitro* con 10 $\mu$ M Ibrutinib disminuían la intensidad de fluorescencia media de la expresión de CD99 (Figura 9). Posteriormente, quisimos evaluar el efecto de otros fármacos inhibidores de dianas concretas en la ruta del BCR como son Idelalisib (inhibidor de PI3K) y Venetoclax (inhibidor de Bcl-2), actualmente utilizados en el tratamiento de la LLC.

Así pues, comparamos el papel que tendría el microambiente tumoral de la LLC sobre CD99 y CD49d, al tratar previamente el cultivo de PBMCs durante 2h con 10 $\mu$ M Ibrutinib, 10 $\mu$ M Idelalisib y 10nM venetoclax en ausencia o presencia de células de estroma. Estas condiciones replican el entorno *in vivo* de las células de LLC en el microambiente tumoral. Las determinaciones se hicieron tras 24h y 48h de exposición a los fármacos.

No obstante, observamos que la expresión de CD99 en las células de LLC cultivadas en ausencia de estroma bajo los tres tratamientos a las 24h muestran una disminución significativa. Siendo la diferencia de expresión de CD99 bajo el tratamiento con venetoclax ( $P=0,044$ ) menor que la disminución que ejerce Ibrutinib ( $P=0,02$ ), pero a su vez es mayor que la ejercida por Idelalisib ( $P=0,05$ ). (Figura 12)

De tal manera que analizando en segundo lugar el efecto del estroma, vimos que al igual que ocurría en la terapia con Ibrutinib (Figura 9B), el estroma no disminuye significativamente los niveles de expresión de CD99 bajo el tratamiento con Venetoclax ni con Idelalisib, no produciendo grandes cambios como se observa en la Figura 12 B.

Expresión de CD99 en células LLC tratadas con Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax:



**Figura 12.** A. Expresión de CD99 en ausencia de estroma en células de LLC bajo Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax en linfocitos B, T y monocitos, \*P≤0.05. N=20. B. Expresión de CD99 como ratio de IMF en presencia de estroma bajo el tratamiento de Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax en linfocitos B, T y monocitos, P≥0.05. N=20. C. Histogramas de citometría de flujo de los Linfocitos B (LB) en los 3 tratamientos comparados con el control. \*P≤0.05

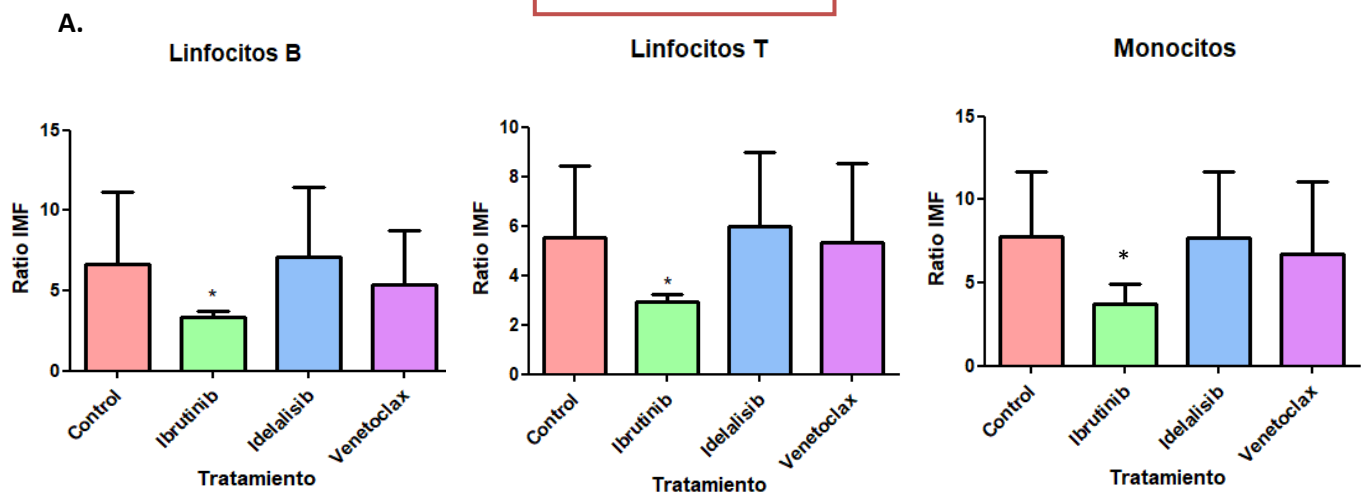
Tras estos resultados, nos planteamos si podríamos subdividir los pacientes en función de las alteraciones moleculares de *TP53* e *IGHV* y ver si podría haber alguna diferencia entre esos grupos en la expresión de CD99 y CD49d. Para ello, como previamente habíamos estudiado que en presencia de estroma no hay disminuciones significativas bajo el tratamiento con los 3 fármacos, decidimos analizar si en la ausencia del estroma se producía algún efecto diferente entre grupos.

Al realizar la comparación observamos que en los pacientes con las características *TP53*-M e *IGHV*-NM sólo el Ibrutinib producía una disminución significativa de los niveles de CD99 en los tres grupos estudiados: *TP53*-M *IGHV*-NM LB+IB P=0.041, LT+IB P=0.05, MON +IB P=0.05. (Figura 13 A)

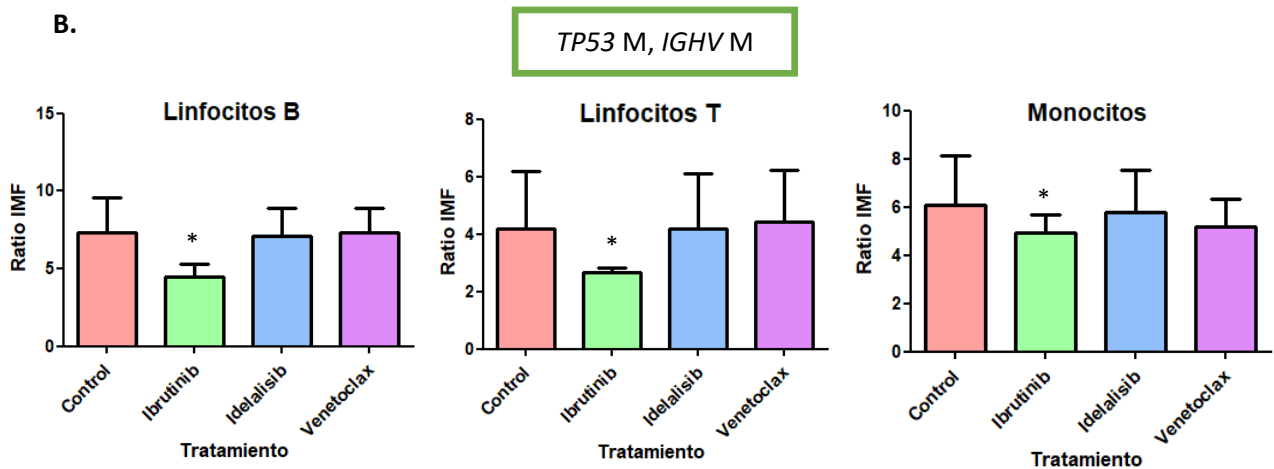
De igual forma, el grupo de pacientes con *TP53*-M e *IGHV*-M, sólo el tratamiento con Ibrutinib producía una disminución significativa del nivel de expresión de CD99, tanto en Linfocitos B como en Linfocitos T y Monocitos (*TP53*-NM *IGHV*-M LB+IB P=0.0341, LT+IB P=0.05, MON +IB P=0.05) (Figura 13 B).

Expresión de CD99 en ausencia de estroma en células de LLC  
bajo Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax:

*TP53* M, *IGHV* NM



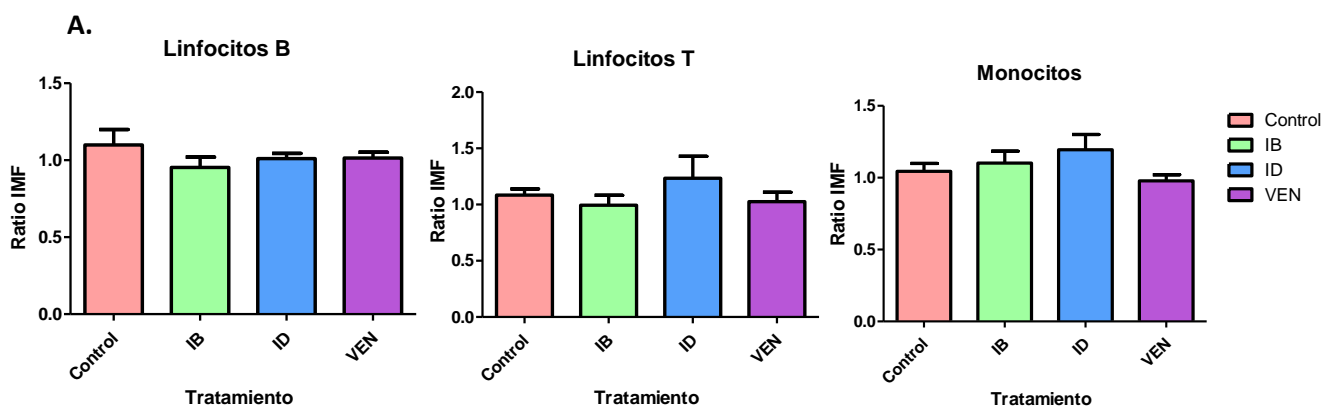
Expresión de CD99 en ausencia de estroma en células de LLC bajo Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax:



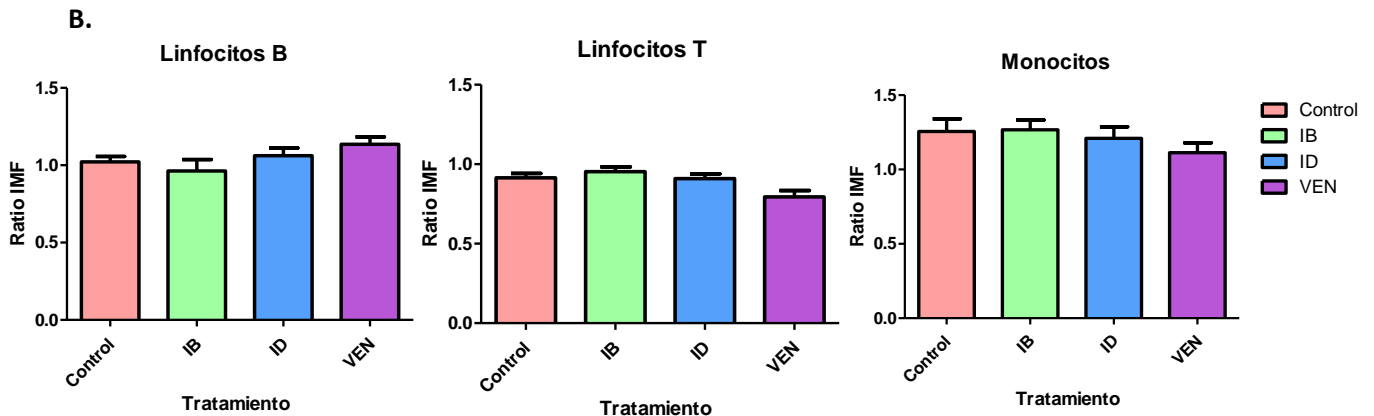
**Figura 13.** Expresión de CD99 en ausencia de estroma en pacientes LLC bajo Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax en linfocitos B, T y monocitos, \* $P \leq 0.05$  y  $P \geq 0.05$ , A. Pacientes con TP53 M, IGHV NM N=6 pacientes, B. Pacientes con TP53 M, IGHV M N=2 pacientes.

Como estudiamos previamente en el caso de CD99 (figura 9), el tratamiento con Ibrutinib de PBMCs en cocultivo con estroma no disminuía significativamente, al igual que ocurre con la expresión de CD49d bajo Ibrutinib (figura 10) independientemente de la presencia de estroma. A su vez el tratamiento con Idelalisib o Venetoclax, no afectaban significativamente la expresión de CD49d en linfocitos B, T o en monocitos cultivados independientemente o en presencia de estroma (Figura 14).

Expresión de CD49d en ausencia de estroma en células de LLC bajo Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax:



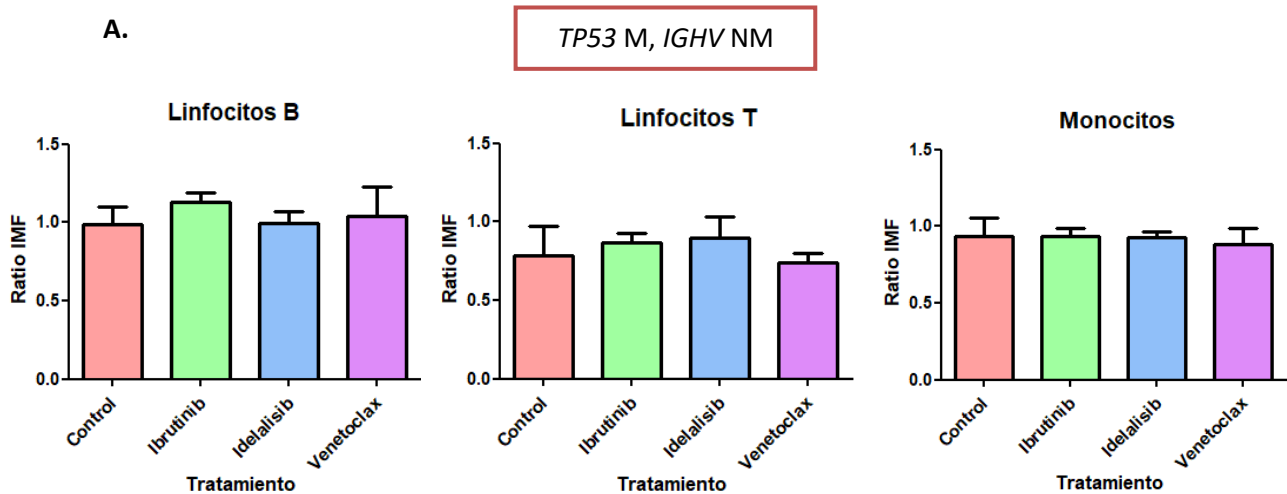
Expresión de CD49d en presencia de estroma en células de LLC  
bajo Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax:

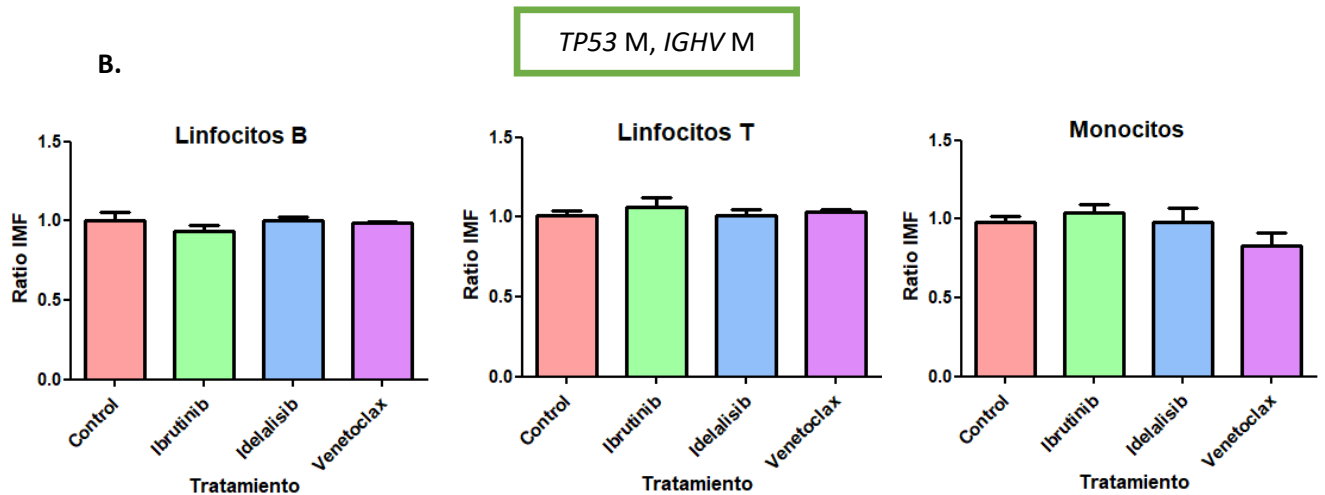


**Figura 14. A.** Representación del nivel de expresión de CD49d en linfocitos B, T y monocitos,  $P \geq 0.05$  bajo el tratamiento con Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax en células LLC en presencia de estroma. **B.** Representación del nivel de expresión de CD49d en linfocitos B, T y monocitos,  $P \geq 0.05$  bajo el tratamiento con Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax en células LLC en ausencia de estroma  $N=20$

En la subdivisión de pacientes en función de sus alteraciones genéticas de *TP53* y de *IGHV*, conocidos marcadores de un peor pronóstico, vimos que tampoco mostraban diferencias en presencia de estroma como se muestra en la Figura 15. Por tanto, no se apreciaron diferencias significativas en la expresión de CD49d cuando se subdividen los pacientes en función de sus alteraciones genéticas.

Expresión de CD49d en ausencia de estroma en células de LLC  
bajo Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax:

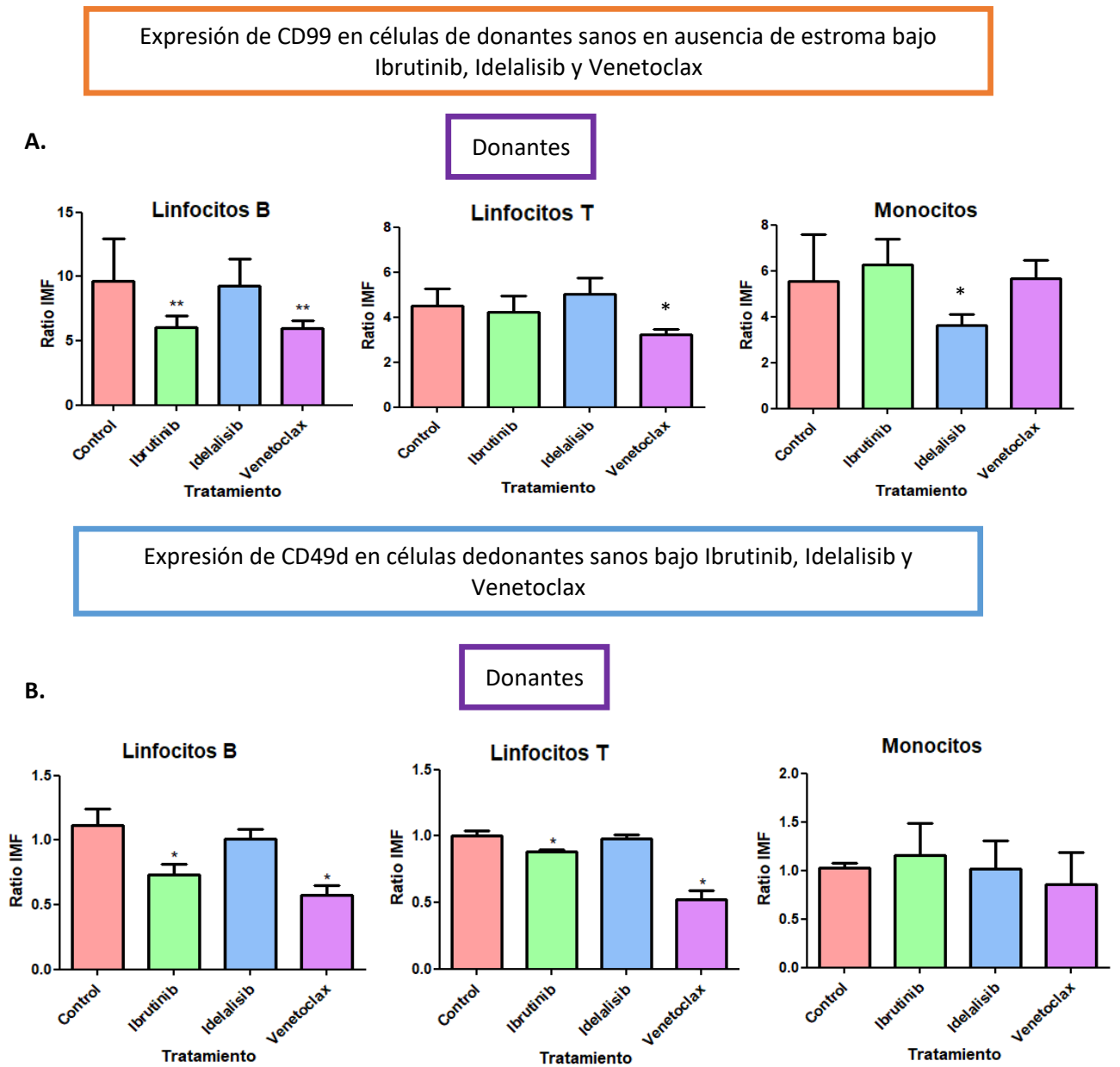




**Figura 15.** Representación del nivel de expresión de CD49d en ausencia de estroma en células LLC bajo Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax en linfocitos B, T y monocitos,  $P \geq 0.05$ , **A.** Pacientes con *TP53* NM, *IGHV M* N=6 pacientes, **B.** Pacientes con *TP53 M*, *IGHV M* N=2 pacientes

No obstante, en la caracterización de la expresión de CD99 en células PBMCs de donantes observamos que bajo el tratamiento con Ibrutinib solo en los linfocitos B se apreciaron diferencias significativas ( $P=0,05$ ), mientras que en linfocitos T y monocitos no se apreciaron este descenso en la expresión de CD99. Al comparar con Idelalisib y venetoclax, vimos que Venetoclax ejerce una disminución de los niveles de expresión de CD99 sobre los linfocitos B ( $P=0,028$ ) y linfocitos T ( $P=0,03$ ). Mientras que Idelalisib solo presentaba disminución en los monocitos ( $P=0,035$ ). (Figura 16 A)

En la expresión de CD49d en las células de los donantes sanos, se observó una disminución significativa en linfocitos B y T bajo el tratamiento con Ibrutinib (LB  $P=0,0286$ , LT  $P=0,045$ ) y con Venetoclax (LB  $P=0,025$ , LT  $P=0,028$ ), mientras que el cultivo de los PBMCs con Idelalisib no presenta diferencias a las 24h. En los monocitos, ningún tratamiento presenta diferencias respecto al control. (Figura 16 B)



**Figura 16. A.** Representación del nivel de expresión de CD99 en ausencia de estroma en donantes bajo Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax en linfocitos B, T y monocitos, \* $P \leq 0.05$ , **B.** Representación del nivel de expresión de CD49d en ausencia de estroma en donantes bajo Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax en linfocitos B, T y monocitos, \* $P \leq 0.05$  N=5.

Al comparar los niveles de expresión de CD99 y CD49d entre las poblaciones de donantes y pacientes no podemos establecer si hay diferencias significativas al tener los pacientes una gran heterogeneidad en los valores, no obstante, en ambos grupos se mantiene la disminución de los niveles de CD99 de manera significativa bajo el tratamiento con Ibrutinib en las poblaciones de Linfocitos B. Por otra parte, en los donantes se produce una disminución de los niveles de expresión de CD49d en Linfocitos B y Linfocitos T, siendo las diferencias asociadas a Ibrutinib significativas, tanto a las 24h como a las 48h.

