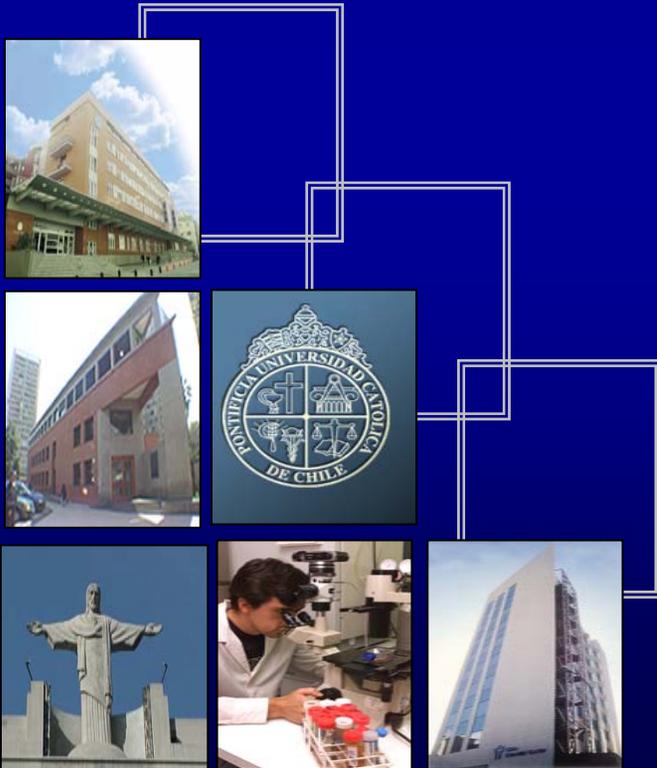


La Interacción con el Estroma de la Médula Ósea Protege a Células de Leucemia De Sufrir Apoptosis Inducida por Agentes Citotóxicos

F. Barriga, E. Riquelme, P. Besa, A. Kalergis y B. Nervi



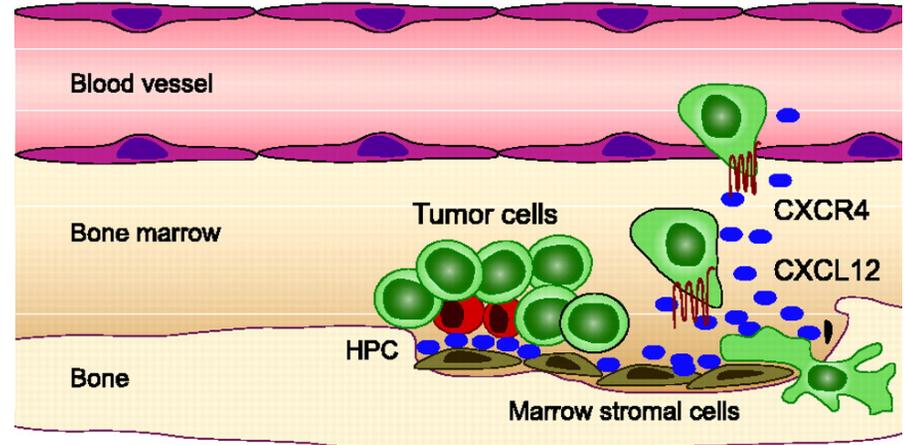
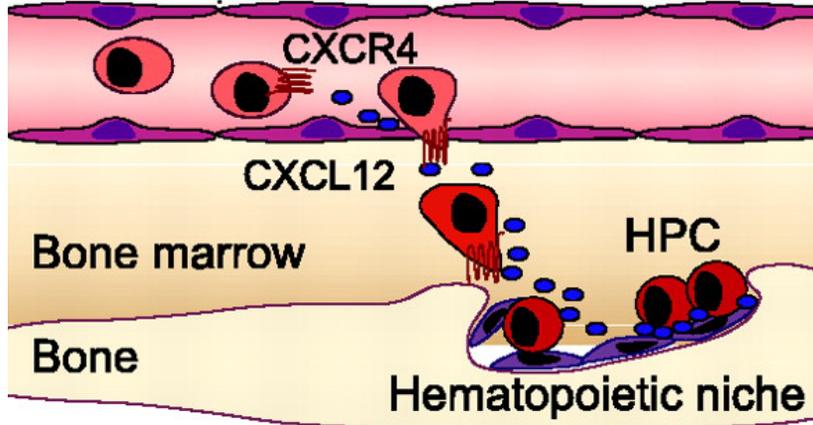
Genética Molecular y Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas

Hemato-Oncología, Radioterapia
Facultad de Medicina

Pontificia Universidad Católica de Chile

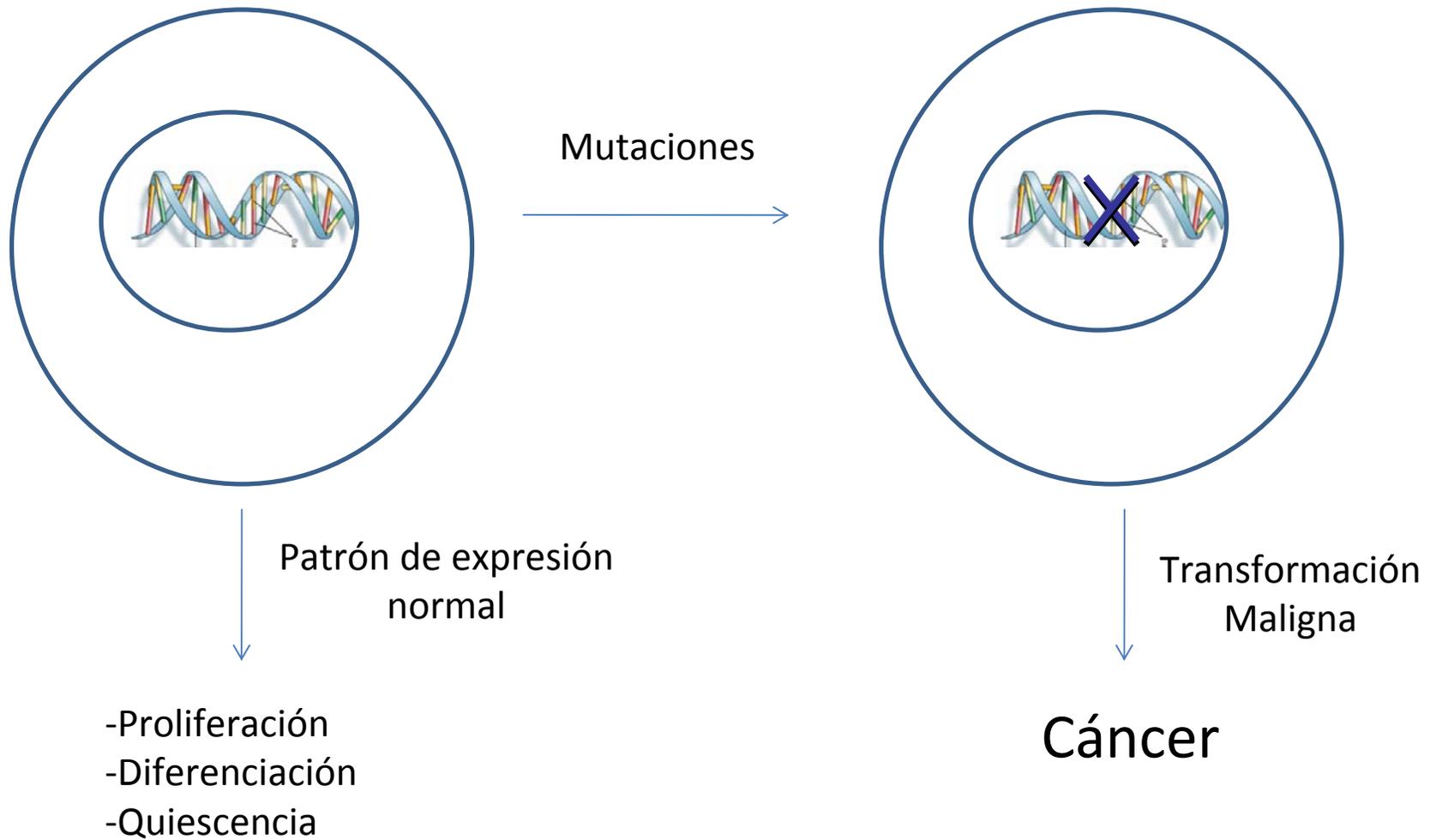
Millennium Nucleus on Immunology and Immunotherapy