**5.4. Efecto de Ibrutinib sobre la capacidad de migración de las células de LLC hacia CXCL12**

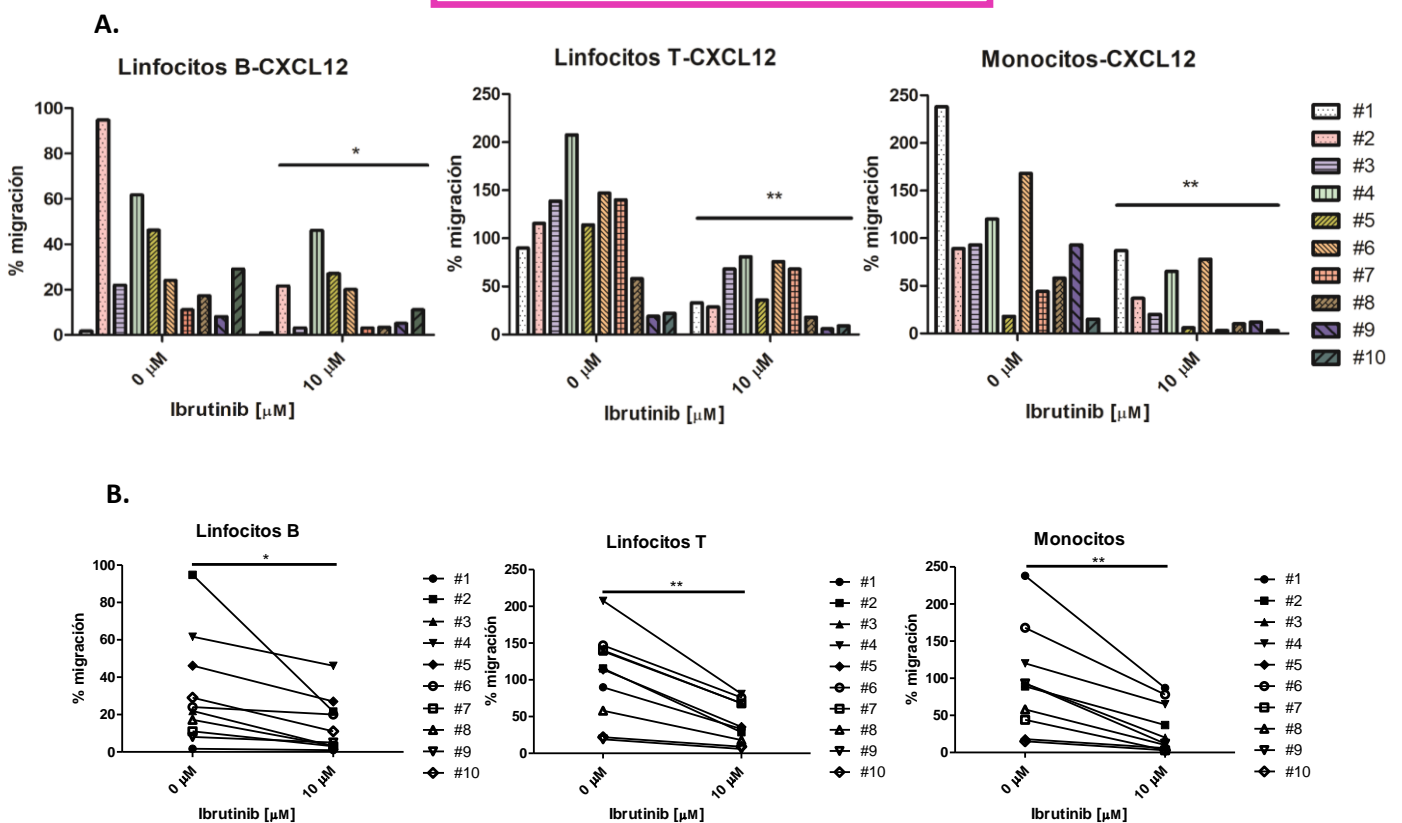
Para profundizar más en el efecto de Ibrutinib decidimos poner a punto un sistema de activación *in vitro* con el estímulo de CXCL12, hacia el cual las células PBMCs de pacientes de LLC, son atraídas y migrarían, replicando así los estímulos provenientes del microambiente celular.

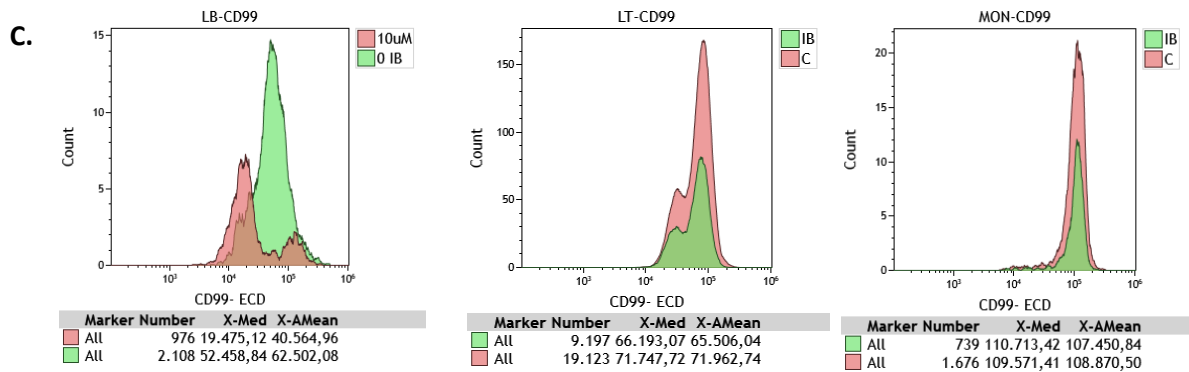
Así dado que CD99 está implicado en los procesos de migración celular, nos planteamos qué es lo que ocurriría en la migración celular, al ser CXCL12 el ligando de CXCR4, que se encuentra sobreexpresado en las células de la LLC.

De tal manera que se observó que la capacidad migratoria de las poblaciones de Linfocitos B, T y Monocitos disminuía tras 24h de incubación con Ibrutinib y en estos casos planteamos ver qué ocurría con los valores de CD99 y observamos que se replicaba lo previamente estudiado, es decir, había una disminución tras el tratamiento con Ibrutinib en las poblaciones observadas como ocurría en los ensayos de cocultivo descritos anteriormente.

Se analizó la migración como % de células migradas hacia CXCL12 (SDF-1) con respecto a las células iniciales *input* (n=10), incubadas durante 24h con Ibrutinib, mediante el conteo de las células por citometría de flujo durante 60s. Resultando ser significativamente menor bajo el tratamiento con Ibrutinib (migración LB P=0,03; migración LT P=0,006; migración MON P=0,0068) como muestra la figura 17, disminuyendo en LB 2,2 veces la media de la capacidad migratoria, en LT disminuye 2,5 veces y en MON disminuye 2,9 veces la media de la capacidad migratoria bajo el tratamiento.

Migración en células de LLC bajo Ibrutinib





**Figura 17. A.** Capacidad migratoria expresada en % de migración de linfocitos B, T y monocitos, siendo el %migración linfocitos B \* $P \leq 0.05$ , %migración linfocitos T \*\* $P \leq 0.05$ , %migración monocitos \*\* $P \leq 0.05$  **B.** Disminución del % de migración bajo Ibrutinib a las 24h N=10 **C.** Histogramas de citometría de flujo de CD99 en las poblaciones de linfocitos B, T y monocitos.

### 5.5. Capacidad de migración transendotelial hacia CXCL12

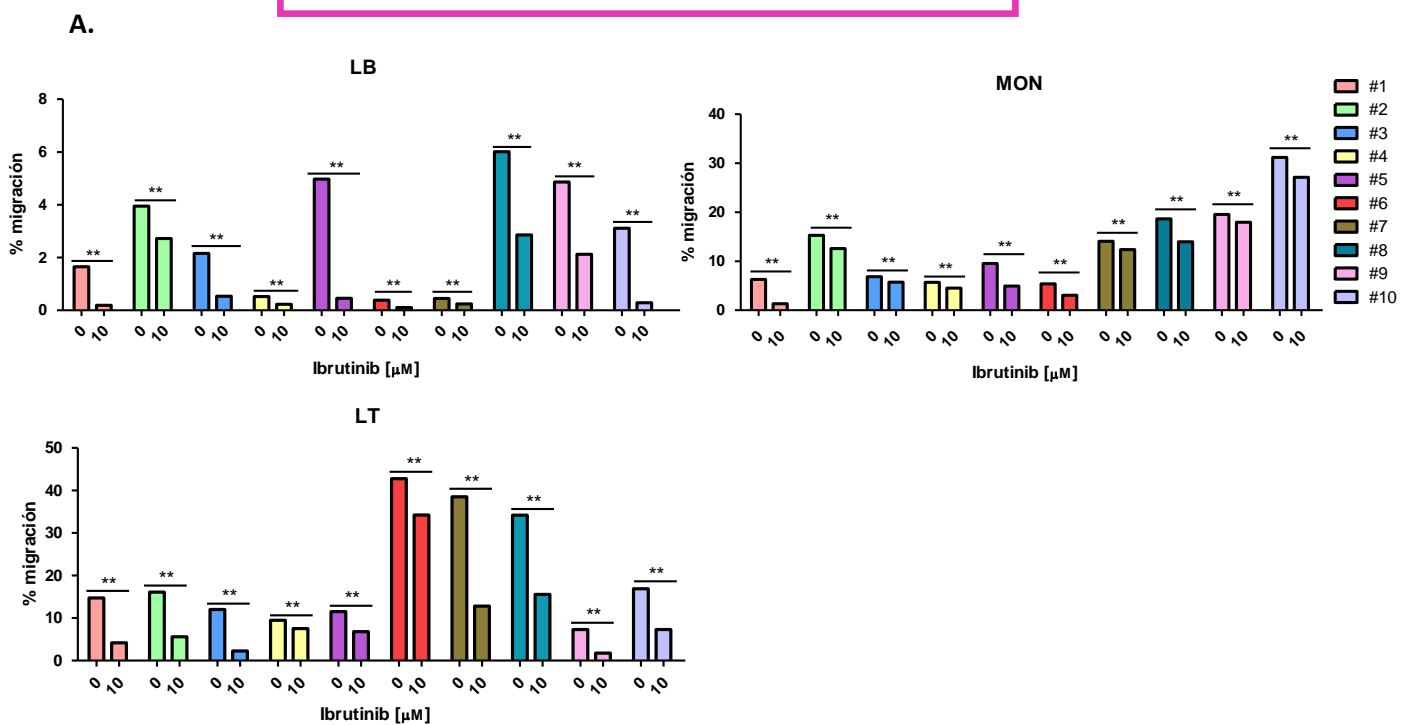
Por otro lado, la disminución de la migración celular mediada por la CXCL12 previamente observada nos llevó a plantearnos si en la migración transendotelial ocurriría algo similar.

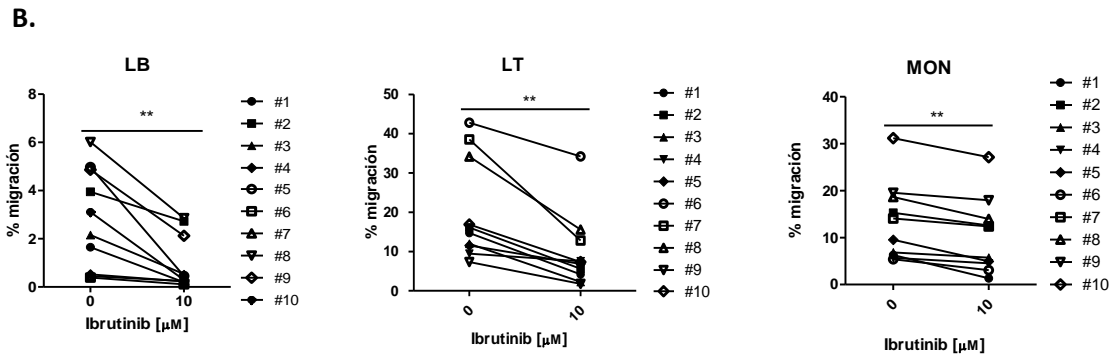
La migración transendotelial y la invasión celular, en la que tiene un papel muy importante CXCL12, contribuyen a la progresión de la enfermedad, de tal forma que evaluamos el efecto que podría tener Ibrutinib en la migración de las células de LLC a través de células endoteliales (HUVEC) en respuesta a CXCL12.

De la misma manera que ocurría con la migración por quimiotaxis hacia CXCL12, las tres poblaciones estudiadas mostraban una disminución del porcentaje de células migradas a través de la monocapa de HUVEC. (Media del % migración de LB=2,8 , Media del % migración de LB + IB= 0,9 P=0,0194; Media del % migración de LT=20,36 , Media del % migración de LT + IB=9,8 P=0,01; Media del % migración de MON=13,36 , Media del % migración de MON + IB=10,3 P=0,02;). Confirmando así que bajo el tratamiento con Ibrutinib hay una disminución de la expresión de CD99 y reafirmando además su papel en la migración al disminuir a su vez el número de células migradas tras el tratamiento (Figura 18).

Tras la incubación con Ibrutinib, la migración transendotelial de los linfocitos B disminuyen a las 24h en 3 veces de media, mientras que en linfocitos T en 2 veces de media y monocitos 1,2 veces de media del % de migración.

Migración transendotelial en células de LLC bajo Ibrutinib



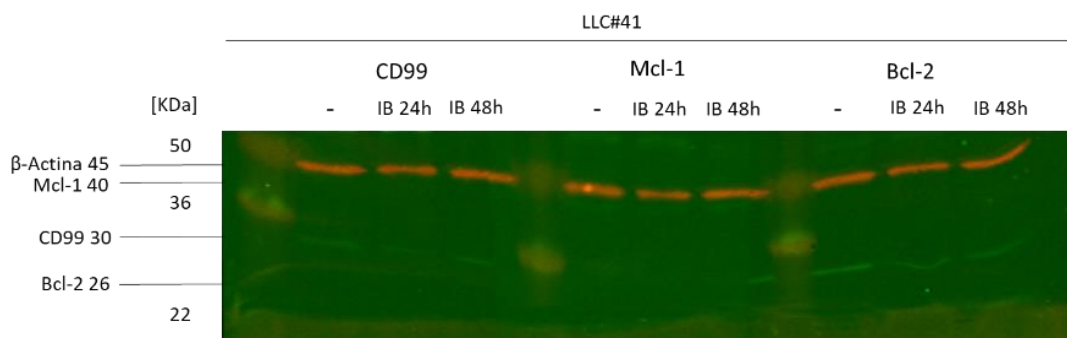


**Figura 18.** Capacidad migratoria de las PBMCs de LLC a través de una monocapa de células endoteliales HUVEC expresada en % de migración de linfocitos B, T y monocitos. **A.** Representación gráfica del % de migración, **B.** Disminución del % de migración bajo Ibrutinib a las 24h. N=10

### 5.6. Caracterización de las proteínas implicadas en la señalización y supervivencia celular

Quisimos caracterizar los mecanismos moleculares subyacentes observados anteriormente bajo el tratamiento con Ibrutinib. De tal forma que para determinar si la modulación de Ibrutinib previamente observada en CD99 mediante citometría se correlaciona con diferencias en la expresión a nivel de proteína, se analizó mediante *Western blotting* (WB) la expresión de la proteína CD99, y de las proteínas principales implicadas en la regulación de la apoptosis en la LLC de la familia de Bcl-2 como son Bcl-2, y Mcl-1, ya que Ibrutinib es capaz de inducir apoptosis.

Para establecer cómo influye Ibrutinib en la expresión de las proteínas CD99, Bcl-2 y Mcl-1, se analizó mediante WB las células incubadas ( $5 \times 10^6$ ) durante 24h o 48h utilizando como control la  $\beta$ -actina. Y vemos que tanto a las 24h como a las 48h Ibrutinib ejerce su acción a nivel de proteína, provocando en CD99 y Mcl-1 una disminución, mientras que en Bcl-2 se aprecia una pequeña disminución de los valores no significativa. (Figura 19)



**Figura 19.** Expresión de CD99, Mcl-1 y Bcl-2 en células de LLC. Comparación del tratamiento con Ibrutinib 10  $\mu$ M a 24h y 48h en las proteínas estudiadas, CD99, Mcl-1 y Bcl-2 mediante *Western blotting*.

Quisimos profundizar más en la expresión de CD99 ya que se expresa en la superficie de la membrana celular, estudiamos el cambio en presencia o ausencia de Ibrutinib con el fin de establecer si se modula la expresión a nivel de proteína durante 24h.

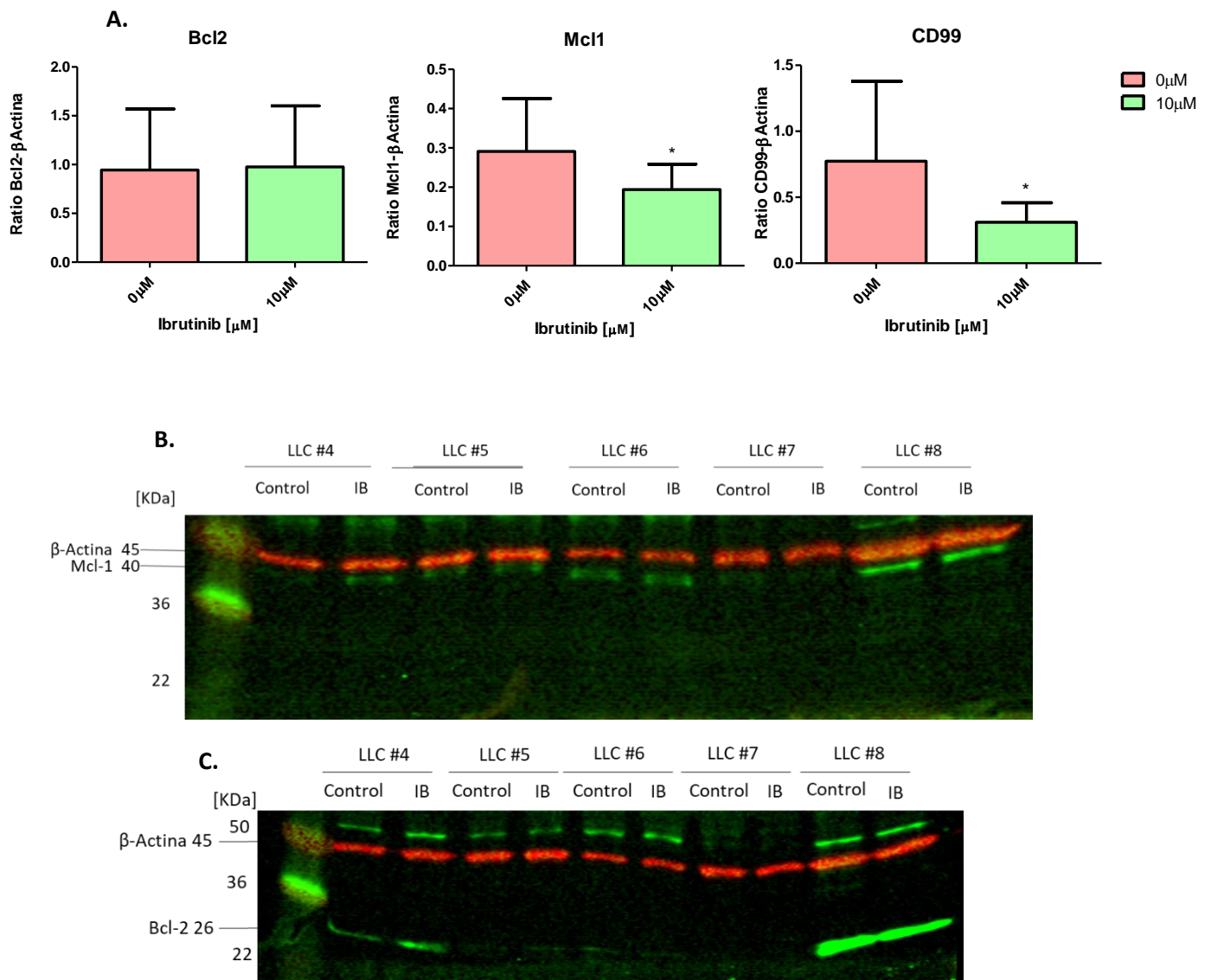
Los niveles de Bcl-2 tras el tratamiento con Ibrutinib permanecen sin cambios significativos, mientras que Mcl-1 disminuye sus niveles de manera significativa ( $P=0,05$ ) al igual que ocurre con los niveles de CD99. La figura 20 muestra que, los niveles de CD99 son significativamente menores ( $P=0,02$ ) disminuyendo 2,5 veces de media (ratio CD99- $\beta$ Actina=0,78 , ratio CD99- $\beta$ Actina + IB=0,31) en las células tratadas con Ibrutinib respecto de las células, control no tratadas, y los niveles de Mcl-1 muestran una disminución en 1,5 veces de media (ratio Mcl-1- $\beta$ Actina=0,29 , ratio Mcl-1- $\beta$ Actina + IB=0,19).

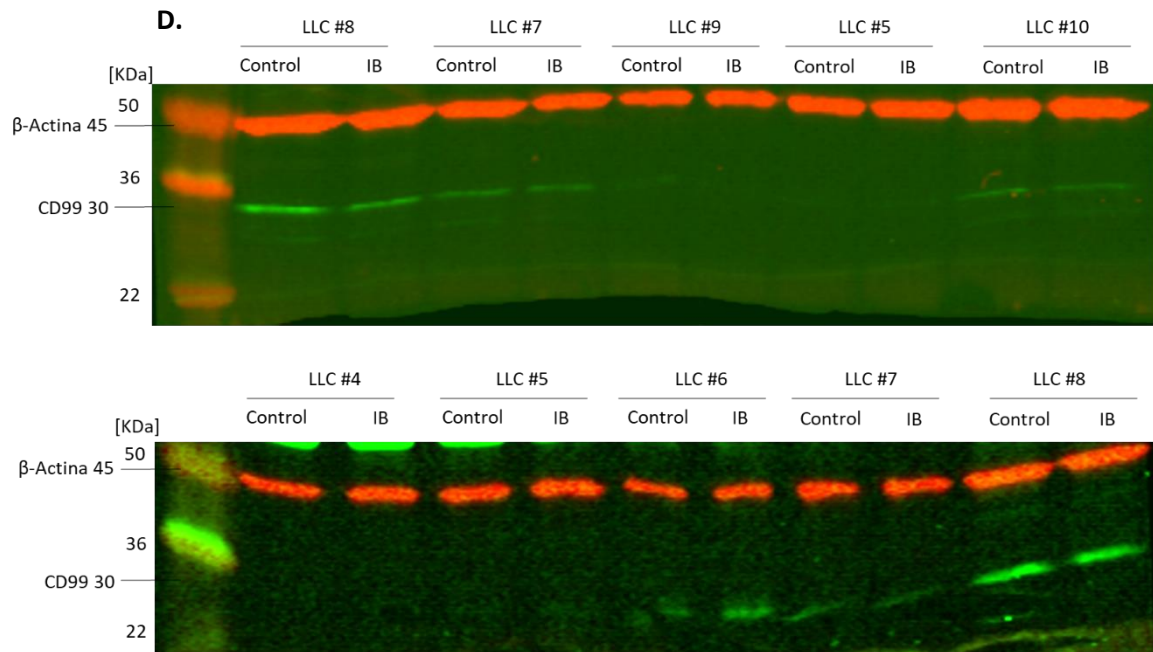
Planteamos estudiar si bajo el tratamiento con Venetoclax e Idelalisib podría haber un efecto a nivel de proteína total, ya que previamente había sido observado mediante citometría

de flujo la proteína expresada en la superficie celular. De tal forma que se incubaron las células con Ibrutinib, Idelalisib, Venetoclax para la obtención de los lisados a las 24h.

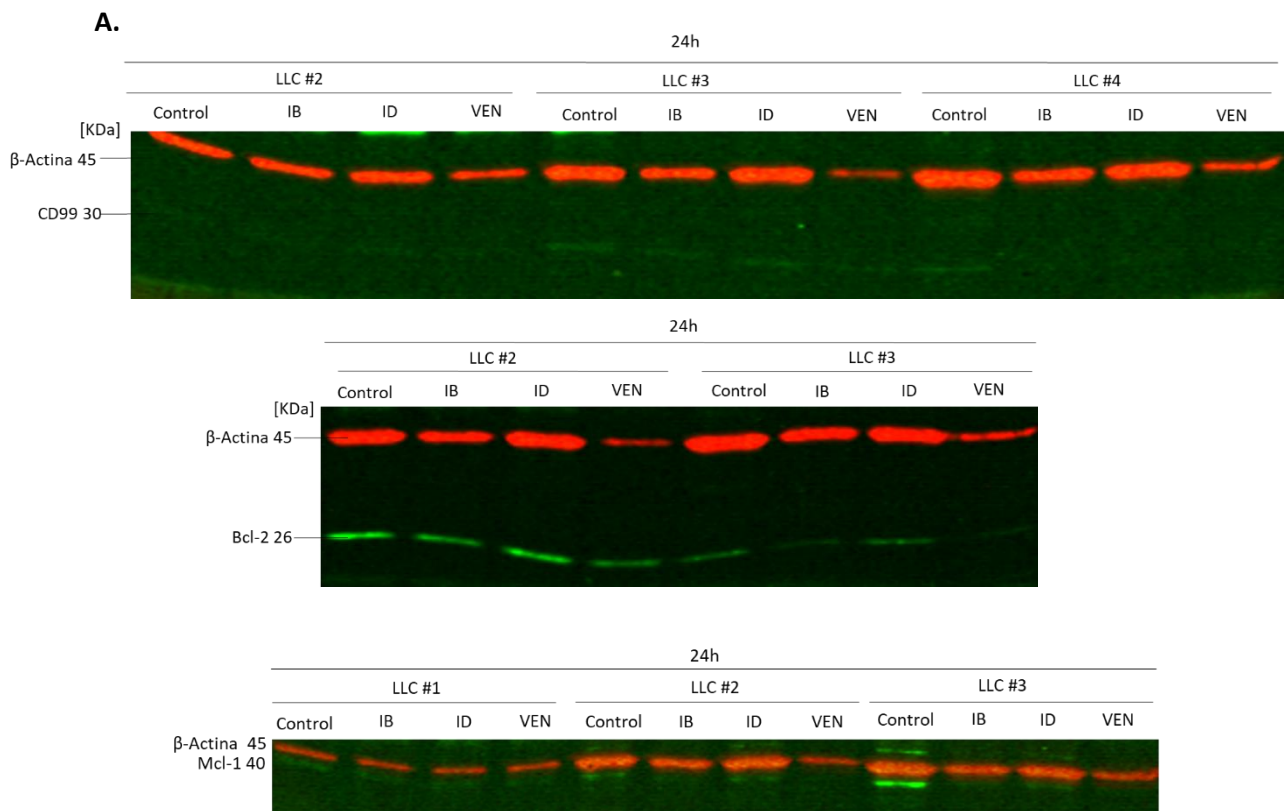
Así pues, como muestra la figura 20, se aprecia una disminución de la proteína CD99 bajo el tratamiento con Ibrutinib y Venetoclax (ratio CD99- $\beta$ Actina=0,099; ratio CD99- $\beta$ Actina + IB=0,07; ratio CD99- $\beta$ Actina + ID=0,10; ratio CD99- $\beta$ Actina + VEN=0,08) ( $P=0,051$ ) (figura 20). Además, la expresión de Mcl-1 disminuye bajo el tratamiento de los 3 fármacos, apreciándose una ligera disminución mayor bajo Venetoclax, seguido de Ibrutinib y de Idelalisib ( $P=0,049$ ) (ratio Mcl-1- $\beta$ Actina=0,56; ratio Mcl-1- $\beta$ Actina + IB=0,17; ratio Mcl-1- $\beta$ Actina + ID=0,21; ratio Mcl-1- $\beta$ Actina + VEN=0,12). No obstante, el nivel de Bcl-2 aumentaría con Venetoclax (ratio Bcl-2- $\beta$ Actina=0,62; ratio Bcl-2- $\beta$ Actina + IB=0,64; ratio Bcl-2- $\beta$ Actina + ID=0,61; ratio Bcl-2- $\beta$ Actina + VEN=2,61) (figura 21)

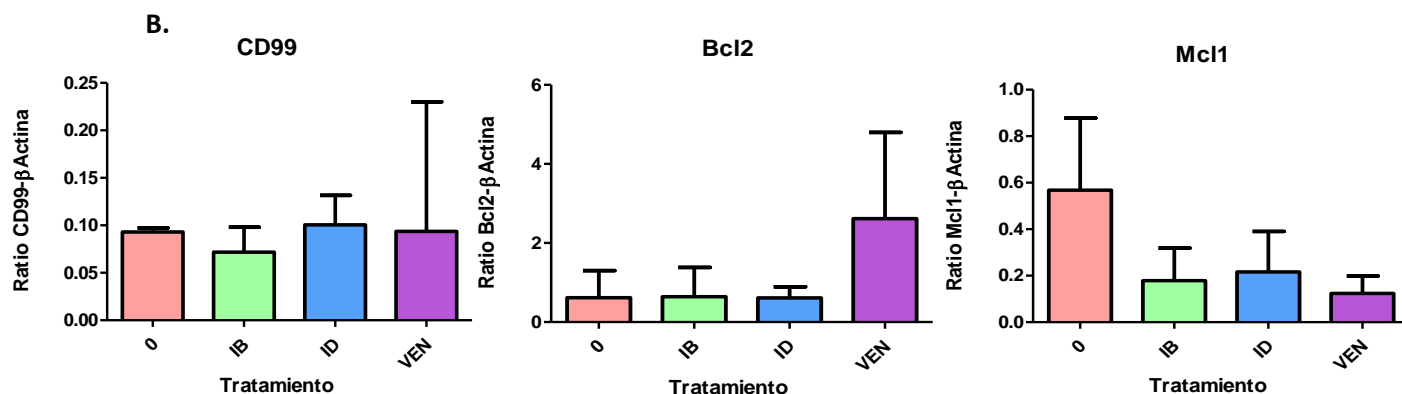
Con estos resultados podemos concluir que la expresión relativa de la proteína Mcl-1 y CD99 está reducida en las células de LLC tras la incubación con Ibrutinib y Venetoclax.





**Figura 20.** Cuantificación relativa de las proteínas A. Representación gráfica del ratio de las proteínas Mcl-1, Bcl-2 y CD99 normalizado a la expresión de  $\beta$ -actina, B. Representación mediante WB de Mcl-1, C. Representación mediante WB de Bcl-2, D. Representación mediante WB de CD99





**Figura 21.** Análisis de la expresión de CD99, Mcl-1, Bcl2, en células de LLC bajo el tratamiento de 10 $\mu$ M Ibrutinib, 10 $\mu$ M Idelalisib y 10nM Venetoclax. A. Western blotting de la expresión de CD99, Mcl-1, Bcl2 en 3 pacientes N=7. B. Gráficas del ratio de CD99, Bcl-2 y Mcl-1. Los gráficos representan la media  $\pm$  valores de SD de 3 extractos de proteínas independientes, cuantificados los niveles de proteínas y normalizados a la expresión de la  $\beta$ -actina N=4.

### 5.7. Señalización intracelular de las proteínas AKT y MAPs: ERK1/2, p38

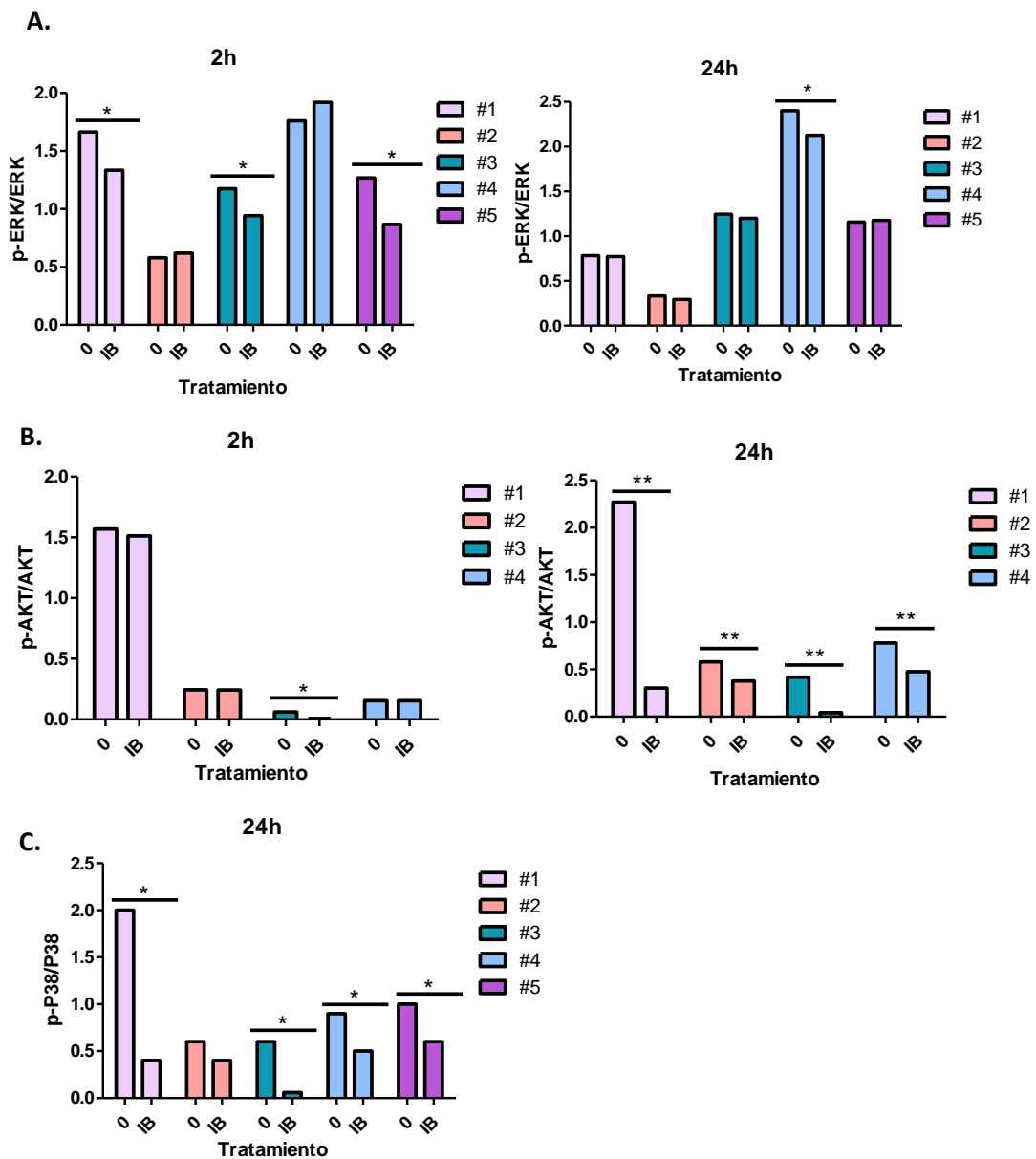
Tras la señalización del BCR se desencadenan vías de señalización que se traducen en la proliferación, supervivencia y migración celular. Una de estas vías que interviene en la supervivencia están la de las MAPKs y la de PI3K/AKT. De tal forma que planteamos el análisis de la activación de las quinasas importantes implicadas en la supervivencia de las células de LLC, en concreto de las proteínas AKT, ERK1/2 y p38 bajo el tratamiento con Ibrutinib. Por lo tanto, se evaluó mediante ELISA el nivel de fosforilación con respecto a la proteína total en un total de 5 muestras cultivadas en suspensión, y en presencia o ausencia de Ibrutinib durante 2h y 24h.

Para esto, se cultivaron los PBMCs con Ibrutinib a dos tiempos (2h y 24h), pese a que la fosforilación ante la activación del BCR con estímulos se produce de forma muy rápida al estimular los PCMCs como se ha descrito en la literatura y en nuestro caso se trata del tratamiento con un fármaco inhibidor de BTK, que no actúa directamente sobre esta vía de señalización, decidimos analizar la fosforilación de los 3 efectores del BCR: AKT, ERK y P38 basándonos en lo descrito en la literatura en el empleo de fármacos inhibidores de otras proteínas de la vía de señalización del BCR, tanto a las 2h como a las 24h.

Como podemos ver en la figura 21 en las células de LLC cultivadas en suspensión, los niveles de las 3 quinasas eran muy bajos en estas condiciones. Los niveles de ERK fosforilado disminuyen en el estudio a las 2h de incubación con Ibrutinib, mientras que a las 24h las diferencias se aprecian a nivel de la proteína total y no en la fosforilación (Figura 22 A). Por el contrario, los niveles de fosforilación de las proteínas AKT y P38 muestran más fosforilación a las 24h, pero a las 2h no cambian respecto a las células control (Figura 22 B y C).

Podemos decir con estos resultados que los datos de fosforilación de AKT, ERK y p38 sugieren que tras tiempos cortos de incubación con Ibrutinib hay un defecto de fosforilación en las células de LLC.

En concreto, al analizar nuestro estudio revela que los linfocitos de pacientes con LLC expresan menores niveles de fosforilación de AKT como P38, a las 24h de incubación con Ibrutinib, pero a las 2h apenas cambian o se reducen los niveles de fosforilación tras el tratamiento, como observamos en el paciente #3. Por el contrario, pese a que las muestras tenían unos niveles bajos de ERK a lo largo del tiempo, sólo observamos diferencias significativas a las 2h de incubación con Ibrutinib, no hallando diferencias a las 24h de exposición, salvo en el paciente #4.



**Figura 22.** Expresión de las proteínas MAPs bajo el tratamiento con Ibrutinib 10µM, representando la fosforilación como ratio de proteína fosforilada / proteína total a las 2h y 24h, siendo A. ERK N=5, B. AKT N=4 y C. P38 N=5

# ***DISCUSIÓN***

---



## 6. DISCUSIÓN

La LLC se fundamenta en la acumulación de células B en sangre, así como la infiltración en ganglios, medula ósea y otros tejidos linfoides secundarios. Además, la LLC se trata de una enfermedad incurable, pese al desarrollo de nuevas terapias centradas en las nuevas dianas terapéuticas. No obstante, un mayor conocimiento de la enfermedad nos llevara al desarrollo de nuevos fármacos. Así en este contexto el microambiente tendría un papel muy importante en la búsqueda de nuevas dianas y en las resistencias a los fármacos ya existentes.

Uno de estos fármacos es Ibrutinib. Se trata de un fármaco aprobado para el tratamiento de pacientes adultos con linfoma de células del manto (LMC) en recaída o refractario y en adultos con macroglobulinemia de Waldenström (MW). También en monoterapia o en combinación con rituximab o con obinutuzumab o venetoclax, indicado para el tratamiento de pacientes adultos con LLC que no hayan sido previamente tratados o en pacientes en recaída independientemente del tratamiento que hayan recibido.

Ibrutinib es capaz de inducir apoptosis en todos los casos de LLC, incluyendo los de mal pronóstico y la combinación con venetoclax produce un aumento de la apoptosis y de la actividad antitumoral en comparación con cualquiera de los dos fármacos por separado, ya que la inhibición de BTK por Ibrutinib aumenta la dependencia de las células de la LLC de BCL-2, vía de supervivencia celular, mientras que venetoclax inhibe esta vía, llevando a la apoptosis.

En el marco de esta tesis, se había descrito previamente que CD99 podría ser una nueva diana terapéutica ya que tiene un papel en la adhesión y migración de las células de la LLC. Además, CD99 guarda una relación estrecha con la MMP-9, de tal forma que quisimos ampliar el conocimiento del efecto de las nuevas terapias sobre CD99 ya que hasta el momento no hay apenas información sobre CD99 en la LLC, salvo su relación con la MMP-9 (Aguilera-Montilla et al., 2019).

Así, en esta Tesis Doctoral nos planteamos profundizar en el estudio de la influencia de los nuevos fármacos y su interacción con el microambiente celular de la LLC, en concreto de las proteínas CD99 y CD49d, describiendo por primera vez el efecto sobre estas proteínas bajo el tratamiento con Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax y el papel que pueden tener en la migración, junto con el lugar en las vías de señalización de las MAPs de los fármacos.

Nuestros resultados demostraron que tras el tratamiento con Ibrutinib los niveles de expresión de CD99 en ausencia de estroma disminuían a las 24 y 48h, tanto en linfocitos B, T y monocitos. Consideramos apropiado subdividir los pacientes en función del estado de *TP53* e *IGHV*, al poseer estos pacientes un peor pronóstico y un curso más agresivo de la enfermedad; pero no observamos diferencias significativas en la disminución de los niveles de expresión de CD99 y CD49d entre ambos grupos, lo que puede ser debido a un tamaño muestral pequeño o a que los cambios debidos a la modulación negativa de las moléculas de adhesión no son la razón principal del defecto de adhesión observado (Herman et al., 2015).

Además, quisimos comprobar si bajo el tratamiento con venetoclax e Idelalisib los niveles de CD99 disminuían como con Ibrutinib. Así, los niveles de expresión disminuían en los linfocitos B con Ibrutinib, y en menor medida con venetoclax e Idelalisib. Mientras que la expresión de CD49d no muestra diferencias para ninguno de los tratamientos.

Posteriormente quisimos analizar que ocurría en los donantes sanos y vimos que pese a que hay un estudio que indica que los donantes de médula ósea expresan menor nivel de expresión de CD99 que los pacientes, en nuestro estudio solo observamos diferencias en los linfocitos B bajo Ibrutinib y venetoclax, mientras que para Linfocitos T y monocitos no encontramos diferencias bajo Ibrutinib al ser un grupo pequeño de donantes y de pacientes heterogéneos, no como ocurre en el estudio de Haferlach donde el tamaño poblacional de los datos analizados era mucho mayor (Haferlach et al., 2010). No obstante, hay diferencias en la expresión de CD99 bajo venetoclax en los linfocitos B y bajo Idelalisib en monocitos. Además, observamos que la expresión de CD49d en donantes disminuye en Linfocitos B y T bajo Ibrutinib, mientras que el resto de tratamientos no ejerce ningún efecto en las poblaciones, salvo venetoclax de manera significativa en linfocitos B.

CD49d se ha vinculado como el principal regulador de las interacciones del microambiente tumoral en la LLC en virtud de su implicación en importantes vías de señalización para la proliferación y supervivencia de las células de la LLC (Dal Bo et al., 2014). CD49d puede ser importante para mantener a las células de LLC localizadas en los centros de proliferación, ya que se ha visto que CD49d está regulado positivamente (*upregulated*) en el subconjunto proliferativo de las células de LLC de sangre periférica (CXCR4<sup>dim</sup>CD5<sup>bright</sup>) (Calissano et al., 2011). Además, se ha demostrado que CD49d es un regulador crítico de la migración de linfocitos (Walsby et al., 2014). El efecto demostrado en la supervivencia, proporcionado a las células de LLC, después de la unión de CD49d puede deberse a mecanismos dependientes e independientes del BCR, que incluyen la regulación positiva de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (con sus posteriores disminuciones en BAX), aumento en MMP-9 que llevan a la activación de LYN, la activación de SYK y de la señalización de PI3K y la activación posterior (*downstream*) de NF- $\kappa$ B (Buchner et al., 2010; Buggins et al., 2010; Dal Bo et al., 2014; de La Fuente et al., 1999).

A través de la inhibición de la activación de VLA-4, Ibrutinib también puede interferir con el efecto protector mediado por las interacciones tumor-microambiente dependientes de CD49d, incluidas las señales de supervivencia y proliferación. Esto está respaldado por el hecho de que los pacientes con células con CD49d alto, que tiene una supervivencia general más baja en comparación con aquellos con células de LLC con CD49d bajo, han demostrado una mayor sensibilidad a Ibrutinib *in vitro* (Pepper et al., 2015). Además, como se ha demostrado anteriormente, la proliferación de las células de LLC en los ganglios linfáticos y en la médula ósea de los pacientes tratados con Ibrutinib se inhibe prácticamente por completo (Herman, Mustafa, et al., 2014). Si bien se ha visto que las células de LLC tratadas con Ibrutinib reducen su capacidad para adherirse a las células del estroma, no es tan pronunciado para la fibronectina, lo que sugiere que las interacciones con la matriz extracelular son más sensibles al efecto inhibitorio de Ibrutinib que las interacciones célula-célula (Herman & Wiestner, 2016). En este estudio observan también que mientras que en las células de sangre periférica de pacientes que

recibieron Ibrutinib, perdieron casi por completo su capacidad de adherirse a la fibronectina, Ibrutinib fue solo moderadamente efectivo para liberar las células ya adheridas. Estas observaciones son consistentes con la impresión clínica de que solo una fracción de las células de la LLC en los tejidos linfoides secundarios son movilizados a la circulación por Ibrutinib, y la linfadenopatía persistente y la enfermedad mínima residual en la medula ósea son evidentes, incluso después de muchos meses de tratamientos en un subgrupo de pacientes (Byrd et al., 2014; Farooqui et al., 2015; Herman, Niemann, et al., 2014; Wodarz et al., 2014). Por lo tanto, las células que circulan en la sangre periférica durante el tratamiento con Ibrutinib pueden enriquecerse con células que tiene una fuerte inhibición de la adhesión, mientras que las células retenidas en los ganglios linfáticos pueden verse menos afectadas. Aunque faltaría determinar si la retención de las células en el microambiente es debida a CD49d o a los mecanismos independientes de BTK.

Los tratamientos que inhiben la señalización y la migración de las quimioquinas como el plerixafor, y la adhesión y el tráfico celular dependientes de integrinas, como natalizumab, movilizan las células B de los tejidos linfoides secundarios hacia la sangre periférica (Rettig et al., 2012; Uy et al., 2012). Se podría pensar que estos agentes terapéuticos, al movilizar a las células fuera de los nichos protectores del microambiente, podrían generar sinergia con los agentes quimioterapéuticos y los anticuerpos monoclonales (Brown et al., 2013; Rettig et al., 2012; Uy et al., 2012). En particular, Ibrutinib no solo combina la inhibición de la migración y la adhesión, sino que también inhibe directamente los efectos de la supervivencia mediada por el BCR y posiblemente la señalización mediada por CD49d en LLC. Por lo tanto, Ibrutinib puede sensibilizar de manera potente a las células de LLC a los tratamientos existentes, lo que podría conducir a mejores respuestas generales. Esta hipótesis se está probando actualmente en ensayos clínicos en curso (Brown et al., 2013; Burger et al., 2014; Langerbeins et al., 2022; Moreno et al., 2019).

Así, empleando dos aproximaciones diferentes, hemos obtenido resultados que caracterizan el papel de CD99 en las células de LLC en respuesta a Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax. En primer lugar, la diferencia de expresión de CD99 en presencia de los fármacos respecto a las células cultivadas sin ellos.

De forma similar a los efectos de Ibrutinib, Idelalisib parece que interfiere con la quimiotaxis mediada por CXCL12 y anula la adhesión de las células de la LLC a las células del estroma, lo que sugiere un mecanismo indirecto a través de la interrupción de la protección proporcionadas por el TME (Davids et al., 2012; Hoellenriegel et al., 2011). Esto se correlaciona con hallazgos clínicos de reducción de las linfadenopatías y de la esplenomegalia concomitante, con incremento de la linfocitosis en sangre y niveles reducidos significativamente de quimioquinas relacionadas con la LLC (Brown et al., 2014;).