Interacción entre leucemia y estroma de MO

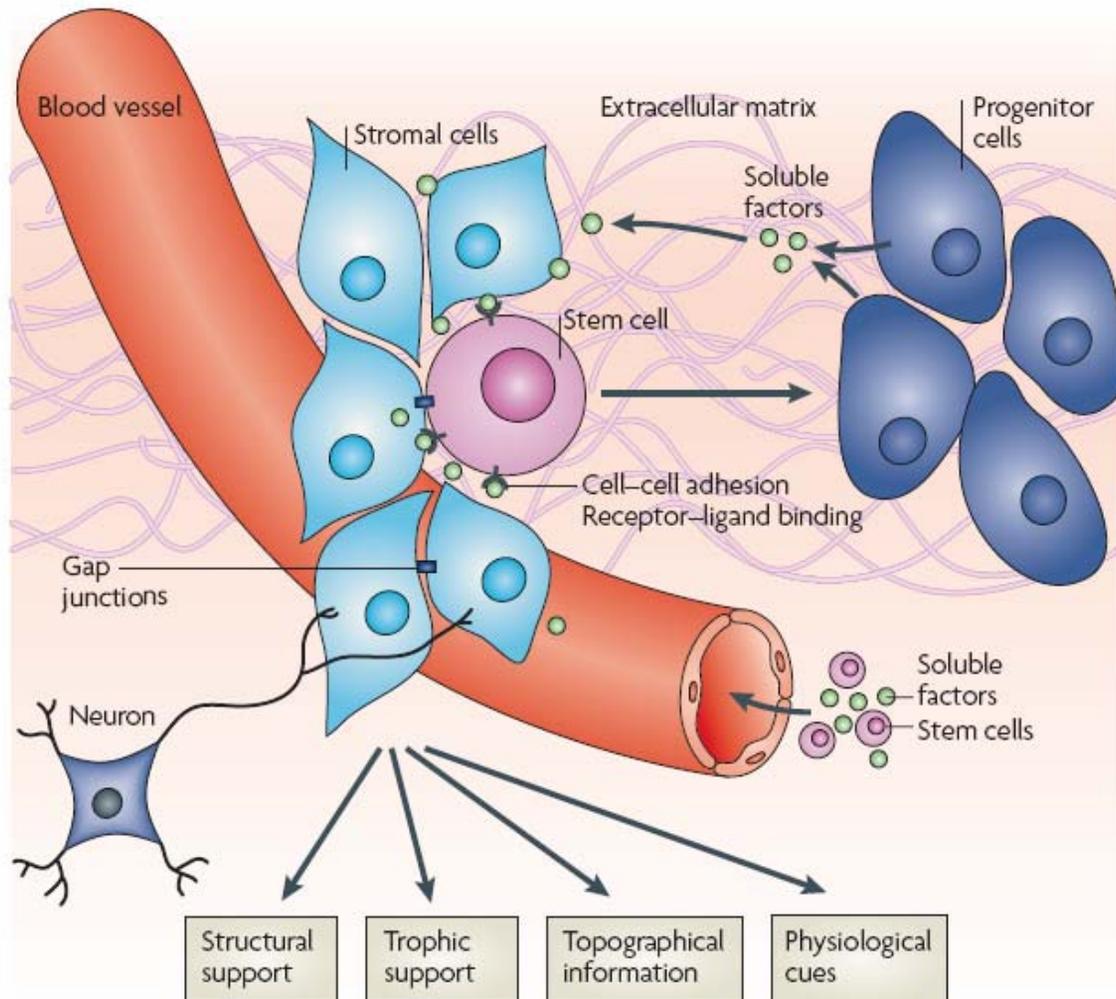


1. Es difícil curar AML..... a pesar de lograr remisión, recaen
2. Usamos drogas ciclo celular dependientes..... si hay blastos en G0, sobreviven
3. En el concepto moderno de cáncer, existen las células troncales de cáncer (stem cells)..... en G0