Utilizando un modelo ex vivo que promueve la proliferación en la LLC, Lu et al. (Lu et al., 2021) demostró que Ibrutinib y venetoclax actúan en distintas subpoblaciones de LLC que tiene diferentes capacidades proliferativas. Mientras que Ibrutinib preferentemente acaba con subpoblación en división, la subpoblación restante responde al venetoclax. Esto explicaría la observación de que Ibrutinib principalmente actúa en las células de LLC en los ganglios linfáticos y venetoclax actúa en las células de LLC circulantes. Así, sin el microambiente tumoral de apoyo,

las células de la periferia se vuelven inactivas y venetoclax induce la apoptosis, por tanto, la combinación de ambos cubriría las subpoblaciones minimizando o incluso erradicando la enfermedad mínima residual en todos los lugares anatómicos.

La diana principal de Ibrutinib es el residuo de Cys-481 de BTK. No obstante, hay otros efectos off-target, ya que Ibrutinib también se une covalentemente a otras quinasas que contengan dominios homólogos de cisteína y se une no covalentemente a otras quinasas que pueden tener un papel crucial en la toxicidad, como puede ser el sangrado (McMullen et al., 2014).

También se ha observado el efecto inhibitorio de Ibrutinib en otras proteínas como es el caso de la familia de las quinasas Src, que tienen un papel muy importante en la activación plaquetaria y la agregación (Kamel et al., 2015; Levade et al., 2014; Senis et al., 2014) o en otras quinasas que contienen cisteína como ITK/EGFR y su señalización aguas abajo (Dubovsky et al., 2013; Gao et al., 2014). Así pues, cabe destacar el efecto inhibitorio que ejerce sobre la ITK de linfocitos T y los receptores CLEC-2 que median la agregación y la fosforilación de Syk en plaquetas (Byrd et al., 2016; Manne et al., 2015). Del tal forma que la contribución de estos efectos off-target de Ibrutinib junto con la toxicidad asociada (Maddocks et al., 2015), aunque limitada, siguen sin estar completamente claros, pero llevan al uso de un inhibidor más selectivo como es Acalabrutinib.

El microambiente tumoral proporciona a las células de la LLC señales de proliferación y supervivencia favoreciendo la resistencia frente a fármacos (Burger et al., 2009; Fabbri & Dalla-Favera, 2016; Stein et al., 1980).

Además, se observó un papel antiapoptótico del estroma previamente documentado (Amigo-Jiménez et al., 2014). En nuestro estudio el cocultivo de células de LLC y células estromales de medula ósea, revierte la disminución de la expresión de CD99 y CD49d provocada por los fármacos. En este sentido, diversos estudios han demostrado previamente que hay moléculas implicadas en la resistencia a ciertos agentes terapéuticos inducida por estroma (Kurtova et al., 2009; Lagneaux et al., 1998). Nosotros demostramos en este estudio que las células estromales de medula ósea inducen resistencia a Ibrutinib, Idelalisib, y Venetoclax en células de LLC y, además, establecemos que CD99 tendría un papel en la migración celular, ya que al incubar las células con Ibrutinib, disminuye no sólo el porcentaje de células migradas, sino también la expresión de CD99. Además, hay estudios previos que corroboran la relación existente entre CD99 y MMP-9 (Aguilera-Montilla et al., 2019). Esta MMP-9 se ha visto que está implicada en la resistencia a ciertos agentes apoptóticos y hay estudios que muestran que la MMP-9 tiene un papel en el efecto protector frente a la apoptosis espontánea ejercido por el estroma en células de LLC *in vitro* (Redondo-Muñoz, Ugarte-Berzal, et al., 2010).

Tras establecer el papel de CD99 en el microambiente de la LLC, estudiamos la influencia de otros componentes, puesto que las células estromales son el principal componente celular de éste y juegan un papel crucial en la LLC, propusimos estudiar la influencia del estroma de medula ósea en la respuesta de células LLC a Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax. Hay evidencias de que el contacto directo entre células, mediado por las integrinas  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha L\beta 2$  (Lagneaux et al., 1998), es esencial para el efecto protector frente a la apoptosis, espontánea e inducida,

ejercido por el estroma en las células LLC (Kurtova et al., 2009; Lagneaux et al., 1998, 1999; Panayiotidis et al., 1996) .

En el presente trabajo no hemos caracterizado los factores concretos implicados en el efecto protector observado, pero se sabe que las BMSC producen grandes cantidades de CXCL12 (Orimo et al., 2005), VEGF (Gehrke et al., 2011) y MMP-9 (Redondo-Muñoz, Ugarte-Berzal, et al., 2010; Ringshausen et al., 2004), entre otros, y que estos factores promueven la supervivencia de las células LLC. Además, se ha descrito que una combinación fisiológica de citoquinas (IL-2, -6, -10, -12, -15, -21, BAFF y APRIL) protege a las células LLC de la apoptosis espontánea *in vitro* (Ghamlouch et al., 2013).

En este estudio comprobamos que cocultivando las células LLC con varios tipos de BMSC, el estroma protegía a las células del efecto citotóxico de los fármacos y no disminuían la expresión en la membrana de las proteínas CD99 y CD49d. Además, cabe destacar que el papel del cocultivo de células estromales con células LLC está bien establecido y conduce a la activación recíproca de varias vías de señalización que, en la LLC, promueven la supervivencia y resistencia a los tratamientos (ten Hacken & Burger, 2014b, 2014a)

Como hemos visto, CD99 es una proteína transmembrana con dos isoformas, I y II, debido al procesamiento alternativo del gen de CD99 (Hahn et al., 1997; Pasello et al., 2018). La forma mayoritaria en las células hematopoyéticas es la isoforma I. No obstante, Aguilera-Montilla y colaboradores, observaron una mayor expresión de CD99-I, mientras que CD99-II apenas se detectaba. De todas formas, CD99-I está implicado en la migración celular, teniendo un papel en la migración transendotelial, donde funciona secuencialmente tras PECAM1 y forma un complejo señal con la adenil ciclasa soluble, PKA y ezrina (Manara et al., 2018; Muller, 2009; Pasello et al., 2018; Vestweber, 2015). Además, CD99-I induce la migración en monocitos, CD34+ y en células malignas de glioma, indicando así un papel dual para CD99-I, dependiendo de su contexto celular. Nuestros resultados apoyan al estudio de Aguilera-Montilla et al. (Aguilera-Montilla et al., 2019) que fueron los primeros en demostrar el papel de CD99 en la migración celular, y nosotros quisimos ver el efecto de las nuevas terapias sobre esta nueva diana molecular.

Adicionalmente, también se ha visto que CD99 modula la unión de la integrina  $\alpha 4\beta 1$  a VCAM1 y que aumenta la adhesión de los linfocitos T al endotelio (Alberti et al., 2002; G. Bernard et al., 2000) . De la misma manera, CD99 está implicado en la interacción de LFA-1/ICAM-1, induciendo la adhesión homotípica de linfocitos B y T (Alberti et al., 2002; Seol et al., 2012). La adhesión de las células de glioma a la laminina también está regulada por CD99 (Seol et al., 2012). Además, han estudiado que el silenciamiento génico de CD99 disminuye la adhesión celular de las células de LLC hacia los ligandos de la integrina  $\alpha 4\beta 1$  como son VCAM-1 y FN-H89, estableciendo un nuevo papel para CD99 en la regulación de las funciones de la integrina en la LLC. Otras propiedades atribuidas a CD99 incluyen el papel en la apoptosis y el desarrollo linfocitario (Manara et al., 2018; Pasello et al., 2018). En cambio, en la leucemia linfoblástica aguda se ha propuesto a CD99 como un marcador para enfermedad mínima residual (Coustan-Smith et al., 2011). Además, en los tumores sólidos, CD99 se expresa en niveles altos en tumores como el sarcoma de Ewing y linfomas de células B, o en niveles bajos en linfoma de Hodgkin y carcinoma gástrico, sugiriendo una función oncosupresora (Manara et al., 2018).

Los datos publicados en análisis de expresión de genes (dataset GSE21029) muestran una expresión menor de CD99 en las células de LLC derivadas de la médula ósea que en las de la sangre (Herishanu et al., 2011). Mientras que la expresión de CD99 en las células de LLC de los ganglios linfáticos es diferente, debido a los cambios en los patrones moleculares observados a lo largo de los tejidos de la LLC (Mittal et al., 2014). Debido a que hay estudios previos en los que muestran que una alta expresión de MMP-9 afecta a la migración de las células de LLC, la regulación decreciente/disminución (*downregulation*) de CD99 podría representar un mecanismo crítico para el control del tráfico celular y la detención (*arrest*) de las células. En la LLC, las células que infiltran la médula ósea están expuestas a altas concentraciones de MMP-9, que al unirse a la integrina  $\alpha 4\beta 1$ , regulan a la baja a CD99 y favorecen la retención en este órgano. Debido a que las células en la médula ósea reciben señales de supervivencia y proliferación, la regulación de CD99 por MMP-9 puede afectar directamente en la progresión de la enfermedad. No obstante, esta detención está en contraste con un dogma que establece que las MMPs son puramente estimuladoras de la invasión y la metástasis de células cancerosas (Aguilera-Montilla et al., 2019).

De tal manera que al establecerse CD99 como un objetivo nuevo de la MMP-9, y como contribuye a la migración celular de la LLC y a la retención en la médula ósea, trasladamos nuestros resultados previos a la migración celular. En este contexto nosotros planteamos el papel que podría tener CD99 en la migración. Previamente, se ha estudiado que el tratamiento con 1  $\mu$ M Ibrutinib inhibe la quimiotaxis de las células de LLC hacia CXCL12, CXCL13 y CCL19 (de Rooij et al., 2012; Ponader et al., 2012). Además, comprobaron el efecto *in vitro* del tratamiento con Ibrutinib, de tal forma que disminuye la adhesión celular mediada por el BCR hacia la fibronectina y VCAM-1 (de Rooij et al., 2012). No obstante, los datos de los efectos *in vivo* de estos nuevos fármacos son limitados.

En este trabajo establecimos ensayos de migración hacia CXCL12 y de migración transendotelial hacia CXCL12 en presencia de Ibrutinib. Nuestros resultados coinciden con lo publicado, ya que vimos que para linfocitos B, linfocitos T y monocitos disminuía la capacidad de migración hacia CXCL12 a las 24h tras 2h de incubación con Ibrutinib. Y sobre estas células migradas a su vez analizamos los niveles de CD99 y observamos que al añadir Ibrutinib al cultivo, la expresión de CD99 disminuía en las tres poblaciones estudiadas.

Esto corrobora y añade nueva información a lo ya publicado, ya que en estudios previos se ha visto que la migración de las células de LLC hacia CXCL12 (200ng/mL) y CCL19 (100ng/mL) disminuye tras el tratamiento con Ibrutinib tras 3 h de incubación (Herman et al., 2012; Ponader et al., 2012). En estos estudios, no solo disminuyen la migración y supervivencia en respuesta a estímulos fisiológicamente relevantes, sino que además demuestran que el bloqueo de BCR y las señales intracelulares derivadas de los receptores de quimioquinas, y la secreción de las quimioquinas derivadas de las células de la LLC (CCL3 y CCL4) y junto con el estudio de Herman et al. vieron que Ibrutinib bloquea la proliferación celular de la LLC y varias vías de supervivencia. Además, los resultados de sus ensayos *in vitro* los corroboraron con un ensayo *in vivo* en un modelo de ratón TCL1, el cual posee una linfocitosis transitoria como ocurre de manera similar a lo que se observa en los pacientes de LLC (Herman et al., 2012).

Asimismo, hay otros estudios que hipotetizan que el tratamiento con Ibrutinib cambiaría el contenido de los quimioatrayentes en la médula ósea, encontrando una disminución significativa en la migración de las células de LLC del 20% (Herman et al., 2013). Explicando así la reducción de la migración hacia la CXCL12 en nuestro ensayo al intentar recrear el microambiente celular.

La intravasación y extravasación de las células tumorales requiere ciertas interacciones íntimas entre células endoteliales y células cancerosas, con ambos tipos celulares contribuyendo a las iniciales interacciones adhesivas y la subsecuente migración transendotelial (Raymond et al., 2013). Los leucocitos experimentan la migración transendotelial cuando se extravasan de la sangre a los tejidos infectados como parte de los procesos inflamatorios. Este proceso está ampliamente estudiado y sobre todo se conocen los mecanismos que intervienen, pudiendo establecer el modelo de cómo la migración transendotelial de las células cancerosas puede ocurrir durante la metástasis (Madsen & Sahai, 2010; Vestweber, 2015). CD99 está sobre expresado en la vasculatura de los tumores sólidos, y es conocido por ser un marcador del sarcoma de Ewing.

El papel de CD99 en la migración transendotelial durante la inflamación ha sido previamente estudiado (Lou et al., 2007; Muller, 2016; Schenkel et al., 2002; R. L. Watson et al., 2015). Sabemos que es el receptor de CD99 tipo I, el que se expresa sobre todo en las células hematopoyéticas y las células endoteliales (Pasello et al., 2018). Entre las funciones estudiadas, CD99 regula la adhesión y la migración transendotelial de las células hematopoyéticas durante la inflamación (Lou et al., 2007; Schenkel et al., 2002). En el endotelio, CD99 se encuentra en los bordes de las células endoteliales en un complejo con la ezrina, la adenililciclase soluble (sAC) y la proteína quinasa dependiente de cAMP, también conocida como la proteína quinasa A o PKA y en un compartimento intracelular contiguo a la membrana plasmática localizado próximo a las uniones de las células y las células endoteliales llamado compartimento de reciclaje de borde lateral o LBRC (R. L. Watson et al., 2015). Así pues, pese a que está establecido el papel que desempeña CD99 en la migración transendotelial leucocitaria, faltaría profundizar más en la función que desempeña en la progresión del cáncer (Manara et al., 2018).

Hay estudios que demuestran que hay una relación entre CD99 y la actividad Rho GTPasa, las dinámicas de actina y la señalización del factor de crecimiento en cáncer (Lee & Wang, 2020). Además, se muestra que CD99 actúa como una molécula que regula la adhesión entre el endotelio y los leucocitos donde juega un papel crítico en las etapas tardías de la invasión endotelial (Schenkel et al., 2002).

Así pues, para tener mayor conocimiento de los mecanismos implicados en la acción de los fármacos, hemos estudiado la regulación de los miembros de la familia de Bcl-2 al estar implicados en la supervivencia de LLC. Nuestros resultados mostraron que la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1 disminuye en los tratamientos con Ibrutinib, Idelalisib y venetoclax.

En nuestro estudio hemos observado también las bases moleculares subyacentes al efecto observado de la disminución de CD99, centrándonos en las proteínas de la familia de Bcl-2 y Mcl-1 que actúan como reguladores de la apoptosis. La sobreexpresión de varios miembros

de esta familia se ha implicado en la resistencia a la apoptosis espontánea o inducida por citotóxicos en la LLC. No obstante, se ha documentado ampliamente que en la LLC hay una sobreexpresión tanto de Bcl-2 como Mcl-1 y está relacionado con la resistencia a los tratamientos (Balakrishnan & Gandhi, 2013). Mcl-1 es una diana localizada en la vía de señalización de AKT. De modo que en conjunto estos resultados sugieren que el incremento de la citotoxicidad observada en los fármacos afecta la regulación de las vías críticas en la supervivencia celular (Balakrishnan & Gandhi, 2013).

Nuestros resultados muestran claramente que tras el tratamiento con Ibrutinib la proteína CD99 disminuye en las células de LLC primarias, junto con la expresión de proteína Mcl1. Esta modulación es probablemente la responsable del efecto de supervivencia observado al inhibir BTK. Mcl1 es una proteína anti-apoptótica muy importante en LLC (Balakrishnan et al., 2014). No obstante, junto con el estudio de Cervantes-Gómez et al. confirmamos la disminución *in vitro* de los niveles de la proteína Mcl-1 bajo el tratamiento con Ibrutinib durante 24h. Además, cabe señalar que Burger y colaboradores describen que hay un incremento de Mcl-1 en las células de LLC en cultivo con estroma de medula ósea (Cervantes-Gomez et al., 2015).

Por el contrario, en nuestro estudio los niveles de Bcl-2 permanecen sin cambios significativos bajo el tratamiento con Ibrutinib, como ocurre en el estudio llevado a cabo por Patel et al. (Patel et al., 2017). Este efecto probablemente es debido a que al inhibir BTK, las células potenciarían la vía de supervivencia mediada por Bcl-2. Sin embargo, esta proteína no solo no disminuye, sino que permanece igual o incluso podría aumentar como ocurre en el estudio de Cervantes (Cervantes-Gomez et al., 2015), tras la estimulación con IgM, o incluso como en el estudio de Deng et al. (Deng et al., 2017). Este aumento puede ser debido a que hay otras señales que pueden mediar la supervivencia, ya que Bcl-2 se encuentra aguas abajo de la diana de Ibrutinib y hay otras vías de señalización como las mediadas por citoquinas, pese al efecto de Ibrutinib sobre los receptores de las citoquinas.

La vía del BCR, incluyendo el eje PI3K/AKT, ha demostrado tener un impacto a nivel de Mcl-1, lo que resulta en un aumento de la transcripción, sobreexpresión y más tiempo de mantenimiento de la proteína Longo et al., 2008; Petlickovski et al., 2005). Por eso, la disminución de los niveles de expresión de la proteína Mcl-1 en respuesta al tratamiento con los inhibidores de BTK proporciona una razón para combinar Ibrutinib o acalabrutinib con el antagonista de Bcl-2 venetoclax (Roberts et al., 2016; Souers et al., 2013). De hecho, tales estrategias han sido probadas y se ha descubierto que aumentan la citotoxicidad inducida por Ibrutinib en LLC y otras neoplasias malignas de células B (Cervantes-Gomez et al., 2015; Deng et al., 2017).

Con el fin de analizar los posibles mecanismos biológicos que explican el mayor efecto de Ibrutinib, se estudiaron las quinasas AKT, ERK y P38. En concreto, nuestro estudio revela que los linfocitos de pacientes con LLC expresan menores niveles de fosforilación de AKT a las 24h de incubación con Ibrutinib, mientras que a las 2h apenas hay cambios en los niveles de fosforilación tras el tratamiento. Por el contrario, los niveles de ERK fosforilado en las muestras estudiadas eran bajos y sólo observamos menores niveles de proteína a las 2h. Estos resultados están en concordancia con los estudios en LLC que describen la implicación de estas quinasas en

la resistencia a la apoptosis y en la desregulación de las vías de supervivencia asociadas a AKT y ERK.

Los efectos de Ibrutinib a nivel celular están ampliamente documentados: disminución de la proliferación, aumento moderado de la apoptosis, disminución de las señales de supervivencia en el estroma o de las células NLCs y reducción del bloqueo de la actividad enzimática de BTK (Ponader et al., 2012). Estos efectos se reflejan en el BCR, ya que con su inhibición se ha demostrado que al reducir los niveles de fosfo-BTK, disminuyen la señalización aguas abajo de la vía de señalización de las quinasas ERK-MAP y alteran la expresión de las proteínas antiapoptóticas (Cervantes-Gomez et al., 2015; de Rooij et al., 2012; Herman et al., 2012; Herman & Wiestner, 2016; Ponader et al., 2012).

El papel de AKT en la proliferación y supervivencia de las células en los procesos linfoproliferativos es ampliamente conocido. Hay estudios *in vitro* con Ibrutinib que demuestran que se reduce tanto la migración como la adhesión, ambos son mecanismos clave en el intercambio y tráfico celular entre la sangre periférica y los órganos linfoides secundarios. En nuestras muestras, a las 24h, la fosforilación de AKT no se inhibe como muestra el ensayo de Patei. Posiblemente, debido a la activación sostenida de otras vías de señalización (Hendriks et al., 2014)

Nuestros resultados muestran que la adición de Ibrutinib inducía a la activación de las vías PI3K/AKT, MEK/ERK y P38 en las células de LLC, de tal manera que observamos cambios a tiempos cortos de incubación. En concordancia con estos resultados, las vías de PI3K/AKT, MEK/ERK, NFκB y PKC se han implicado en la resistencia a la apoptosis espontánea e inducida por citotóxicos en las células de LLC. En concreto, la vía PI3K/AKT se ha descrito que promueve la supervivencia de las células en respuesta a una amplia variedad de estímulos incluyendo la activación del BCR (Longo et al., 2008), VCAM-1 (Redondo-Muñoz, Ugarte-Berzal, et al., 2010), CCL12 y CCL21 (Cuesta-Mateos et al., 2010). Y la activación de la vía MEK/ERK en LLC, se ha descrito al transmitir las señales de supervivencia en respuesta a CXCL12 (Burger et al., 2000; Orimo et al., 2005).

En resumen, nuestro estudio es el primero en profundizar en el papel de CD99 en células de LLC, así como su expresión bajo los diferentes fármacos incluidos en las terapias actuales de la LLC. También hemos descrito el efecto protector del estroma de medula ósea en el tratamiento con Ibrutinib, Venetoclax e Idelalisib en la regulación de CD99 y la caracterización del papel de CD99 en la migración frente al efecto de Ibrutinib. Además, hemos corroborado el efecto previamente abordado de la disminución de CD49d bajo el tratamiento con Ibrutinib y hemos completado el estudio con Idelalisib y Venetoclax. Asimismo, hemos planteado la disminución de la migración transendotelial con Ibrutinib y hemos confirmado el papel de Ibrutinib en las vías de señalización de las MAP quinasas. En estudios futuros se podría abordar si CD99 está implicado en otros procesos patológicos en LLC. En este sentido, el bloqueo de CD99, CD49d y de otras quinasas, en combinación con otras estrategias o agentes terapéuticos, podría mejorar la respuesta de los pacientes a lo largo de la enfermedad.



# ***CONCLUSIONES***

---



## 7. CONCLUSIONES

1. Las células de LLC en contacto con el estroma tratadas “ex vivo” con Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax no presentan una disminución en los niveles de expresión de CD99 y CD49d.
2. La expresión de CD99 disminuye significativamente tras el tratamiento con Venetoclax y con Ibrutinib “in vitro” en células de pacientes de LLC, sin observar cambios tras la incubación con Idelalisib. Al igual que ocurre en los linfocitos B de los sujetos normales.
3. Los niveles de expresión de CD99 tras el tratamiento con Ibrutinib disminuyen independientemente del estatus de *TP53* e *IGHV*, mientras que CD49d permanece sin cambios independientemente del estado mutacional de *IGHV*, pese a que en donantes control disminuye CD49d tanto en linfocitos B como T.
4. La quimiotaxis y migración transendotelial hacia CXCL12 de las células de LLC, disminuye el número de células migradas y disminuye la expresión de CD99 de los linfocitos B y T migrados tras el tratamiento con Ibrutinib.
5. La expresión de Mcl-1 y CD99 en la LLC disminuye tras la exposición a Ibrutinib, Idelalisib y Venetoclax. Por el contrario, la expresión de Bcl-2 permanece sin cambios tras la incubación con Ibrutinib e Idelalisib y muestra un ligero aumento con Venetoclax.
6. La fosforilación de AKT y P38 disminuye tras tiempos cortos, 2h, de incubación “in vitro” con Ibrutinib, al contrario de los niveles de ERK que disminuyen a las 24h.



# ***BIBLIOGRAFÍA***

---



## BIBLIOGRAFÍA

- Agathangelidis, A., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Brochet, X., Murray, F., Yan, X. J., Davis, Z., van Gastel-Mol, E. J., Tresoldi, C., Chu, C. C., Cahill, N., Giudicelli, V., Tichy, B., Pedersen, L. B., Foroni, L., Bonello, L., Janus, A., Smedby, K., Anagnostopoulos, A., ... Stamatopoulos, K. (2012). Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*, *119*(19), 4467–4475. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-11-393694>
- Aguilera-Montilla, N., Bailón, E., Uceda-Castro, R., Ugarte-Berzal, E., Santos, A., Gutiérrez-González, A., Pérez-Sánchez, C., Van den Steen, P. E., Opdenakker, G., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2019). MMP-9 affects gene expression in chronic lymphocytic leukemia revealing CD99 as an MMP-9 target and a novel partner in malignant cell migration/arrest. *Oncogene*, *38*(23), 4605–4619. <https://doi.org/10.1038/S41388-019-0744-3>
- Alberti, I., Bernard, G., Rouquette-Jazdanian, A. K., Pelassy, C., Pourtein, M., Aussel, C., & Bernard, A. (2002). CD99 isoforms expression dictates T cell functional outcomes. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *16*(14), 1946–1948. <https://doi.org/10.1096/FJ.02-0049FJE>
- Ali, A., Vaikari, V. P., & Alachkar, H. (2022). CD99 in malignant hematopoiesis. *Experimental Hematology*, *106*, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2021.12.363>
- Allen, C. D. C., & Cyster, J. G. (2008). Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Seminars in Immunology*, *20*(1), 14–25. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2007.12.001>
- Amaya-Chanaga, C. I., & Rassenti, L. Z. (2016). Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, *29*(1), 79–89. <https://doi.org/10.1016/J.BEHA.2016.08.005>
- Amigo-Jiménez, I., Bailón, E., Aguilera-Montilla, N., Terol, M. J., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2015). Bone marrow stroma-induced resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to arsenic trioxide involves Mcl-1 upregulation and is overcome by inhibiting the PI3K $\delta$  or PKC $\beta$  signaling pathways. *Oncotarget*, *6*(42), 44832–44848. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6265>
- Amigo-Jiménez, I., Bailón, E., Ugarte-Berzal, E., Aguilera-Montilla, N., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2014). Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide. *PLoS ONE*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099993>
- Anderson, M. A., Tam, C., Lew, T. E., Juneja, S., Juneja, M., Westerman, D., Wall, M., Lade, S., Gorelik, A., Huang, D. C. S., Seymour, J. F., & Roberts, A. W. (2017). Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*, *129*(25), 3362–3370. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-01-763003>

- Aubrit, F., Gelin, C., Pham, D., Raynal, B., & Bernard, A. (1989). The biochemical characterization of E2, a T cell surface molecule involved in rosettes. *European Journal of Immunology*, 19(8), 1431–1436. <https://doi.org/10.1002/EJL.1830190813>
- Austen, B., Skowronska, A., Baker, C., Powell, J. E., Gardiner, A., Oscier, D., Majid, A., Dyer, M., Siebert, R., Taylor, A. M., Moss, P. A., & Stankovic, T. (2007). Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(34), 5448–5457. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.2649>
- Baccar, A., Ferchichi, I., Troudi, W., Marrakchi, R., ben Hmida, N., Jebini, S., Mrad, K., ben Romdhane, K., & Benammar Elgaaied, A. (2013). CD99 and HLA-II immunostaining in breast cancer tissue and their correlation with lymph node metastasis. *Disease Markers*, 34(5), 363–371. <https://doi.org/10.3233/DMA-130982>
- Badoux, X., Bueso-Ramos, C., Harris, D., Li, P., Liu, Z., Burger, J., O'Brien, S., Ferrajoli, A., Keating, M. J., & Estrov, Z. (2011). Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and bone marrow endothelial cells: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Human Pathology*, 42(12), 1989–2000. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2011.02.027>
- Bailón, E., Aguilera-Montilla, N., Gutiérrez-González, A., Ugarte-Berzal, E., Van den Steen, P. E., Opendakker, G., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2018). A catalytically inactive gelatinase B/MMP-9 mutant impairs homing of chronic lymphocytic leukemia cells by altering migration regulatory pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.129>
- Balakrishnan, K., Burger, J. A., Fu, M., Doifode, T., Wierda, W. G., & Gandhi, V. (2014). Regulation of Mcl-1 expression in context to bone marrow stromal microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 16(12), 1036–1046. <https://doi.org/10.1016/J.NEO.2014.10.002>
- Balakrishnan, K., & Gandhi, V. (2013). Bcl-2 antagonists: a proof of concept for CLL therapy. *Investigational New Drugs*, 31(5), 1384–1394. <https://doi.org/10.1007/S10637-013-0002-4>
- Balakrishnan, K., Peluso, M., Fu, M., Rosin, N. Y., Burger, J. A., Wierda, W. G., Keating, M. J., Faia, K., O'Brien, S., Kutok, J. L., & Gandhi, V. (2015). The phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-delta and gamma inhibitor, IPI-145 (Duvelisib), overcomes signals from the PI3K/AKT/S6 pathway and promotes apoptosis in CLL. *Leukemia*, 29(9), 1811–1822. <https://doi.org/10.1038/LEU.2015.105>
- Baldauf, M. C., Orth, M. F., Dallmayer, M., Marchetto, A., Gerke, J. S., Rubio, R. A., Kiran, M. M., Musa, J., Knott, M. M. L., Ohmura, S., Li, J., Akpolat, N., Akatli, A. N., Özen, Ö., Dirksen, U., Hartmann, W., de Alava, E., Baumhoer, D., Sannino, G., ... Grünwald, T. G. P. (2017). Robust diagnosis of Ewing sarcoma by immunohistochemical detection of super-enhancer-

- driven EWSR1-ETS targets. *Oncotarget*, 9(2), 1587–1601. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.20098>
- Baliakas, P., Agathangelidis, A., Hadzidimitriou, A., Sutton, L. A., Minga, E., Tsanousa, A., Scarfò, L., Davis, Z., Yan, X. J., Shanafelt, T., Plevova, K., Sandberg, Y., Vojdeman, F. J., Boudjogra, M., Tzenou, T., Chatzouli, M., Chu, C. C., Veronese, S., Gardiner, A., ... Stamatopoulos, K. (2015). Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood*, 125(5), 856–859. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-09-600874>
- Baliakas, P., Iskas, M., Gardiner, A., Davis, Z., Plevova, K., Nguyen-Khac, F., Malcikova, J., Anagnostopoulos, A., Glide, S., Mould, S., Stepanovska, K., Brejcha, M., Belessi, C., Davi, F., Pospisilova, S., Athanasiadou, A., Stamatopoulos, K., & Oscier, D. (2014). Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *American Journal of Hematology*, 89(3), 249–255. <https://doi.org/10.1002/AJH.23618>
- Baliakas, P., Jeromin, S., Iskas, M., Puiggros, A., Plevova, K., Nguyen-Khac, F., Davis, Z., Matteo Rigolin, G., Visentin, A., Xochelli, A., Delgado, J., Baran-Marszak, F., Stalika, E., Abrisqueta, P., Durechova, K., Papaioannou, G., Eclache, V., Dlmou, M., Iliakis, T., ... Stamatopoulos, K. (2019). Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood*, 133(11), 1205. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2018-09-873083>
- Banting, G. S., Pym, B., Darling, S. M., & Goodfellow, P. N. (1989). The MIC2 gene product: epitope mapping and structural prediction analysis define an integral membrane protein. *Molecular Immunology*, 26(2), 181–188. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(89\)90100-4](https://doi.org/10.1016/0161-5890(89)90100-4)
- Beck, T. C., Gomes, A. C., Cyster, J. G., & Pereira, J. P. (2014). CXCR4 and a cell-extrinsic mechanism control immature B lymphocyte egress from bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(13), 2567. <https://doi.org/10.1084/JEM.20140457>
- Bellosillo, B., Villamor, N., Colomer, D., Pons, G., Montserrat, E., & Gil, J. (1999). In Vitro Evaluation of Fludarabine in Combination With Cyclophosphamide and/or Mitoxantrone in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 94(8), 2836–2843. [https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.8.2836.420K35\\_2836\\_2843](https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.8.2836.420K35_2836_2843)
- Bernard, A., Aubrit, F., Raynal, B., Pham, D., & Boumsell, L. (1988). A T cell surface molecule different from CD2 is involved in spontaneous rosette formation with erythrocytes. *The Journal of Immunology*, 140(6).
- Bernard, G., Breitmayer, J. P., de Matteis, M., Trampont, P., Hofman, P., Senik, A., & Bernard, A. (1997). Apoptosis of immature thymocytes mediated by E2/CD99. *The Journal of Immunology*, 158(6).
- Bernard, G., Raimondi, V., Alberti, I., Pourtein, M., Widjenes, J., Ticchioni, M., & Bernard, A. (2000). *CD99 (E2) up-regulates > 4 I 1-dependent T cell adhesion to inflamed vascular endothelium under flow conditions*. <https://doi.org/10.1002/1521-4141>

- Binder, M., Léchenne, B., Ummanni, R., Scharf, C., Balabanov, S., Trusch, M., Schlüter, H., Braren, I., Spillner, E., & Trepel, M. (2010). Stereotypical chronic lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells. *PLoS One*, *5*(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0015992>
- Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, I. G., Colona, Y. P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M. T., Monconduit, M., Eelabbes, S., & Gremy, F. (1981). A New Prognostic Classification of Chronic Lymphocytic Leukemia Derived from a Multivariate Survival Analysis. *Cancer*, *48*(1), 198–206. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19810701\)48:1<198::aid-cnrcr2820480131>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19810701)48:1<198::aid-cnrcr2820480131>3.0.co;2-v)
- Blombery, P., Anderson, M. A., Gong, J. N., Thijssen, R., Birkinshaw, R. W., Thompson, E. R., Teh, C. E., Nguyen, T., Xu, Z., Flensburg, C., Lew, T. E., Majewski, I. J., Gray, D. H. D., Westerman, D. A., Tam, C. S., Seymour, J. F., Czabotar, P. E., Huang, D. C. S., & Roberts, A. W. (2019). Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discovery*, *9*(3), 342–353. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1119>
- Blombery, P., Thompson, E. R., Nguyen, T., Birkinshaw, R. W., Gong, J. N., Chen, X., McBean, M., Thijssen, R., Conway, T., Anderson, M. A., Seymour, J. F., Westerman, D. A., Czabotar, P. E., Huang, D. C. S., & Roberts, A. W. (2020). Multiple BCL2 mutations cooccurring with Gly101Val emerge in chronic lymphocytic leukemia progression on venetoclax. *Blood*, *135*(10), 773–777. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2019004205>
- Bond, D. A., & Woyach, J. A. (2019). Targeting BTK in CLL: Beyond Ibrutinib. *Current Hematologic Malignancy Reports* *2019* *14*:3, *14*(3), 197–205. <https://doi.org/10.1007/S11899-019-00512-0>
- Bose, P., Gandhi, V., & Konopleva, M. (2017). Pathways and mechanisms of venetoclax resistance. *Leukemia & Lymphoma*, *58*(9), 2026–2039. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1283032>
- Brachtl, G., Piñón Hofbauer, J., Greil, R., & Hartmann, T. N. (2014). The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Hematology*, *93*(3), 361. <https://doi.org/10.1007/S00277-013-1967-Y>
- Brown, J. R., Barrientos, J. C., Barr, P. M., Flinn, I., Burger, J. A., Salman, Z., Clow, F., James, D. F., Graef, T., Friedberg, J. W., Rai, K. R., & O'Brien, S. (2013). Ibrutinib In Combination With Bendamustine and Rituximab Is Active and Tolerable In Patients With Relapsed/Refractory CLL/SLL: Final Results Of a Phase 1b Study. *Blood*, *122*(21), 525–525. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V122.21.525.525>
- Brown, J. R., Barrientos, J. C., Barr, P. M., Flinn, I. W., Burger, J. A., Tran, A., Clow, F., James, D. F., Graef, T., Friedberg, J. W., Rai, K., & O'Brien, S. (2015). The Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib with chemoimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *125*(19), 2915–2922. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-09-585869>

- Brown, J. R., Byrd, J. C., Coutre, S. E., Benson, D. M., Flinn, I. W., Wagner-Johnston, N. D., Spurgeon, S. E., Kahl, B. S., Bello, C., Webb, H. K., Johnson, D. M., Peterman, S., Li, D., Jahn, T. M., Lannutti, B. J., Ulrich, R. G., Yu, A. S., Miller, L. L., & Furman, R. R. (2014a). Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 $\delta$ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *123*(22), 3390–3397. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-11-535047>
- Brusa, D., Serra, S., Coscia, M., Rossi, D., D'Arena, G., Laurenti, L., Jaksic, O., Fedele, G., Inghirami, G., Gaidano, G., Malavasi, F., & Deaglio, S. (2013). The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *98*(6), 953–963. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2012.077537>
- Buchner, M., Baer, C., Prinz, G., Dierks, C., Burger, M., Zenz, T., Stilgenbauer, S., Jumaa, H., Veelken, H., & Zirikli, K. (2010). Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *115*(22), 4497–4506. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-07-233692>
- Buggins, A. G. S., Pepper, C., Patten, P. E. M., Hewamana, S., Gohil, S., Moorhead, J., Folarin, N., Yallop, D., Thomas, N. S. B., Mufti, G. J., Fegan, C., & Devereux, S. (2010). Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription. *Cancer Research*, *70*(19), 7523–7533. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1634>
- Bulian, P., Shanafelt, T. D., Fegan, C., Zucchetto, A., Cro, L., Nućkel, H., Baldini, L., Kurtova, A. v., Ferrajoli, A., Burger, J. A., Gaidano, G., del Poeta, G., Pepper, C., Rossi, D., & Gattei, V. (2014). CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *32*(9), 897–904. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.8515>
- Burger, J. A. (2012). Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Current Opinion in Oncology*, *24*(6), 643–649. <https://doi.org/10.1097/CCO.0B013E3283589950>
- Burger, J. A. (2013). The CLL cell microenvironment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *792*, 25–45. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8051-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8051-8_2)
- Burger J. A. (2020). Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *383*(5), 460–473. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA1908213>
- Burger, J. A., Burger, M., & Kipps, T. J. (1999). *Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Express Functional CXCR4 Chemokine Receptors That Mediate Spontaneous Migration Beneath Bone Marrow Stromal Cells*. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/94/11/3658/1657017/3658.pdf>
- Burger, J. A., & Chiorazzi, N. (2013). B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends in Immunology*, *34*(12), 592–601. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2013.07.002>

- Burger, J. A., Ghia, P., Rosenwald, A., & Caligaris-Cappio, F. (2009). The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*, *114*(16), 3367–3375. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-06-225326>
- Burger, J. A., Keating, M. J., Wierda, W. G., Hartmann, E., Hoellenriegel, J., Rosin, N. Y., de Weerd, I., Jeyakumar, G., Ferrajoli, A., Cardenas-Turanzas, M., Lerner, S., Jorgensen, J. L., Noguera-González, G. M., Zacharian, G., Huang, X., Kantarjian, H., Garg, N., Rosenwald, A., & O'Brien, S. (2014). Safety and activity of ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, *15*(10), 1090–1099. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70335-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70335-3)
- Burger, J. A., Landau, D. A., Taylor-Weiner, A., Bozic, I., Zhang, H., Sarosiek, K., Wang, L., Stewart, C., Fan, J., Hoellenriegel, J., Sivina, M., Dubuc, A. M., Fraser, C., Han, Y., Li, S., Livak, K. J., Zou, L., Wan, Y., Konoplev, S., ... Wu, C. J. (2016). Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS11589>
- Burger, J. A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N. J., Dell'Aquila, M., & Kipps, T. J. (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, *96*(8), 2655–2663. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V96.8.2655>
- Burger, J. A., Zvaifler, N. J., Tsukada, N., Firestein, G. S., & Kipps, T. J. (2001). Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*, *107*(3), 305–315. <https://doi.org/10.1172/JCI11092>
- Bürkle, A., Niedermeier, M., Schmitt-Gräff, A., Wierda, W. G., Keating, M. J., & Burger, J. A. (2007). Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *110*(9), 3316–3325. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-05-089409>
- Butcher, E. C., & Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, *272*(5258), 60–66. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5258.60>
- Byrd, J. C., Brown, J. R., O'Brien, S., Barrientos, J. C., Kay, N. E., Reddy, N. M., Coutre, S., Tam, C. S., Mulligan, S. P., Jaeger, U., Devereux, S., Barr, P. M., Furman, R. R., Kipps, T. J., Cymbalista, F., Pocock, C., Thornton, P., Caligaris-Cappio, F., Robak, T., ... Hillmen, P. (2014). Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *371*(3), 213–223. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1400376>
- Byrd, J. C., Harrington, B., O'Brien, S., Jones, J. A., Schuh, A., Devereux, S., Chaves, J., Wierda, W. G., Awan, F. T., Brown, J. R., Hillmen, P., Stephens, D. M., Ghia, P., Barrientos, J. C., Pagel, J. M., Woyach, J., Johnson, D., Huang, J., Wang, X., ... Furman, R. R. (2016). Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *374*(4), 323–332. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1509981>

- Bystry, R. S., Aluvihare, V., Welch, K. A., Kallikourdis, M., & Betz, A. G. (2001). B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nature Immunology*, 2(12), 1126–1132. <https://doi.org/10.1038/NI735>
- Byun, H. J., Hong, I. K., Kim, E., Jin, Y. J., Jeoung, D. il, Hahn, J. H., Kim, Y. M., Seong, H. P., & Lee, H. (2006). A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 34833–34847. <https://doi.org/10.1074/JBC.M605483200>
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Seminars in Oncology*, 33(2), 167–173. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2006.01.010>
- Calissano, C., Damle, R. N., Hayes, G., Murphy, E. J., Hellerstein, M. K., Moreno, C., Sison, C., Kaufman, M. S., Kolitz, J. E., Allen, S. L., Rai, K. R., & Chiorazzi, N. (2009). In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 114(23), 4832–4842. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-05-219634>
- Calissano, C., Damle, R. N., Marsilio, S., Yan, X. J., Yancopoulos, S., Hayes, G., Emson, C., Murphy, E. J., Hellerstein, M. K., Sison, C., Kaufman, M. S., Kolitz, J. E., Allen, S. L., Rai, K. R., Ivanovic, I., Dozmorov, I. M., Roa, S., Scharff, M. D., Li, W., & Chiorazzi, N. (2011). Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(11–12), 1374–1382. <https://doi.org/10.2119/MOLMED.2011.00360>
- Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., & Butcher, E. C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), 381–384. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.279.5349.381>
- Campregher, P. V., & Hamerschlak, N. (2014). Novel prognostic gene mutations identified in chronic lymphocytic leukemia and their impact on clinical practice. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 14(4), 271–276. <https://doi.org/10.1016/J.CLML.2013.12.016>
- Cardoso, L. C., Soares, R. da S., Laurentino, T. de S., Lerario, A. M., Marie, S. K. N., & Oba-Shinjo, S. M. (2019). CD99 Expression in Glioblastoma Molecular Subtypes and Role in Migration and Invasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/IJMS20051137>
- Catovsky, D., Richards, S., Matutes, E., Oscier, D., Dyer, M., Bezares, R., Pettitt, A., Hamblin, T., Milligan, D., Child, J., Hamilton, M., Dearden, C., Smith, A., Bosanquet, A., Davis, Z., Brito-Babapulle, V., Else, M., Wade, R., & Hillmen, P. (2007). Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 370(9583), 230–239. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61125-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61125-8)

- Cervantes-Gomez, F., Lamothe, B., Woyach, J. A., Wierda, W. G., Keating, M. J., Balakrishnan, K., & Gandhi, V. (2015). Pharmacological and Protein Profiling Suggests Venetoclax (ABT-199) as Optimal Partner with Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(16), 3705–3715. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2809>
- Chung, S. S., Eng, W. S., Hu, W., Khalaj, M., Garrett-Bakelman, F. E., Tavakkoli, M., Levine, R. L., Carroll, M., Klimek, V. M., Melnick, A. M., & Park, C. Y. (2017). CD99 is a therapeutic target on disease stem cells in myeloid malignancies. *Science Translational Medicine*, 9(374). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAJ2025>
- Ciccione, M., Agostinelli, C., Rigolin, G. M., Piccaluga, P. P., Cavazzini, F., Righi, S., Sista, M. T., Sofritti, O., Rizzotto, L., Sabbatini, E., Fioritoni, G., Falorio, S., Stelitano, C., Olivieri, A., Attolico, I., Brugiattelli, M., Zinzani, P. L., Saccenti, E., Capello, D., ... Pileri, S. (2012). Proliferation centers in chronic lymphocytic leukemia: correlation with cytogenetic and clinicobiological features in consecutive patients analyzed on tissue microarrays. *Leukemia*, 26(3), 499–508. <https://doi.org/10.1038/LEU.2011.247>
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. v., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13944–13949. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0506654102>
- Claus, R., Lucas, D. M., Ruppert, A. S., Williams, K. E., Weng, D., Patterson, K., Zucknick, M., Oakes, C. C., Rassenti, L. Z., Greaves, A. W., Geyer, S., Wierda, W. G., Brown, J. R., Gribben, J. G., Barrientos, J. C., Rai, K. R., Kay, N. E., Kipps, T. J., Shields, P., ... Byrd, J. C. (2014). Validation of ZAP-70 methylation and its relative significance in predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 124(1), 42–48. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-02-555722>
- ClinVar*. (n.d.). Retrieved April 14, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
- Coelho, V., Krysov, S., Steele, A., Hidalgo, M. S., Johnson, P. W., Chana, P. S., Packham, G., Stevenson, F. K., & Forconi, F. (2013). Identification in CLL of circulating intraclonal subgroups with varying B-cell receptor expression and function. *Blood*, 122(15), 2664–2672. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-02-485425>
- Collins, R. J., Verschuer, L. A., Harmon, B. v., Prentice, R. L., Pope, J. H., & Kerr, J. F. R. (1989). Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *British Journal of Haematology*, 71(3), 343–350. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.1989.TB04290.X>
- Cols, M., Barra, C. M., He, B., Puga, I., Xu, W., Chiu, A., Tam, W., Knowles, D. M., Dillon, S. R., Leonard, J. P., Furman, R. R., Chen, K., & Cerutti, A. (2012). Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-

- related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *188*(12), 6071–6083. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1102066>
- Coustan-Smith, E., Song, G., Clark, C., Key, L., Liu, P., Mehrpooya, M., Stow, P., Su, X., Shurtleff, S., Pui, C. H., Downing, J. R., & Campana, D. (2011). New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *117*(23), 6267–6276. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-12-324004>
- Cox, D., Brennan, M., & Moran, N. (2010). Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *9*(10), 804–820. <https://doi.org/10.1038/NRD3266>
- Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marcé, S., López-Guillermo, A., Campo, E., & Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *348*(18), 1764–1775. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA023143>
- Cuesta-Mateos, C., López-Giral, S., Alfonso-Pérez, M., de Soria, V. G. G., Loscertales, J., Guasch-Vidal, S., Beltrán, A. E., Zapata, J. M., & Muñoz-Calleja, C. (2010). Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Experimental Hematology*, *38*(9), 756–764.e4. <https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2010.05.003>
- Cuní, S., Pérez-Aciego, P., Pérez-Chacón, G., Vargas, J. A., Sánchez, A., Martín-Saavedra, F. M., Ballester, S., García-Marco, J., Jordá, J., & Durántez, A. (2004). A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*, *18*(8), 1391–1400. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2403398>
- Cyster, J. G., Ansel, K. M., Reif, K., Ekland, E. H., Hyman, P. L., Tang, H. L., Luther, S. A., & Ngo, V. N. (2000). Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunological Reviews*, *176*, 181–193. <https://doi.org/10.1034/J.1600-065X.2000.00618.X>
- Cyster, J. G., Ngo, V. N., Ekland, E. H., Gunn, M. D., Sedgwick, J. D., & Ansel, K. M. (1999). Chemokines and B-cell homing to follicles. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *246*, 87–93. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60162-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60162-0_11)
- Dal Bo, M., Tissino, E., Benedetti, D., Caldana, C., Bomben, R., del Poeta, G., Gaidano, G., Rossi, F. M., Zucchetto, A., & Gattei, V. (2014). Microenvironmental interactions in chronic lymphocytic leukemia: the master role of CD49d. *Seminars in Hematology*, *51*(3), 168–176. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINHEMATOL.2014.05.002>
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1999). Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, *94*(6), 1840–1847. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.6.1840>