Factores Intrínsecos en desarrollo y progresión del cáncer

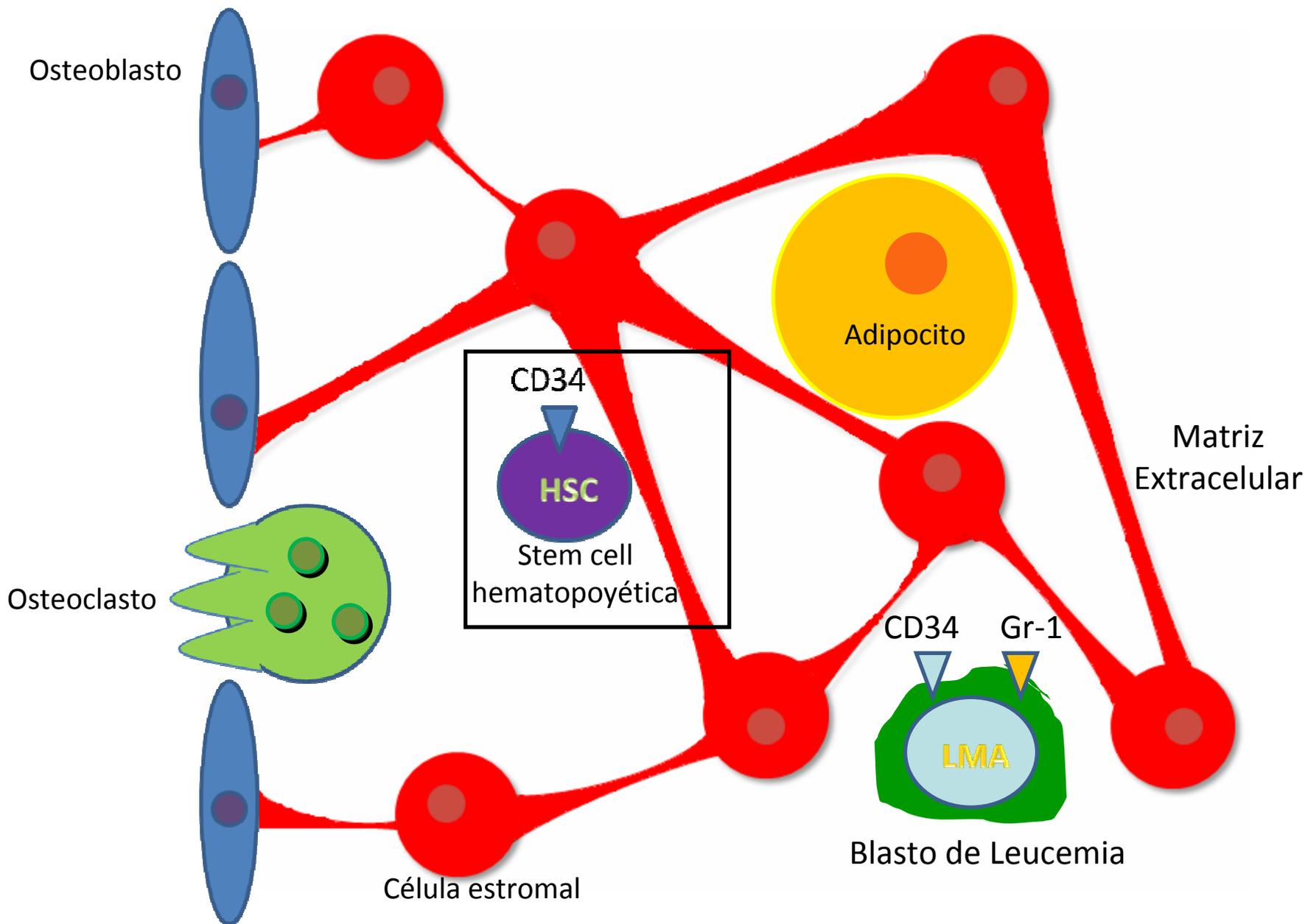


Efecto de factores extrínsecos en la