- Damm, F., Mylonas, E., Cosson, A., Yoshida, K., della Valle, V., Mouly, E., Diop, M., Scourzic, L., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Kikushige, Y., Davi, F., Lambert, J., Gautheret, D., Merle-Béral, H., Sutton, L., Dessen, P., ... Bernard, O. A. (2014). Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discovery*, *4*(9), 1088–1101. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0104>
- D'Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., Dell'Olio, M., di Renzo, N., Perla, G., Savino, L., & Carotenuto, M. (2001). CD38 expression correlates with adverse biological features and predicts poor clinical outcome in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *42*(1–2), 109–114. <https://doi.org/10.3109/10428190109097682>
- Davids, M. S., Deng, J., Wiestner, A., Lannutti, B. J., Wang, L., Wu, C. J., Wilson, W. H., Brown, J. R., & Letai, A. (2012). Decreased mitochondrial apoptotic priming underlies stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *120*(17), 3501–3509. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-02-414060>
- de Gorter, D. J. J., Beuling, E. A., Kersseboom, R., Middendorp, S., van Gils, J. M., Hendriks, R. W., Pals, S. T., & Spaargaren, M. (2007). Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity*, *26*(1), 93–104. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2006.11.012>
- de La Fuente, M. T., Casanova, B., Garcia-Gila, M., Silva, A., & Garcia-Pardo, A. (1999). Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia*, *13*(2), 266–274. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2401275>
- de Novellis, D., Cacace, F., Caprioli, V., Wierda, W. G., Mahadeo, K. M., & Tambaro, F. P. (2021). The TKI Era in Chronic Leukemias. *Pharmaceutics*, *13*(12). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13122201>
- de Rooij, M. F. M., Kuil, A., Geest, C. R., Eldering, E., Chang, B. Y., Buggy, J. J., Pals, S. T., & Spaargaren, M. (2012). The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *119*(11), 2590–2594. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-11-390989>
- Deaglio, S., Vaisitti, T., Bergui, L., Bonello, L., Horenstein, A. L., Tamagnone, L., Bousmell, L., & Malavasi, F. (2005). CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood*, *105*(8), 3042–3050. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-10-3873>
- Deng, J., Isik, E., Fernandes, S. M., Brown, J. R., Letai, A., & Davids, M. S. (2017). Bruton's tyrosine kinase inhibition increases BCL-2 dependence and enhances sensitivity to venetoclax in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *31*(10), 2075–2084. <https://doi.org/10.1038/LEU.2017.32>
- Dewald, G. W., Brockman, S. R., Paternoster, S. F., Bone, N. D., O'Fallon, J. R., Allmer, C., James, C. D., Jelinek, D. F., Tschumper, R. C., Hanson, C. A., Pruthi, R. K., Witzig, T. E., Call, T. G., &

- Kay, N. E. (2003). Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: Correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *121*(2), 287–295. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.2003.04265.X>
- Dicker, F., Herholz, H., Schnittger, S., Nakao, A., Patten, N., Wu, L., Kern, W., Haferlach, T., & Haferlach, C. (2009). The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, *23*(1), 117–124. <https://doi.org/10.1038/LEU.2008.274>
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., & Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *343*(26), 1910–1916. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012283432602>
- Dubovsky, J. A., Chappell, D. L., Harrington, B. K., Agrawal, K., Andritsos, L. A., Flynn, J. M., Jones, J. A., Paulaitis, M. E., Bolon, B., Johnson, A. J., Byrd, J. C., & Muthusamy, N. (2013). Lymphocyte cytosolic protein 1 is a chronic lymphocytic leukemia membrane-associated antigen critical to niche homing. *Blood*, *122*(19), 3308. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-05-504597>
- Dufour, E. M., Deroche, A., Bae, Y., & Muller, W. A. (2008). CD99 is essential for leukocyte diapedesis in vivo. *Cell Communication & Adhesion*, *15*(4), 351–363. <https://doi.org/10.1080/15419060802442191>
- Dustin ML., & Springer TA. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature*, *341*(6243), 619–624. <https://doi.org/10.1038/341619A0>
- Dworzak, M. N., Fritsch, G., Fleischer, C., Printz, D., Fro“schl, G., Fro“schl, F., Buchinger, P., Mann, G., & Gadner, H. (1999). *CD99 (MIC2) expression in paediatric B-lineage leukaemia/lymphoma reflects maturation-associated patterns of normal B-lymphopoiesis.*
- Eichhorst, B. F., Busch, R., Hopfinger, G., Pasold, R., Hensel, M., Steinbrecher, C., Siehl, S., Jäger, U., Bergmann, M., Stilgenbauer, S., Schweighofer, C., Wendtner, C. M., Döhner, H., Brittinger, G., Emmerich, B., & Hallek, M. (2006). Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *107*(3), 885–891. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-06-2395>
- Eichhorst, B. F., Busch, R., Stilgenbauer, S., Stauch, M., Bergmann, M. A., Ritgen, M., Kranzhöfer, N., Rohrberg, R., Söling, U., Burkhard, O., Westermann, A., Goede, V., Schweighofer, C. D., Fischer, K., Fink, A. M., Wendtner, C. M., Brittinger, G., Döhner, H., Emmerich, B., & Hallek, M. (2009). First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *114*(16), 3382–3391. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-02-206185>

- Enein, A. A. A., Rahman, H. A. A., Sharkawy, N. el, Abd Elhamid, S. M., Abbas, S. M. A., Abdelfaatah, R., Khalil, M., & Fathalla, L. A. (2016). Significance of CD99 expression in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Biomarkers : Section A of Disease Markers*, 17(2), 117–123. <https://doi.org/10.3233/CBM-160608>
- Fabbri, G., & Dalla-Favera, R. (2016). The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Cancer* 2016 16:3, 16(3), 145–162. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.8>
- Fabbri, G., Rasi, S., Rossi, D., Trifonov, V., Khiabani, H., Ma, J., Grunn, A., Fangazio, M., Capello, D., Monti, S., Cresta, S., Gargiulo, E., Forconi, F., Guarini, A., Arcaini, L., Paulli, M., Laurenti, L., Larocca, L. M., Marasca, R., ... Gaidano, G. (2011). Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(7), 1389–1401. <https://doi.org/10.1084/JEM.20110921>
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S. L., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Dighiero, G., Schroeder, H. W., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(8), 1515–1525. <https://doi.org/10.1172/JCI3009>
- Farooqui, M. Z. H., Valdez, J., Martyr, S., Aue, G., Saba, N., Niemann, C. U., Herman, S. E. M., Tian, X., Marti, G., Soto, S., Hughes, T. E., Jones, J., Lipsky, A., Pittaluga, S., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C., Lee, Y. S., Pedersen, L. B., Geisler, C. H., ... Wiestner, A. (2015). Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *The Lancet. Oncology*, 16(2), 169–176. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71182-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71182-9)
- Ferrer, G., & Montserrat, E. (2018). Critical molecular pathways in CLL therapy. In *Molecular Medicine* (Vol. 24, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0001-1>
- Flinn, I. W., Neuberg, D. S., Grever, M. R., Dewald, G. W., Bennett, J. M., Paietta, E. M., Hussein, M. A., Appelbaum, F. R., Larson, R. A., Moore, D. F., & Tallman, M. S. (2007). Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(7), 793–798. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.0762>
- Forbes, S. A., Beare, D., Boutselakis, H., Bamford, S., Bindal, N., Tate, J., Cole, C. G., Ward, S., Dawson, E., Ponting, L., Stefancsik, R., Harsha, B., YinKok, C., Jia, M., Jubb, H., Sondka, Z., Thompson, S., De, T., & Campbell, P. J. (2017). COSMIC: Somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D777–D783. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW1121>
- Gahn, B., Schäfer, C., Neef, J., Troff, C., Feuring-Buske, M., Hiddemann, W., & Wörmann, B. (1997). Detection of Trisomy 12 and Rb-Deletion in CD34+ Cells of Patients With B-Cell

- Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 89(12), 4275–4281. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V89.12.4275>
- Gaidano, G., & Rossi, D. (2017). The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2017(1), 329–337. <https://doi.org/10.1182/ASHEDUCATION-2017.1.329>
- Gao, W., Wang, M., Wang, L., Lu, H., Wu, S., Dai, B., Ou, Z., Zhang, L., Heymach, J. v., Gold, K. A., Minna, J., Roth, J. A., Hofstetter, W. L., Swisher, S. G., & Fang, B. (2014). Selective antitumor activity of ibrutinib in EGFR-mutant non-small cell lung cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(9). <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJU204>
- García-Marco, J. A., Delgado, J., Hernández-Rivas, J. A., Ramírez Payer, Á., Loscertales Pueyo, J., Jarque, I., Abrisqueta, P., Giraldo, P., Martínez, R., Yáñez, L., Terol, M. J., González, M., & Bosch, F. (2017). Actualización de las guías nacionales de consenso del Grupo Español de Leucemia Linfocítica Crónica para el tratamiento y seguimiento de la leucemia linfocítica crónica. *Medicina Clínica*, 148(8), 381.e1-381.e9. <https://doi.org/10.1016/J.MEDCLI.2016.12.030>
- Gattei, V., Bulian, P., del Principe, M. I., Zucchetto, A., Maurillo, L., Buccisano, F., Bomben, R., Dal-Bo, M., Luciano, F., Rossi, F. M., Degan, M., Amadori, S., & del Poeta, G. (2008). Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 111(2), 865–873. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-05-092486>
- Gehrke, I., Gandhirajan, R. K., Poll-Wolbeck, S. J., Hallek, M., & Kreuzer, K. A. (2011). Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(7–8), 619–627. <https://doi.org/10.2119/MOLMED.2010.00210>
- Genevier, H. C., Hinshelwood, S., Gaspar, H. B., Rigley, K. P., Brown, D., Saeland, S., Rousset, F., Levinsky, R. J., Callard, R. E., Kinnon, C., & Lovering, R. C. (1994). Expression of Bruton's tyrosine kinase protein within the B cell lineage. *European Journal of Immunology*, 24(12), 3100–3105. <https://doi.org/10.1002/EJI.1830241228>
- GELLC. Guías de tratamiento de LLC vs 18 abril 2023; Available from: [https://www.gelc.es/images/pdf/PPT\\_GUIAS\\_GELLC-V1.pdf](https://www.gelc.es/images/pdf/PPT_GUIAS_GELLC-V1.pdf)
- Ghamlouch, H., Ouled-Haddou, H., Damaj, G., Royer, B., Gubler, B., & Marolleau, J. P. (2013). A Combination of Cytokines Rescues Highly Purified Leukemic CLL B-Cells from Spontaneous Apoptosis In Vitro. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060370>
- Ginaldi, L., de Martinis, M., Matutes, E., Farahat, N., Morilla, R., & Catovsky, D. (1998). Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of Clinical Pathology*, 51(5), 364–369. <https://doi.org/10.1136/JCP.51.5.364>

- Giudicelli, V., Brochet, X., & Lefranc, M.-P. (2011). IMGT/V-QUEST: IMGT standardized analysis of the immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) nucleotide sequences. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(6), 695–715. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5633>
- Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C. M., Chagorova, T., de la Serna, J., Dilhuydy, M.-S., Illmer, T., Opat, S., Owen, C. J., Samoylova, O., Kreuzer, K.-A., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Langerak, A. W., Ritgen, M., Kneba, M., ... Hallek, M. (2014). Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *The New England Journal of Medicine*, 370(12), 1101–1110. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1313984>
- Goede, V., Fischer, K., Engelke, A., Schlag, R., Lepretre, S., Montero, L. F. C., Montillo, M., Fegan, C., Asikanius, E., Humphrey, K., Fingerle-Rowson, G., & Hallek, M. (2015). Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study. *Leukemia*, 29(7), 1602–1604. <https://doi.org/10.1038/LEU.2015.14>
- González-Rincón, J., Gómez, S., Martínez, N., Troulé, K., Perales-Patón, J., Derdak, S., Beltrán, S., Fernández-Cuevas, B., Pérez-Sanz, N., Nova-Gurumeta, S., Gut, I., Al-Shahrour, F., Piris, M. A., García-Marco, J. A., & Sánchez-Beato, M. (2019). Clonal dynamics monitoring during clinical evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37389-7>
- Goodfellow, P. N., Pym, B., Pritchard, C., Ellis, N., Palmer, M., Smith, M., & Goodfellow, P. J. (1988). MIC2: a human pseudoautosomal gene. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 322(1208), 145–154. <https://doi.org/10.1098/RSTB.1988.0122>
- Goto, A., Niki, T., Terado, Y., Fukushima, J., & Fukayama, M. (2004). Prevalence of CD99 protein expression in pancreatic endocrine tumours (PETs). *Histopathology*, 45(4), 384–392. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2559.2004.01967.X>
- Guarini, A., Marinelli, M., Tavolaro, S., Bellacchio, E., Magliozzi, M., Chiaretti, S., de Propriis, M. S., Peragine, N., Santangelo, S., Paoloni, F., Nanni, M., del Giudice, I., Mauro, F. R., Torrente, I., & Foà, R. (2012). ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica*, 97(1), 47–55. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2011.049270>
- Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D., & Williams, L. T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), 258–263. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.1.258>
- Haferlach, T., Kohlmann, A., Wiczorek, L., Basso, G., te Kronnie, G., Béné, M. C., de Vos, J., Hernández, J. M., Hofmann, W. K., Mills, K. I., Gilkes, A., Chiaretti, S., Shurtleff, S. A., Kipps, T. J., Rassenti, L. Z., Yeoh, A. E., Papenhausen, P. R., Liu, W. M., Williams, P. M., & Foà, R. (2010). Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in

- Leukemia Study Group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(15), 2529–2537. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4732>
- Hahn, J. H., Kim, M. K., Choi, E. Y., Kim, S. H., Sohn, H. W., Ham, D. I., Chung, D. H., Kim, T. J., Lee, W. J., Park, C. K., Ree, H. J., & Park, S. H. (1997). CD99 (MIC2) regulates the LFA-1/ICAM-1-mediated adhesion of lymphocytes, and its gene encodes both positive and negative regulators of cellular adhesion. *The Journal of Immunology*, 159(5).
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K. R., Byrd, J. C., Eichhorst, B., O'Brien, S., Robak, T., Seymour, J. F., & Kipps, T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131(25), 2745–2760. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2017-09-806398>
- Hallek, M., Fischer, K., Fingerle-Rowson, G., Fink, A. M., Busch, R., Mayer, J., Hensel, M., Hopfinger, G., Hess, G., von Grünhagen, U., Bergmann, M., Catalano, J., Zinzani, P. L., Caligaris-Cappio, F., Seymour, J. F., Berrebi, A., Jäger, U., Cazin, B., Trneny, M., ... Stilgenbauer, S. (2010). Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 376(9747), 1164–1174. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61381-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61381-5)
- Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E., & Emmerich, B. (1999). Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 93(5), 1732–1737.
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., & Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 94(6), 1848–1854. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.6.1848>
- Hamblin, T. J., Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Thomas, P. W., Stevenson, F. K., & Oscier, D. G. (2002). CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, 99(3), 1023–1029. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V99.3.1023>
- Hamidi, H., Pietilä, M., & Ivaska, J. (2016). The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. *British Journal of Cancer*, 115(9), 1017–1023. <https://doi.org/10.1038/BJC.2016.312>
- Hamilton, E., Pearce, L., Morgan, L., Robinson, S., Ware, V., Brennan, P., Thomas, N. S. B., Yallop, D., Devereux, S., Fegan, C., Buggins, A. G. S., & Pepper, C. (2012). Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, 158(5), 589–599. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2012.09191.X>

- Han, T., Ezdinli, E. Z., Shimaoka, K., & Desai, D. v. (1973). Chlorambucil vs. combined chlorambucil-corticosteroid therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 31: 502-508. <https://doi.org/10.1002/1097-0142>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hartmann, E. M., Rudelius, M., Burger, J. A., & Rosenwald, A. (2016). CCL3 chemokine expression by chronic lymphocytic leukemia cells orchestrates the composition of the microenvironment in lymph node infiltrates. *Leukemia & Lymphoma*, 57(3), 563–571. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1068308>
- Heinig, K., Gätjen, M., Grau, M., Stache, V., Anagnostopoulos, I., Gerlach, K., Niesner, R. A., Cseresnyes, Z., Hauser, A. E., Lenz, P., Hehlhans, T., Brink, R., Westermann, J., Dörken, B., Lipp, M., Lenz, G., Rehm, A., & Höpken, U. E. (2014). Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer Discovery*, 4(12), 1448–1465. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0096>
- Hendriks, R. W., Yuvaraj, S., & Kil, L. P. (2014). Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nature Reviews. Cancer*, 14(4), 219–232. <https://doi.org/10.1038/NRC3702>
- Herishanu, Y., Pérez-Galán, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., Raghavachari, N., Liu, P., McCoy, J. P., Raffeld, M., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C., Sherry, R., Arthur, D. C., Maric, I., ... Wiestner, A. (2011). The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 117(2), 563–574. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-05-284984>
- Herman, S. E. M., Farooqui, M., Bezabhe, R., Aue, G., & Wiestner, A. (2012). In Vivo Effects of Ibrutinib On BCR Signaling, Tumor Cell Activation and Proliferation in Blood and Tissue-Resident Cells of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Blood*, 120(21), 185–185. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V120.21.185.185>
- Herman, S. E. M., Jones, J., Mustafa, R. Z., Farooqui, M., & Wiestner, A. (2013). In Vivo Effects Of Ibrutinib On The Migration Of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Differ Between Patients and Reduce The Ability Of The Bone Marrow Microenvironment To Attract The Tumor Cells. *Blood*, 122(21), 604–604. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V122.21.604.604>
- Herman, S. E. M., Mustafa, R. Z., Gyamfi, J. A., Pittaluga, S., Chang, S., Chang, B., Farooqui, M., & Wiestner, A. (2014). Ibrutinib inhibits BCR and NF-κB signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood*, 123(21), 3286–3295. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-02-548610>
- Herman, S. E. M., Mustafa, R. Z., Jones, J., Wong, D. H., Farooqui, M., & Wiestner, A. (2015). Treatment with Ibrutinib Inhibits BTK- and VLA-4-Dependent Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In Vivo. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the*

- American Association for Cancer Research*, 21(20), 4642–4651.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0781>
- Herman, S. E. M., Niemann, C. U., Farooqui, M., Jones, J., Mustafa, R. Z., Lipsky, A., Saba, N., Martyr, S., Soto, S., Valdez, J., Gyamfi, J. A., Maric, I., Calvo, K. R., Pedersen, L. B., Geisler, C. H., Liu, D., Marti, G. E., Aue, G., & Wiestner, A. (2014). Ibrutinib-induced lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia: correlative analyses from a phase II study. *Leukemia*, 28(11), 2188–2196. <https://doi.org/10.1038/LEU.2014.122>
- Herman, S. E. M., & Wiestner, A. (2016). Preclinical modeling of novel therapeutics in chronic lymphocytic leukemia: the tools of the trade. *Seminars in Oncology*, 43(2), 222–232. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2016.02.007>
- Hernández, J. Á., Rodríguez, A. E., González, M., Benito, R., Fontanillo, C., Sandoval, V., Romero, M., Martín-Núñez, G., de Coca, A. G., Fisac, R., Galende, J., Recio, I., Ortuño, F., Garcaí, J. L., de Rivas, J. I., Gutierrez, N. C., Miguel, J. F. S., & Hernández, J. M. (2009). A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica*, 94(3), 364–371. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.13862>
- Herndon, T. M., Chen, S. S., Saba, N. S., Valdez, J., Emson, C., Gatmaitan, M., Tian, X., Hughes, T. E., Sun, C., Arthur, D. C., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C. M., Niemann, C. U., Marti, G. E., Aue, G., Soto, S., Farooqui, M. Z. H., Herman, S. E. M., Chiorazzi, N., & Wiestner, A. (2017). Direct in vivo evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood. *Leukemia*, 31(6), 1340–1347. <https://doi.org/10.1038/LEU.2017.11>
- Hockenbery, D., Nuñez, G., Millman, C., Schreiber, R. D., & Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348(6299), 334–336. <https://doi.org/10.1038/348334A0>
- Hoellenriegel, J., Meadows, S. A., Sivina, M., Wierda, W. G., Kantarjian, H., Keating, M. J., Giese, N., O'Brien, S., Yu, A., Miller, L. L., Lannutti, B. J., & Burger, J. A. (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. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-05-352492>
- IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. (n.d.). Retrieved April 14, 2023, from <https://www.iarc.who.int/>
- Ishibe, N., Sgambati, M. T., Fontaine, L., Goldin, L. R., Jain, N., Weissman, N., Marti, G. E., & Caporaso, N. E. (2001). Clinical characteristics of familial B-CLL in the National Cancer Institute Familial Registry. *Leukemia & Lymphoma*, 42(1–2), 99–108. <https://doi.org/10.3109/10428190109097681>
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., & Thun, M. J. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 57(1), 43–66. <https://doi.org/10.3322/CANJCLIN.57.1.43>

- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer Statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *60*(5), 277–300. <https://doi.org/10.3322/caac.20073>
- Jeyakumaran, D., Kempel, A., & Cote, S. (2016). An Assessment of The Number of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Patients Eligible For Front-Line Treatment But Unsuitable For Full-Dose Fludarabine Across The European Union. *Value in Health*, *19*(7), A574–A575. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2016.09.1317>
- Kamel, S., Horton, L., Ysebaert, L., Levade, M., Burbury, K., Tan, S., Cole-Sinclair, M., Reynolds, J., Filshie, R., Schischka, S., Khot, A., Sandhu, S., Keating, M. J., Nandurkar, H., & Tam, C. S. (2015). Ibrutinib inhibits collagen-mediated but not ADP-mediated platelet aggregation. *Leukemia*, *29*(4), 783–787. <https://doi.org/10.1038/LEU.2014.247>
- Kamiguti, A. S., Lee, E. S., Till, K. J., Harris, R. J., Glenn, M. A., Lin, K., Chen, H. J., Zuzel, M., & Cawley, J. C. (2004). The role of matrix metalloproteinase 9 in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *125*(2), 128–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04877.x>
- Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., O'Brien, S., Gribben, J., & Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews. Disease Primers*, *3*, 17008. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2017.8>
- Knospe, W. H., Loeb, V., & Huculey, C. M. (1974). Bi-weekly chlorambucil treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* *33*:555-562., <https://doi.org/10.1002/1097-0142>
- Kröber, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Brückle, E., Lichter, P., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2002). VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *100*(4), 1410–1416. [https://doi.org/10.1182/BLOOD.V100.4.1410.H81602001410\\_1410\\_1416](https://doi.org/10.1182/BLOOD.V100.4.1410.H81602001410_1410_1416)
- Kurtova, A. v., Balakrishnan, K., Chen, R., Ding, W., Schnabl, S., Quiroga, M. P., Sivina, M., Wierda, W. G., Estrov, Z., Keating, M. J., Shehata, M., Jäger, U., Gandhi, V., Kay, N. E., Plunkett, W., & Burger, J. A. (2009). Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*, *114*(20), 4441–4450. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-07-233718>
- Kwok, M., & Wu, C. J. (2021). Clonal Evolution of High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia: A Contemporary Perspective. *Frontiers in Oncology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.790004>
- Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., de Bruyn, C., & Stryckmans, P. (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. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V91.7.2387>