función de una célula

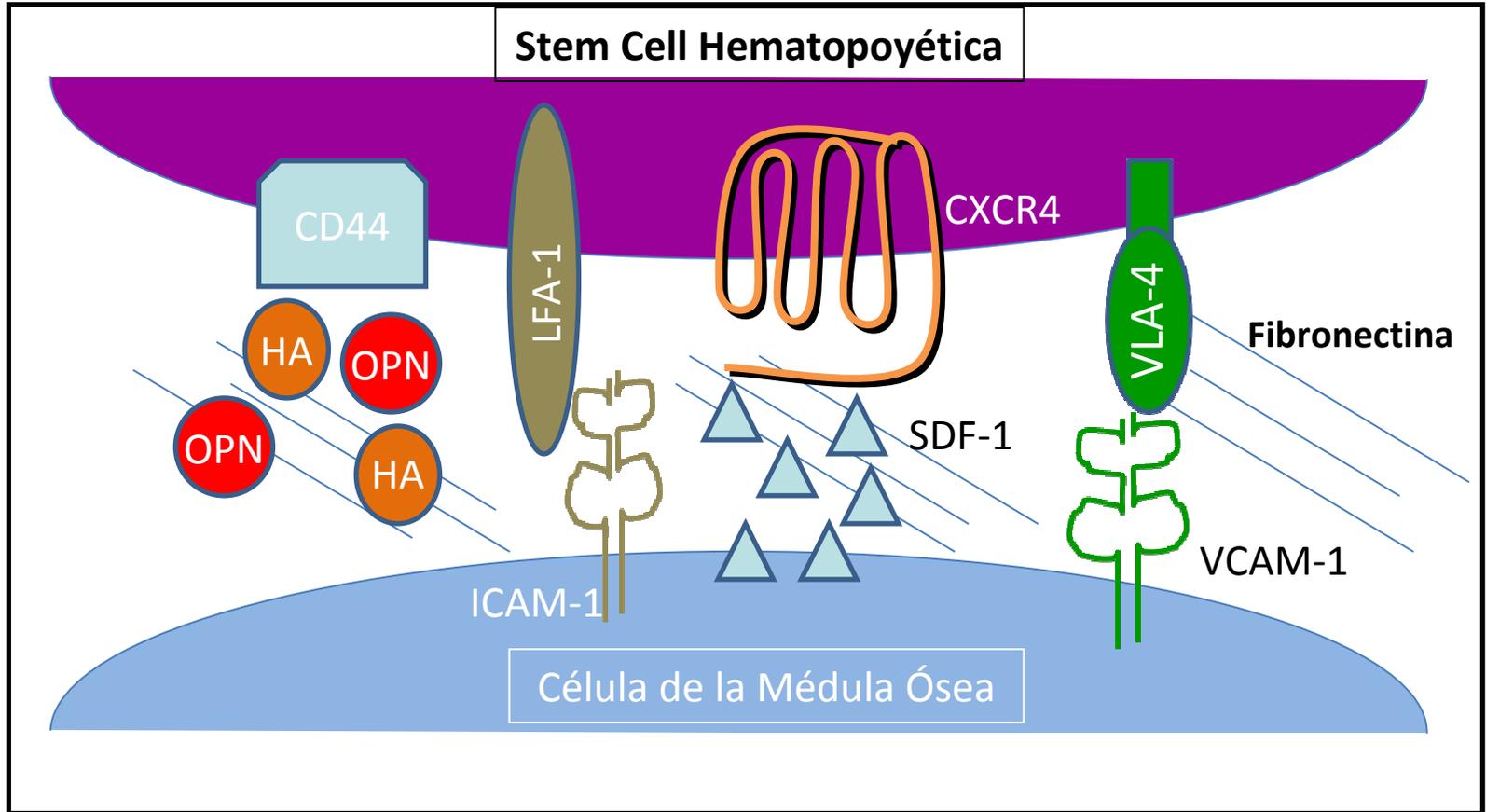


(Jones, Wagers, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008)

El nicho de la Médula Ósea

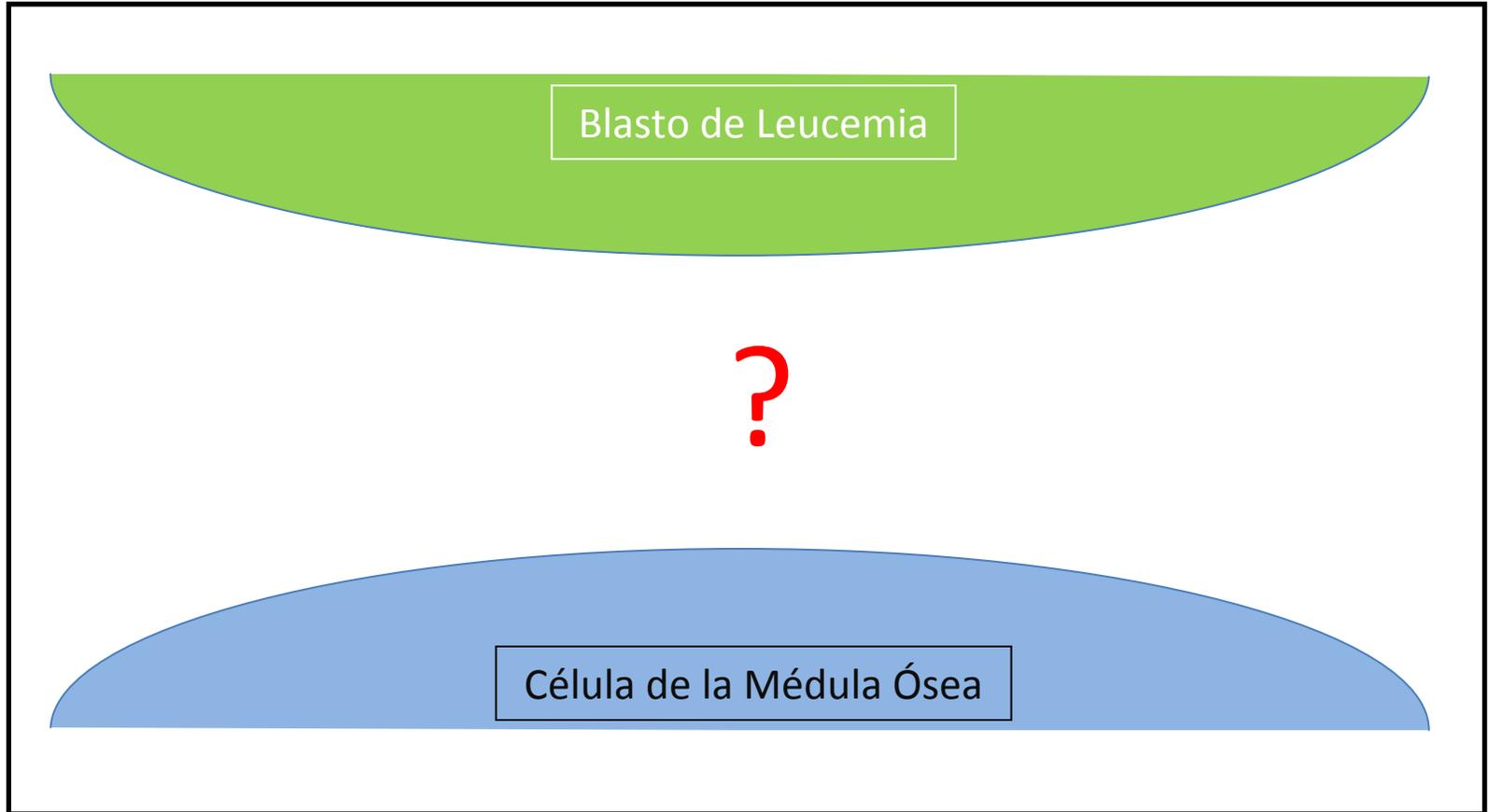


Interacción entre una Stem Cell Hematopoyética y el nicho de la médula ósea



La interacción de las HSC con el nicho de la médula ósea regula la migración, adhesión, quiescencia, proliferación y diferenciación de éstas células

Interacción entre un blasto de leucemia y el nicho de la médula ósea



Las células de leucemia comparten el mismo nicho que las células hematopoyéticas, sin embargo el efecto que este microambiente ejerce sobre las células tumorales no ha sido descrito.

La persistencia de células de leucemia en la médula ósea, después de los tratamientos convencionales, sugiere que este ambiente ejerce un efecto protector sobre las células tumorales.

Hipótesis:

El microambiente de la médula ósea protege a las células de leucemia mieloide aguda de la apoptosis inducida por terapia.

Objetivo General:

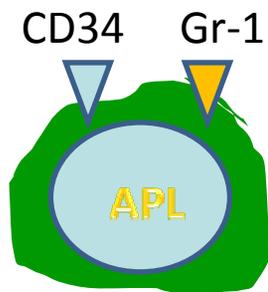