- Lagneaux, L., Delforge, A., de Bruyn, C., Bernier, M., & Bron, D. (1999). Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma*, 35(5–6), 445–453. <https://doi.org/10.1080/10428199909169609>
- Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S. A., Vartanov, A., Fernandes, S. M., Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., ... Wu, C. J. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152(4), 714–726. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.01.019>
- Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Böttcher, S., Carter, S. L., Cibulskis, K., Mertens, D., Sougnez, C. L., Rosenberg, M., Hess, J. M., Edelman, J., Kless, S., Kneba, M., ... Wu, C. J. (2015a). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, 526(7574), 525–530. <https://doi.org/10.1038/NATURE15395>
- Langerbeins, P., Zhang, C., Robrecht, S., Cramer, P., Fürstenau, M., Al-Sawaf, O., von Tresckow, J., Fink, A. M., Kreuzer, K. A., Vehling-Kaiser, U., Tausch, E., Müller, L., Eckart, M. J., Schlag, R., Freier, W., Gaska, T., Balsler, C., Reiser, M., Stauch, M., ... Hallek, M. (2022). The CLL12 trial: ibrutinib vs placebo in treatment-naïve, early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 139(2), 177–187. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2021010845>
- Lannutti, B. J., Meadows, S. A., Herman, S. E. M., Kashishian, A., Steiner, B., Johnson, A. J., Byrd, J. C., Tyner, J. W., Loriaux, M. M., Deininger, M., Druker, B. J., Puri, K. D., Ulrich, R. G., & Giese, N. A. (2010). CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*, 117(2), 591–594. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-03-275305>
- Lee, J., & Wang, Y. L. (2020). Prognostic and Predictive Molecular Biomarkers in Chronic Lymphocytic Leukemia. In *Journal of Molecular Diagnostics* (Vol. 22, Issue 9, pp. 1114–1125). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.06.004>
- Levade, M., David, E., Garcia, C., Laurent, P. A., Cadot, S., Michallet, A. S., Bordet, J. C., Tam, C., Sié, P., Ysebaert, L., & Payrastre, B. (2014). Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood*, 124(26), 3991–3995. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-06-583294>
- Longo, P. G., Laurenti, L., Gobessi, S., Sica, S., Leone, G., & Efremov, D. G. (2008). The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 111(2), 846–855. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-05-089037>
- Lou, O., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., & Muller, W. A. (2007). CD99 Is a Key Mediator of the Transendothelial Migration of Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 178(2), 1136–1143. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.2.1136>

- Lozano-Santos, C., Amigo-Jiménez, I., Nova-Gurumeta, S., Pérez-Sanz, N., García-Pardo, A., & García-Marco, J. A. (2015). Arsenic trioxide synergistically potentiates the cytotoxic effect of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells by further inactivating the Akt and ERK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *461*(2), 243–248. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.04.007>
- Lozano-Santos, C., García-Vela, J. A., Pérez-Sanz, N., Nova-Gurumeta, S., Fernandez-Cuevas, B., Gomez-Lozano, N., Sánchez-Beato, M., Sanchez-Godoy, P., Bueno, J. L., & Garcia-Marco, J. A. (2017). Biallelic ATM alterations detected at diagnosis identify a subset of treatment-naïve chronic lymphocytic leukemia patients with reduced overall survival similar to patients with p53 deletion. *Leukemia & Lymphoma*, *58*(4), 859–865. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1213829>
- Lu, P., Wang, S., Franzen, C. A., Venkataraman, G., McClure, R., Li, L., Wu, W., Niu, N., Sukhanova, M., Pei, J., Baldwin, D. A., Nejati, R., Wasik, M. A., Khan, N., Tu, Y., Gao, J., Chen, Y., Ma, S., Larson, R. A., & Wang, Y. L. (2021). Ibrutinib and venetoclax target distinct subpopulations of CLL cells: implication for residual disease eradication. *Blood Cancer Journal*, *11*(2). <https://doi.org/10.1038/S41408-021-00429-Z>
- Lutzny, G., Kocher, T., Schmidt-Supprian, M., Rudelius, M., Klein-Hitpass, L., Finch, A. J., Dürig, J., Wagner, M., Haferlach, C., Kohlmann, A., Schnittger, S., Seifert, M., Wanninger, S., Zaborsky, N., Oostendorp, R., Ruland, J., Leitges, M., Kuhnt, T., Schäfer, Y., ... Ringshausen, I. (2013). Protein kinase c- $\beta$ -dependent activation of NF- $\kappa$ B in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell*, *23*(1), 77–92. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2012.12.003>
- Maddocks, K. J., Ruppert, A. S., Lozanski, G., Heerema, N. A., Zhao, W., Abruzzo, L., Lozanski, A., Davis, M., Gordon, A., Smith, L. L., Mantel, R., Jones, J. A., Flynn, J. M., Jaglowski, S. M., Andritsos, L. A., Awan, F., Blum, K. A., Grever, M. R., Johnson, A. J., ... Woyach, J. A. (2015). Etiology of Ibrutinib Therapy Discontinuation and Outcomes in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *JAMA Oncology*, *1*(1), 80–87. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2014.218>
- Madsen, C. D., & Sahai, E. (2010). Cancer dissemination--lessons from leukocytes. *Developmental Cell*, *19*(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2010.06.013>
- 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., & Marasca, R. (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*, *97*(6), 952–960. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2011.054924>
- Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T., & Aydin, S. (2008). Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiological Reviews*, *88*(3), 841–886. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00035.2007>

- Malcikova, J., Tausch, E., Rossi, D., Sutton, L. A., Soussi, T., Zenz, T., Kater, A. P., Niemann, C. U., Gonzalez, D., Davi, F., Gonzalez Diaz, M., Moreno, C., Gaidano, G., Stamatopoulos, K., Rosenquist, R., Stilgenbauer, S., Ghia, P., & Pospisilova, S. (2018). ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia - Update on methodological approaches and results interpretation. In *Leukemia* (Vol. 32, Issue 5, pp. 1070–1080). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41375-017-0007-7>
- Malek, S. N. (2013). The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*, 32(23), 2805–2817. <https://doi.org/10.1038/ONC.2012.411>
- Manara, M. C., Pasello, M., & Scotlandi, K. (2018). CD99: A cell surface protein with an oncojanus role in tumors. In *Genes* (Vol. 9, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes9030159>
- Manne, B. K., Badolia, R., Dangelmaier, C., Eble, J. A., Ellmeier, W., Kahn, M., & Kunapuli, S. P. (2015). Distinct Pathways Regulate Syk Protein Activation Downstream of Immune Tyrosine Activation Motif (ITAM) and hemITAM Receptors in Platelets. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11557. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.629527>
- Martínez-Trillos, A., Pinyol, M., Navarro, A., Aymerich, M., Jares, P., Juan, M., Rozman, M., Colomer, D., Delgado, J., Giné, E., González-Díaz, M., Hernández-Rivas, J. M., Colado, E., Rayón, C., Payer, A. R., Terol, M. J., Navarro, B., Quesada, V., Puente, X. S., ... Villamor, N. (2014). Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood*, 123(24), 3790–3796. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-12-543306>
- Mato, A. R., Nabhan, C., Thompson, M. C., Lamanna, N., Brander, D. M., Hill, B., Howlett, C., Skarbnik, A., Cheson, B. D., Zent, C., Pu, J., Kiselev, P., Goy, A., Claxton, D., Isaac, K., Kennard, K. H., Timlin, C., Landsburg, D., Winter, A., ... Ujjani, C. S. (2018). Toxicities and outcomes of 616 ibrutinib-treated patients in the United States: a real-world analysis. *Haematologica*, 103(5), 874–879. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2017.182907>
- Mauro, F. R., Foa, R., Giannarelli, D., Cordone, I., Crescenzi, S., Pescarmona, E., Sala, R., Cerretti, R., & Mandelli, F. (1999). Clinical Characteristics and Outcome of Young Chronic Lymphocytic Leukemia Patients: A Single Institution Study of 204 Cases. *Blood*, 94(2), 448–454. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V94.2.448>
- McMullen, J. R., Boey, E. J. H., Ooi, J. Y. Y., Seymour, J. F., Keating, M. J., & Tam, C. S. (2014). Ibrutinib increases the risk of atrial fibrillation, potentially through inhibition of cardiac PI3K-Akt signaling. *Blood*, 124(25), 3829–3830. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-10-604272>
- Messmer, B. T., Messmer, D., Allen, S. L., Kolitz, J. E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E. J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R. N., Wasil, T., Rai, K. R., Hellerstein, M. K., & Chiorazzi, N. (2005). In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 755–764. <https://doi.org/10.1172/JCI23409>

- Minden, M. D. von, Übelhart, R., Schneider, D., Wossning, T., Bach, M. P., Buchner, M., Hofmann, D., Surova, E., Follo, M., Köhler, F., Wardemann, H., Zirlik, K., Veelken, H., & Juma, H. (2012). Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*, *489*(7415), 309–312. <https://doi.org/10.1038/NATURE11309>
- Mittal, A. K., Chaturvedi, N. K., Rai, K. J., Gilling-Cutucache, C. E., Nordgren, T. M., Moragues, M., Lu, R., Opavsky, R., Bociek, G. R., Weisenburger, D. D., Iqbal, J., & Joshi, S. S. (2014). Chronic lymphocytic leukemia cells in a lymph node microenvironment depict molecular signature associated with an aggressive disease. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *20*(1), 290–301. <https://doi.org/10.2119/MOLMED.2012.00303>
- Molica, S. (2006). Sex differences in incidence and outcome of chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia & Lymphoma*, *47*(8), 1477–1480. <https://doi.org/10.1080/10428190600555819>
- Moreno, C., Greil, R., Demirkan, F., Tedeschi, A., Anz, B., Larratt, L., Simkovic, M., Samoilo, O., Novak, J., Ben-Yehuda, D., Strugov, V., Gill, D., Gribben, J. G., Hsu, E., Lih, C. J., Zhou, C., Clow, F., James, D. F., Styles, L., & Flinn, I. W. (2019). Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia (iLLUMINATE): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *20*(1), 43–56. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30788-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30788-5)
- Muller, W. A. (2009). Mechanisms of Transendothelial Migration of Leukocytes. *Circulation Research*, *105*(3), 223–230. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.200717>
- Muller, W. A. (2016). Transendothelial migration: unifying principles from the endothelial perspective. *Immunological Reviews*, *273*(1), 61–75. <https://doi.org/10.1111/IMR.12443>
- Nadeu, F., Clot, G., Delgado, J., Martín-García, D., Baumann, T., Salaverria, I., Beà, S., Pinyol, M., Jares, P., Navarro, A., Suárez-Cisneros, H., Aymerich, M., Rozman, M., Villamor, N., Colomer, D., González, M., Alcoceba, M., Terol, M. J., Navarro, B., ... Campo, E. (2018). Clinical impact of the subclonal architecture and mutational complexity in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *32*(3), 645–653. <https://doi.org/10.1038/LEU.2017.291>
- Nadeu, F., Delgado, J., Royo, C., Baumann, T., Stankovic, T., Pinyol, M., Jares, P., Navarro, A., Martín-García, D., Beà, S., Salaverria, I., Oldreive, C., Aymerich, M., Suárez-Cisneros, H., Rozman, M., Villamor, N., Colomer, D., López-Guillermo, A., González, M., ... Campo, E. (2016). Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *127*(17), 2122–2130. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-07-659144>
- Nishio, M., Endo, T., Tsukada, N., Ohata, J., Kitada, S., Reed, J. C., Zvaifler, N. J., & Kipps, T. J. (2005). Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 $\alpha$ . *Blood*, *106*(3), 1012–1020. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-03-0889>

- Oakes, C. C., Seifert, M., Assenov, Y., Gu, L., Przekopowicz, M., Ruppert, A. S., Wang, Q., Imbusch, C. D., Serva, A., Koser, S. D., Brocks, D., Lipka, D. B., Bogatyrova, O., Weichenhan, D., Brors, B., Rassenti, L., Kipps, T. J., Mertens, D., Zapatka, M., ... Plass, C. (2016). DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, *48*(3), 253–264. <https://doi.org/10.1038/NG.3488>
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., & Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, *121*(3), 335–348. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.02.034>
- Ortolano, S., Hwang, I. Y., Han, S. B., & Kehrl, J. H. (2006). Roles for phosphoinositide 3-kinases, Bruton's tyrosine kinase, and Jun kinases in B lymphocyte chemotaxis and homing. *European Journal of Immunology*, *36*(5), 1285–1295. <https://doi.org/10.1002/EJI.200535799>
- Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., Foroni, L., & Hoffbrand, A. v. (1996). Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *British Journal of Haematology*, *92*(1), 97–103. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.1996.00305.X>
- Parikh, S. A., & Shanafelt, T. D. (2016). Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology*, *43*(2), 233–240. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2016.02.009>
- Pasello, M., Manara, M. C., & Scotlandi, K. (2018). CD99 at the crossroads of physiology and pathology. In *Journal of Cell Communication and Signaling* (Vol. 12, Issue 1, pp. 55–68). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0445-z>
- Patel, V., Balakrishnan, K., Bibikova, E., Ayres, M., Keating, M. J., Wierda, W. G., & Gandhi, V. (2017). Comparison of Acalabrutinib, A Selective Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor, with Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *23*(14), 3734–3743. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1446>
- Pedersen, I. M., Kitada, S., Leoni, L. M., Zapata, J. M., Karras, J. G., Tsukada, N., Kipps, T. J., Choi, Y. S., Bennett, F., & Reed, J. C. (2002). Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*, *100*(5), 1795–1801. [https://doi.org/10.1182/BLOOD.V100.5.1795.H81702001795\\_1795\\_1801](https://doi.org/10.1182/BLOOD.V100.5.1795.H81702001795_1795_1801)
- Pepper, C., Buggins, A. G. S., Jones, C. H., Walsby, E. J., Forconi, F., Pratt, G., Devereux, S., Stevenson, F. K., & Fegan, C. (2015). Phenotypic heterogeneity in IGHV-mutated CLL patients has prognostic impact and identifies a subset with increased sensitivity to BTK and PI3K $\delta$  inhibition. *Leukemia*, *29*(3), 744–747. <https://doi.org/10.1038/LEU.2014.308>
- Petlickovski, A., Laurenti, L., Li, X., Marietti, S., Chiusolo, P., Sica, S., Leone, G., & Efremov, D. G. (2005). Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes

- survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 105(12), 4820–4827. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-07-2669>
- Ponader, S., Chen, S. S., Buggy, J. J., Balakrishnan, K., Gandhi, V., Wierda, W. G., Keating, M. J., O'Brien, S., Chiorazzi, N., & Burger, J. A. (2012). The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*, 119(5), 1182–1189. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-10-386417>
- Ponzoni, M., Doglioni, C., & Caligaris-Cappio, F. (2011). Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 28(2), 161–166. <https://doi.org/10.1053/J.SEMDP.2011.02.014>
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G. R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Beá, S., González-Díaz, M., Bassaganyas, L., Baumann, T., Juan, M., López-Guerra, M., Colomer, D., Tubío, J. M. C., López, C., Navarro, A., Tornador, C., ... Campo, E. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475(7354), 101–105. <https://doi.org/10.1038/NATURE10113>
- Purroy, N., Abrisqueta, P., Carabia, J., Carpio, C., Palacio, C., Bosch, F., & Crespo, M. (2015). Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget*, 6(10), 7632–7643. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2939>
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical Staging of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 46(2), 219–234. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V46.2.219.219>
- Rassenti, L. Z., Huynh, L., Toy, T. L., Chen, L., Keating, M. J., Gribben, J. G., Neuberg, D. S., Flinn, I. W., Rai, K. R., Byrd, J. C., Kay, N. E., Greaves, A., Weiss, A., & Kipps, T. J. (2004). ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 351(9), 893–901. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA040857>
- Rawlings, D. J., Schwartz, M. A., Jackson, S. W., & Meyer-Bahlburg, A. (2012). Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nature Reviews. Immunology*, 12(4), 282–294. <https://doi.org/10.1038/NRI3190>
- Rawstron, A. C., Kreuzer, K. A., Soosapilla, A., Spacek, M., Stehlikova, O., Gambell, P., McIver-Brown, N., Villamor, N., Psarra, K., Arroz, M., Milani, R., de la Serna, J., Cedena, M. T., Jaksic, O., Nomdedeu, J., Moreno, C., Rigolin, G. M., Cuneo, A., Johansen, P., ... Montserrat, E. (2018). Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 94(1), 121–128. <https://doi.org/10.1002/CYTO.B.21595>

- Redondo-Muñoz, J., Escobar-Díaz, E., Del Cerro, M. H., Pandiella, A., Terol, M. J., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2010). Induction of B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis by arsenic trioxide involves suppression of the phosphoinositide 3-kinase/Akt survival pathway via c-jun-NH2 terminal kinase activation and PTEN upregulation. *Clinical Cancer Research*, *16*(17), 4382–4391. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0072>
- Redondo-Muñoz, J., Escobar-Díaz, E., Samaniego, R., Terol, M. J., García-Marco, J. A., & García-Pardo, Á. (2006). MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by  $\alpha 4\beta 1$  integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*, *108*(9), 3143–3151. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-007294>
- Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal, E., Terol, M. J., Van den Steen, P. E., Hernández del Cerro, M., Roderfeld, M., Roeb, E., Opendakker, G., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2010). Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Chronic Lymphocytic Leukemia B Cell Survival through Its Hemopexin Domain. *Cancer Cell*, *17*(2), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.044>
- Rettig, M. P., Anstas, G., & Dipersio, J. F. (2012). Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells using inhibitors of CXCR4 and VLA-4. *Leukemia*, *26*(1), 34–53. <https://doi.org/10.1038/LEU.2011.197>
- Richardson, S. J., Matthews, C., Catherwood, M. A., Alexander, H. D., Carey, B. S., Farrugia, J., Gardiner, A., Mould, S., Oscier, D., Copplestone, J. A., & Prentice, A. G. (2006). ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, *107*(9), 3584–3592. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-04-1718>
- Ringshausen, I., Dechow, T., Schneller, F., Weick, K., Oelsner, M., Peschel, C., & Decker, T. (2004). Constitutive activation of the MAPkinase p38 is critical for MMP-9 production and survival of B-CLL cells on bone marrow stromal cells. *Leukemia*, *18*(12), 1964–1970. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2403544>
- Rizzo, R., Audrito, V., Vacca, P., Rossi, D., Brusa, D., Stignani, M., Bortolotti, D., D'Arena, G., Coscia, M., Laurenti, L., Forconi, F., Gaidano, G., Mingari, M. C., Moretta, L., Malavasi, F., & Deaglio, S. (2014). HLA-G is a component of the chronic lymphocytic leukemia escape repertoire to generate immune suppression: impact of the HLA-G 14 base pair (rs66554220) polymorphism. *Haematologica*, *99*(5), 888–896. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2013.095281>
- Roberts, A. W., Davids, M. S., Pagel, J. M., Kahl, B. S., Puvvada, S. D., Gerecitano, J. F., Kipps, T. J., Anderson, M. A., Brown, J. R., Gressick, L., Wong, S., Dunbar, M., Zhu, M., Desai, M. B., Cerri, E., Heitner Enschede, S., Humerickhouse, R. A., Wierda, W. G., & Seymour, J. F. (2016). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *374*(4), 311–322. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1513257>

- Rocchi, A., Manara, M. C., Sciandra, M., Zambelli, D., Nardi, F., Nicoletti, G., Garofalo, C., Meschini, S., Astolfi, A., Colombo, M. P., Lessnick, S. L., Picci, P., & Scotlandi, K. (2010). CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(3), 668–680. <https://doi.org/10.1172/JCI36667>
- Roecklein, B. A., & Torok-Storb, B. (1995). Functionally Distinct Human Marrow Stromal Cell Lines Immortalized by Transduction With the Human Papilloma Virus E6/E7 Genes. *Blood*, *85*(4), 997–1005. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V85.4.997.BLOODJOURNAL854997>
- Rosati, E., Sabatini, R., Rampino, G., Tabilio, A., di Ianni, M., Fettucciari, K., Bartoli, A., Coaccioli, S., Screpanti, I., & Marconi, P. (2009). Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*, *113*(4), 856–865. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-02-139725>
- Rossi, D., Brusca, A., Spina, V., Rasi, S., Khiabani, H., Messina, M., Fangazio, M., Vaisitti, T., Monti, S., Chiaretti, S., Guarini, A., del Giudice, I., Cerri, M., Cresta, S., Deambrogi, C., Gargiulo, E., Gattei, V., Forconi, F., Bertoni, F., ... Gaidano, G. (2011). Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*, *118*(26), 6904–6908. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-08-373159>
- Rossi, D., Fangazio, M., Rasi, S., Vaisitti, T., Monti, S., Cresta, S., Chiaretti, S., del Giudice, I., Fabbri, G., Brusca, A., Spina, V., Deambrogi, C., Marinelli, M., Famà, R., Greco, M., Daniele, G., Forconi, F., Gattei, V., Bertoni, F., ... Gaidano, G. (2012). Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *119*(12), 2854–2862. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-12-395673>
- Rossi, D., & Gaidano, G. (2012). ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter. *Haematologica*, *97*(1), 5–8. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2011.057109>
- Rossi, D., Gerber, B., & Stüssi, G. (2017). Predictive and prognostic biomarkers in the era of new targeted therapies for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *58*(7), 1548–1560. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1250264>
- Rossi, D., Khiabani, H., Spina, V., Ciardullo, C., Brusca, A., Famà, R., Rasi, S., Monti, S., Deambrogi, C., de Paoli, L., Wang, J., Gattei, V., Guarini, A., Foà, R., Rabadan, R., & Gaidano, G. (2014). Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *123*(14), 2139–2147. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-11-539726>
- Rossi, D., Rasi, S., Fabbri, G., Spina, V., Fangazio, M., Forconi, F., Marasca, R., Laurenti, L., Brusca, A., Cerri, M., Monti, S., Cresta, S., Famà, R., de Paoli, L., Bulian, P., Gattei, V., Guarini, A., Deaglio, S., Capello, D., ... Gaidano, G. (2012). Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *119*(2), 521–529. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-09-379966>

- Rozman, C., & Montserrat, E. (1995). Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 333(16), 1052–1057. <https://doi.org/10.1056/NEJM199510193331606>
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M., & Muller, W. A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nature Immunology*, 3(2), 143–150. <https://doi.org/10.1038/NI749>
- Schwartz, M. A., Schaller, M. D., & Ginsberg, M. H. (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11, 549–599. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CB.11.110195.003001>
- Sciandra, M., Marino, M. T., Manara, M. C., Guerzoni, C., Grano, M., Oranger, A., Lucarelli, E., Lollini, P. L., Dozza, B., Pratelli, L., di Renzo, M. F., Colombo, M. P., Picci, P., & Scotlandi, K. (2014). CD99 drives terminal differentiation of osteosarcoma cells by acting as a spatial regulator of ERK 1/2. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 29(5), 1295–1309. <https://doi.org/10.1002/JBMR.2141>
- Scotlandi, K., Zuntini, M., Manara, M. C., Sciandra, M., Rocchi, A., Benini, S., Nicoletti, G., Bernard, G., Nanni, P., Lollini, P. L., Bernard, A., & Picci, P. (2007). CD99 isoforms dictate opposite functions in tumour malignancy and metastases by activating or repressing c-Src kinase activity. *Oncogene*, 26(46), 6604–6618. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1210481>
- Seda, V., & Mraz, M. (2015). B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *European Journal of Haematology*, 94(3), 193–205. <https://doi.org/10.1111/EJH.12427>
- Senis, Y. A., Mazharian, A., & Mori, J. (2014). Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood*, 124(13), 2013. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-01-453134>
- Seol, H. J., Chang, J. H., Yamamoto, J., Romagnuolo, R., Suh, Y., Weeks, A., Agnihotri, S., Smith, C. A., & Rutka, J. T. (2012). Overexpression of CD99 Increases the Migration and Invasiveness of Human Malignant Glioma Cells. *Genes and Cancer*, 3(9–10), 535–549. [https://doi.org/10.1177/1947601912473603/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_1947601912473603-FIG8.JPEG](https://doi.org/10.1177/1947601912473603/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1947601912473603-FIG8.JPEG)
- Shanafelt, T. D., Jelinek, D., Tschumper, R., Schwager, S., Nowakowski, G., DeWald, G. W., & Kay, N. E. (2006). Cytogenetic abnormalities can change during the course of the disease process in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(19), 3218–3219. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.1077>
- Smolewski, P., & Robak, T. (2021). Current Treatment of Refractory/Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia: A Focus on Novel Drugs. In *Acta Haematologica* (Vol. 144, Issue 4, pp. 365–379). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000510768>
- Sohn, H. W., Shin, Y. K., Lee, I.-S., Bae, Y. M., Suh, Y. H., Kim, M. K., Kim, T. J., Jung, K. C., Park, W. S., Park, C.-S., Chung, D. H., Ahn, K., Kim, I. S., Ko, Y. H., Bang, Y. J., Kim, C. W., & Park, S. H.