Estudiar si la interacción entre leucemia y estroma de la MO protege a los blastos de quimio y radioterapia.

Objetivos Específicos:

- 1.- Establecer un modelo *in vitro* para evaluar la interacción entre células de LMA y el estroma de la médula ósea.
- 2.-Analizar *in vitro* si existe adherencia entre células de LMA y células de estroma de médula ósea.
- 3.-Estudiar si la presencia de células de estroma de la médula ósea protegen a los blastos de leucemia de la apoptosis inducida por terapia.
- 4.-Evaluar si el estado proliferativo de las células de LMA es alterado por células de estroma de médula ósea.
- 5.-Establecer un modelo *in vivo* de LMA.
- 6.-Analizar *in vivo* si el microambiente de la médula ósea confiere protección a células de LMA tratadas con radioterapia .

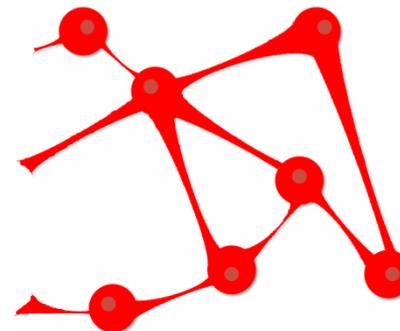
Resultados

- Establecer un modelo *in vitro* para evaluar la interacción entre células de LMA y el estroma de la médula ósea.