- (2001). CD99 regulates the transport of MHC class I molecules from the Golgi complex to the cell surface. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(2), 787–794. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.166.2.787>
- Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Dayton, B. D., Ding, H., Enschede, S. H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C. S., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., ... Elmore, S. W. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 19(2), 202–208. <https://doi.org/10.1038/NM.3048>
- Spaargaren, M., Beuling, E. A., Rurup, M. L., Meijer, H. P., Klok, M. D., Middendorp, S., Hendriks, R. W., & Pals, S. T. (2003). The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLCgamma2. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(10), 1539–1550. <https://doi.org/10.1084/JEM.20011866>
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, 76(2), 301–314. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90337-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90337-9)
- Stamatopoulos, K., Agathangelidis, A., Rosenquist, R., & Ghia, P. (2017). Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 31(2), 282–291. <https://doi.org/10.1038/LEU.2016.322>
- Stamatopoulos, K., Belessi, C., Moreno, C., Boudjograh, M., Guida, G., Smilevska, T., Belhoul, L., Stella, S., Stavroyianni, N., Crespo, M., Hadzidimitriou, A., Sutton, L., Bosch, F., Laoutaris, N., Anagnostopoulos, A., Montserrat, E., Fassas, A., Dighiero, G., Caligaris-Cappio, F., ... Davi, F. (2007). Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*, 109(1), 259–270. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-03-012948>
- Stein, H., Bonk, A., Tolksdorf, G., Lennert, K., Rodt, H., & Gerdes, J. (1980). Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 28(8), 746–760. <https://doi.org/10.1177/28.8.7003001>
- Stevenson, F. K., Krysov, S., Davies, A. J., Steele, A. J., & Packham, G. (2011). B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 118(16), 4313–4320. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-06-338855>
- Stilgenbauer, S., Bullinger, L., Banner, A., Wildenberger, K., Bentz, M., Döhner, K., Ho, A. D., Lichter, P., & Döhner, H. (1999). Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999 13:9, 13(9), 1331–1334. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401499>
- Strasser, A., Cory, S., & Adams, J. M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO Journal*, 30(18), 3667–3683. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2011.307>

- Strati, P., & Shanafelt, T. D. (2015). Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood*, *126*(4), 454–462. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-02-585059>
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, *25*(6), 977–988. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2006.10.016>
- Suresh, S., & Irvine, A. E. (2015). The NOTCH signaling pathway in normal and malignant blood cell production. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *9*(1), 5–13. <https://doi.org/10.1007/S12079-015-0271-0>
- ten Hacken, E., & Burger, J. A. (2014a). Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacology & Therapeutics*, *144*(3), 338–348. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2014.07.003>
- ten Hacken, E., & Burger, J. A. (2014b). Molecular pathways: Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia-focus on the B-cell receptor. *Clinical Cancer Research*, *20*(3), 548–556. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0226>
- Tissino, E., Benedetti, D., Herman, S. E. M., ten Hacken, E., Ahn, I. E., Chaffee, K. G., Rossi, F. M., Bo, M. D., Bulian, P., Bomben, R., Bayer, E., Härzschel, A., Gutjahr, J. C., Postorino, M., Santinelli, E., Ayed, A., Zaja, F., Chiarenza, A., Pozzato, G., ... Zucchetto, A. (2018). Functional and clinical relevance of VLA-4 (CD49d/CD29) in ibrutinib-treated chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of Experimental Medicine*, *215*(2), 681–697. <https://doi.org/10.1084/JEM.20171288>
- Tissino, E., Pozzo, F., Benedetti, D., Caldana, C., Bittolo, T., Rossi, F. M., Bomben, R., Nanni, P., Chivilò, H., Cattarossi, I., Zaina, E., Norris, K., Polesel, J., Gentile, M., Tripepi, G., Moia, R., Santinelli, E., Innocenti, I., Olivieri, J., ... Zucchetto, A. (2020). CD49d promotes disease progression in chronic lymphocytic leukemia: new insights from CD49d bimodal expression. *Blood*, *135*(15), 1244–1254. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2019003179>
- Torzicky, M., Viznerova, P., Richter, S., Strobl, H., Scheinecker, C., Foedinger, D., & Riedl, E. (2012). Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and CD99 are critical in lymphatic transmigration of human dendritic cells. *The Journal of Investigative Dermatology*, *132*(4), 1149–1157. <https://doi.org/10.1038/JID.2011.420>
- Treanor, B. (2012). B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology*, *136*(1), 21–27. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2012.03564.X>
- Uy, G. L., Rettig, M. P., Motabi, I. H., McFarland, K., Trinkaus, K. M., Hladnik, L. M., Kulkarni, S., Abboud, C. N., Cashen, A. F., Stockerl-Goldstein, K. E., Vij, R., Westervelt, P., & DiPersio, J. F. (2012). A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, *119*(17), 3917–3924. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2011-10-383406>

- Vaikari, V. P., Du, Y., Wu, S., Zhang, T., Metzeler, K., Batcha, A. M. N., Herold, T., Hiddemann, W., Akhtari, M., & Alachkar, H. (2020). Clinical and preclinical characterization of CD99 isoforms in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, *105*(4), 999–1012. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2018.207001>
- Vaisitti, T., Aydin, S., Rossi, D., Cottino, F., Bergui, L., D’Arena, G., Bonello, L., Horenstein, A. L., Brennan, P., Pepper, C., Gaidano, G., Malavasi, F., & Deaglio, S. (2010). CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, *24*(5), 958–969. <https://doi.org/10.1038/LEU.2010.36>
- van Kooten, G., & Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand. *Journal of Leukocyte Biology*, *67*(1), 2–17. <https://doi.org/10.1002/JLB.67.1.2>
- Vandooren, J., Van Den Steen, P. E., & Opdenakker, G. (2013). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 48, Issue 3, pp. 222–272). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.770819>
- Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews. Immunology*, *15*(11), 692–704. <https://doi.org/10.1038/NRI3908>
- Vetrie, D., Vořechovský, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F., Hammarström, L., Kinnon, C., Levinsky, R., Bobrow, M., Smith, C. I. E., & Bentley, D. R. (1993). The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*, *361*(6409), 226–233. <https://doi.org/10.1038/361226A0>
- Walsby, E., Buggins, A., Devereux, S., Jones, C., Pratt, G., Brennan, P., Fegan, C., & Pepper, C. (2014). Development and characterization of a physiologically relevant model of lymphocyte migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *123*(23), 3607–3617. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-12-544569>
- Wang, L., Lawrence, M. S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., Werner, L., Sivachenko, A., DeLuca, D. S., Zhang, L., Zhang, W., Vartanov, A. R., Fernandes, S. M., Goldstein, N. R., Folco, E. G., Cibulskis, K., Tesar, B., Sievers, Q. L., Shefler, E., ... Wu, C. J. (2011). SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *365*(26), 2497–2506. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1109016>
- Watson, L., Wyld, P., & Catovsky, D. (2008). Disease burden of chronic lymphocytic leukaemia within the European Union. *European Journal of Haematology*, *81*(4), 253–258. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0609.2008.01114.X>
- Watson, R. L., Buck, J., Levin, L. R., Winger, R. C., Wang, J., Arase, H., & Muller, W. A. (2015). Endothelial CD99 signals through soluble adenylyl cyclase and PKA to regulate leukocyte transendothelial migration. *The Journal of Experimental Medicine*, *212*(7), 1021–1041. <https://doi.org/10.1084/JEM.20150354>

- Whitman, M., Kaplan, D. R., Schaffhausen, B., Cantley, L., & Roberts, T. M. (1985). Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* 1985 315:6016, 315(6016), 239–242. <https://doi.org/10.1038/315239a0>
- Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T. S., Wright, G., Davis, R. E., Henrickson, S. E., Zhao, H., Ibbotson, R. E., Orchard, J. A., Davis, Z., Stetler-Stevenson, M., Raffeld, M., Arthur, D. C., Marti, G. E., Wilson, W. H., Hamblin, T. J., Oscier, D. G., & Staudt, L. M. (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. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2002-10-3306>
- Willander, K., Dutta, R. K., Ungerback, J., Gunnarsson, R., Juliusson, G., Fredrikson, M., Linderholm, M., & Söderkvist, P. (2013). NOTCH1 mutations influence survival in chronic lymphocytic leukemia patients. *BMC Cancer*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-274>
- Wodarz, D., Garg, N., Komarova, N. L., Benjamini, O., Keating, M. J., Wierda, W. G., Kantarjian, H., James, D., O'Brien, S., & Burger, J. A. (2014). Kinetics of CLL cells in tissues and blood during therapy with the BTK inhibitor ibrutinib. *Blood*, 123(26), 4132–4135. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-02-554220>
- Woyach, J. A., Furman, R. R., Liu, T.-M., Ozer, H. G., Zapatka, M., Ruppert, A. S., Xue, L., Li, D. H.-H., Steggerda, S. M., Versele, M., Dave, S. S., Zhang, J., Yilmaz, A. S., Jaglowski, S. M., Blum, K. A., Lozanski, A., Lozanski, G., James, D. F., Barrientos, J. C., ... Byrd, J. C. (2014). Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *The New England Journal of Medicine*, 370(24), 2286–2294. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1400029>
- Woyach, J. A., Johnson, A. J., & Byrd, J. C. (2012). The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*, 120(6), 1175–1184. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-02-362624>
- Woyach, J. A., Ruppert, A. S., Guinn, D., Lehman, A., Blachly, J. S., Lozanski, A., Heerema, N. A., Zhao, W., Coleman, J., Jones, D., Abruzzo, L., Gordon, A., Mantel, R., Smith, L. L., McWhorter, S., Davis, M., Doong, T. J., Ny, F., Lucas, M., ... Byrd, J. C. (2017). BTKC481S-Mediated Resistance to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35(13), 1437–1443. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.2282>
- Woyach, J. A., Smucker, K., Smith, L. L., Lozanski, A., Zhong, Y., Ruppert, A. S., Lucas, D., Williams, K., Zhao, W., Rassenti, L., Ghia, E., Kipps, T. J., Mantel, R., Jones, J., Flynn, J., Maddocks, K., O'Brien, S., Furman, R. R., James, D. F., ... Byrd, J. C. (2014). Prolonged lymphocytosis during ibrutinib therapy is associated with distinct molecular characteristics and does not indicate a suboptimal response to therapy. *Blood*, 123(12), 1810–1817. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2013-09-527853>

- Yang, J., & Reth, M. (2010). The dissociation activation model of B cell antigen receptor triggering. *FEBS Letters*, *584*(24), 4872–4877. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.09.045>
- Yoo, S. H., Han, J., Tae, J. K., & Doo, H. C. (2005). Expression of CD99 in pleomorphic carcinomas of the lung. *Journal of Korean Medical Science*, *20*(1), 50–55. <https://doi.org/10.3346/JKMS.2005.20.1.50>
- Zenz, T., Eichhorst, B., Busch, R., Denzel, T., Häbe, S., Winkler, D., Bühler, A., Edelmann, J., Bergmann, M., Hopfinger, G., Hensel, M., Hallek, M., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010). TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(29), 4473–4479. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.8762>
- Zenz, T., Kröber, A., Scherer, K., Häbe, S., Bühler, A., Benner, A., Denzel, T., Winkler, D., Edelmann, J., Schwänen, C., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2008). Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*, *112*(8), 3322–3329. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-04-154070>
- Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, *10*(1), 37–50. <https://doi.org/10.1038/NRC2764>
- Zhang, P. J., Barcos, M., Stewart, C. C., Block, A. W., Sait, S., & Brooks, J. J. (2000). Immunoreactivity of MIC2 (CD99) in acute myelogenous leukemia and related diseases. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *13*(4), 452–458. <https://doi.org/10.1038/MODPATHOL.3880077>
- Zhang, S., & Kipps, T. J. (2013). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annual Review of Pathology*, *9*, 103–118. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PATHOL-020712-163955>
- Zhang, S., Wu, C. C. N., Fecteau, J. F., Cui, B., Chen, L., Zhang, L., Wu, R., Rassenti, L., Lao, F., Weigand, S., & Kipps, T. J. (2013). Targeting chronic lymphocytic leukemia cells with a humanized monoclonal antibody specific for CD44. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(15), 6127–6132. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1221841110>
- Zucchetto, A., Bomben, R., Dal Bo, M., Bulian, P., Benedetti, D., Nanni, P., del Poeta, G., Degan, M., & Gattei, V. (2006). CD49d in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlated expression with CD38 and prognostic relevance. *Leukemia*, *20*(3), 523–525. <https://doi.org/10.1038/SJ.LEU.2404087>
- Zucchetto, A., Vaisitti, T., Benedetti, D., Tissino, E., Bertagnolo, V., Rossi, D., Bomben, R., Dal Bo, M., del Principe, M. I., Gorgone, A., Pozzato, G., Gaidano, G., del Poeta, G., Malavasi, F., Deaglio, S., & Gattei, V. (2012). The CD49d/CD29 complex is physically and functionally

associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 26(6), 1301–1312. <https://doi.org/10.1038/LEU.2011.369>



## ABREVIATURAS

**Ac, Acs:** Anticuerpo, anticuerpos

**ADN:** ácido dexosirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**Ag, Ags:** Antígeno, antígenos

**AKT:** alfa serín treonín kinasa

**Apaf-1:** Apoptosis protease-activating factor-1, factor 1 activador de proteasas de apoptosis

**APC:** del inglés, alofocianina

**APRIL:** A proliferation-inducing ligand, ligando que induce proliferación

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** mensajeros del ácido ribonucleico

**ATM:** ataxia telangiectasia mutated, mutado en ataxia telangiectasia

**ATP:** Adenosine triphosphate, adenosina trifosfato

**Bad:** Bcl-2-antagonist of cell death, antagonista de Bcl-2 en la muerte celular

**BAFF:** B-cell activating factor

**BAFFR:** BAFF receptor, receptor del factor activador de los linfocitos B

**Bak:** Bcl-2-antagonist/killer-1, antagonista de Bcl-2/asesino-1

**Bax:** Bcl-2-associated X protein, proteína X asociada a Bcl-2

**BCL2:** B cell lymphoma protein 2, proteína 2 de linfoma de células B

**Bcl-xL:** Bcl-2-related protein long form of Bcl-x, proteína relacionada con Bcl-2 forma larga de Bcl-x

**BCR:** B cell receptor, receptor de célula B

**BH:** Bcl-2 homology domain, dominio de homología a Bcl-2

**Bid:** BH3-interacting domain death agonist, dominio agonista de muerte que interacciona con BH3

**Bim:** Bcl-2-interacting mediator of cell death, mediador de muerte celular que interacciona con Bcl-2

**BIRC3:** Baculoviral IAP (Inhibitor of apoptosis protein) repeat-containing protein 3, proteína 3 conteniendo la repetición de IAP (proteína inhibidora de la apoptosis) baculoviral

**BMSCs:** Bone marrow stromal cells, células estromales de médula ósea

**BSA:** Bovine serum albumin, albúmina de suero bovino

**BTK:** Bruton's tyrosine kinase

**β2M:** β2-microglobulina

**Ca<sup>2+</sup>:** calcio

**CCL:** C-C motif ligand

**CD38:** Cluster of differentiation 38, cluster de diferenciación 38

**CD40L:** CD40 ligand

**CoA:** Coenzima A

**CTLA-4:** cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

**CXCL:** C-X-C motif ligand

**CXCR:** C-X-C motif receptor

**dGMP, dGTP:** deoxyguanosine triphosphate, desoxiguanosina trifosfato, deoxyguanosine monophosphate, desoxiguanosina monofosfato

**DMSO:** Dimethyl sulfoxide, dimetilsulfóxido

**DNA:** Desoxyribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico

**dNTPs:** deoxinucleótidos

**dsDNA:** double-stranded DNA

**ERK:** extracellular signal-regulated kinase, quinasa regulada por señales extracelulares

**FBS:** Fetal bovine serum, suero bovino fetal

**FDCs:** Follicular dendritic cells, células Dendriticas Foliculares

**FITC:** Fluorescein isothiocyanate, isotiocianato de fluoresceína

**FN:** fibronectin

**GC:** Germinal center, centro germinal

**GPCR:** receptores de proteína G

**Hb:** Hemoglobina en SP

**HCDR3** third complementarity-determining region of the heavy chain

**HEV:** vénulas endoteliales altas

**HLA-G:** human leukocyte antigen G

**HS1:** hematopoietic cell-specific LYN substrate-1

**HSCs:** Hematopoietic stem cells, células madre hematopoyéticas

**SHM:** Somatic hypermutation, hipermutación somática

**HUVEC:** Human Vascular Endothelial Cells, Células endoteliales vasculares

**ICAM-1:** Intercellular adhesion molecule 1, molécula 1 de adhesión intercelular

**IFN $\gamma$ :** Interferon gamma, interferon gamma

**Ig:** Inmunoglobulina

**IGHV:** immunoglobulin heavy chain variable región

**IgVH, M, UM:** Immunoglobulin heavy-chain variable region, región variable de las cadenas pesadas de las Inmunoglobulinas, Mutated, mutado, unmutated, no mutado

**IL:** Interleukin, interleuquina

**IMF:** Intensidad media de fluorescencia

**IP3:** inositol trifosfato

**ITAM:** immunoreceptor tyrosine-based activation motif

**JNK:** Jun N-terminal kinase, quinasa de Jun en N-terminal

**K $^{+}$ :** potasio

**Ig, Igs:** Inmunoglobulina, inmunoglobulinas

**LLC:** Leucemia linfocítica crónica

**LPS:** lipopolysaccharide

**LT $\alpha\beta$ :** lymphotoxin alpha beta

**LT $\beta$ R:** lymphotoxin beta receptor

**Lyn:** Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase/Tyrosine-protein kinase Lyn, nueva proteína tirosinaquinasa relacionada con Lck/Yes/tirosina quinasa Lyn

**mAbs:** Anticuerpos monoclonales

**MAPKs:** Mitogen-activated protein kinases, quinasas activadas por mitógenos

**MCL:** Mantle Cell Lymphoma, linfoma de células del manto

**Mcl-1:** Myeloid cell leukemia sequence 1, secuencia 1 de leucemia de células mieloides

**M-CLL** mutated IGHV-gene carrying CLL

**MDR:** Minimal residual disease, enfermedad mínima residual

**MEK:** Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1, quinasa 1 de especificidad dual de MAPK

**MHC:** Major histocompatibility complex, complejo mayor de histocompatibilidad

**MMP:** Matrix metalloproteinase, metaloproteínasa de matriz

**MMP-9:** Matrix Metalloproteinase-9, metaloproteínasa de matriz-9

**MO:** médula ósea

**MSCs:** Mesenchymal stromal cells, células estromales de origen mesenquimal

**MYD88:** myeloid differentiation primary response

**NAD:** nicotinamide adenine dinucleotide

**NF- $\kappa$ B:** nuclear factor kappa B factor nuclear estimulador de la cadena kappa de células B

**NGS:** Next-generation sequencing, Secuenciación de nueva generación

**NK:** natural killer

**NLC:** nurselike cells, células tipo nodriza

**NOTCFII:** Neurogenic locus notch homolog protein 1, proteína 1 homóloga del locus

neurogénico notch (de *Drosophila melanogaster*)

**Noxa:** Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, proteína 1 inducida por

**OS:** Overall survival, supervivencia global

**P53:** proteína supresora tumoral 53

**Pb:** pares de base

**PBMCs:** células mononucleares de sangre periférica

**PBS:** Phosphate-buffered saline, tampón fosfato salino

**PCR:** Polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa

**PD-1:** programmed cell death protein 1

**PDGF:** platelet-derived growth factor

**PD-L1:** PD-1 ligand

**PE Cy7:** ficoeritrina cianina 5

**PE:** ficoeritrina

**PI3K:** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase, quinasa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

**PIM:** proviral integration site for moloney murine leukemia virus

**PKC:** protein kinase C

**PLC- $\gamma$ 2:** phospholipase C gamma 2

**PTEN:** Phosphatase and tensin homolog, fosfatasa y homólogo de tensina

**Puma:** TP53 upregulated modulator of apoptosis/Bcl-2 binding component 3, modulador de la apoptosis inducido por TP53/componente 3 de unión a Bcl-2

**RPM:** revoluciones por minuto

**RPMI:** del inglés, medio Roswell Park Memorial Institute

**Scr:** Familia de proteínas (v-src, c-src, e-erb), derivadas del protooncogén src, que activan a tirosina quinasas de membrana o citoplasmáticas

**SD:** desviación estándar

**SDF-1:** stromal cell derived factor 1

**SF3B1:** splicing factor 3B subunit 1, subunidad 1 del factor de splicing 3b

**SFB:** suero fetal bovino

**SH2:** Src homology 2

**SHIP1/2:** SH2 domain containing inositol 5-phosphatases 1/2

**SHP1:** SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase-1

**slg:** surface immunoglobulin

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism, polimorfismo de nucleótido único

**SP:** sangre periférica

**ssDNA:** single-stranded DNA

**STAT-3:** signal transducer and activator of transcription 3 transductor de la señal y activador de la transcripción 3

**SYK:** spleen tyrosine kinase

**TAM:** tumor associated macrophage

**TBS:** Tris-buffered saline, tampon tris salino

**TBS-T:** TBS-0.1% Tween®20

**TCR:** T-cell receptor, receptor de linfocitos T

**TLR:** toll like receptor

**TK:** timidín quinasa

**TNF:** Tumor necrosis factor, factor de necrosis tumoral

**TNF- $\alpha$ :** Tumor necrosis factor alpha, factor de necrosis tumoral alfa

**TNFR:** Tumor necrosis factor receptor, receptor del factor de necrosis tumoral

**TP53:** Cellular tumor antigen p53, antígeno tumoral celular p53

**V(D)J:** recombinación de los segmentos V(variable), D (diversidad), J (del inglés, joining)

**VCAM-1:** vascular cell-adhesion molecule-1, molécula 1 de adhesión de células vasculares

**VEGF:** vascular endothelial growth factor, factor de crecimiento del endotelio vascular

**VEGFR2:** Vascular endothelial growth factor receptor 2, receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio Vascular

**VLA-4:** very late antigen-4

**ZAP-70:** 70 kDa associated protein, proteína asociada de 70 kDa  $\zeta$