APL

Línea Celular de Leucemia
Mieloide Aguda

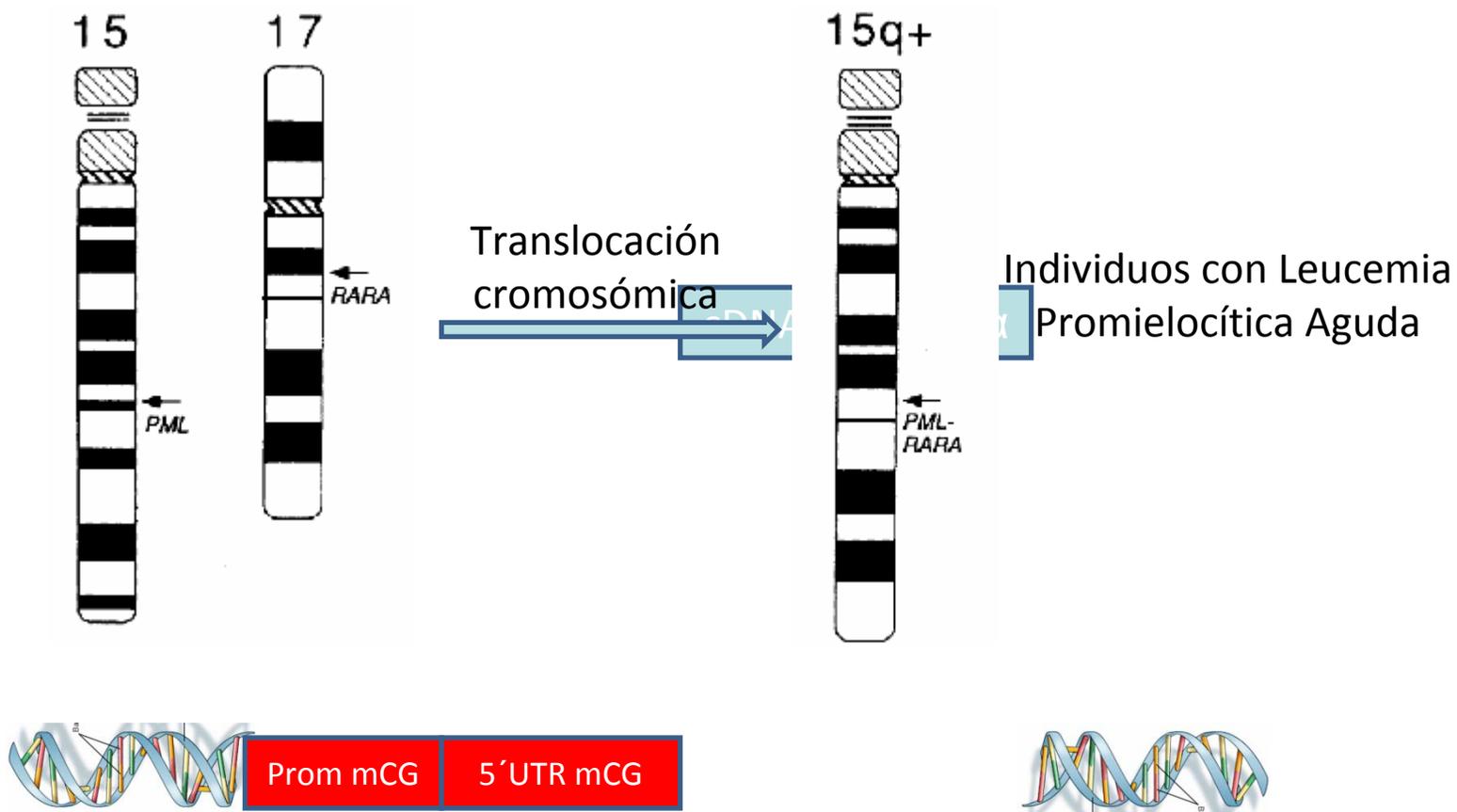


BMSC

Línea Celular de Estroma
de médula ósea

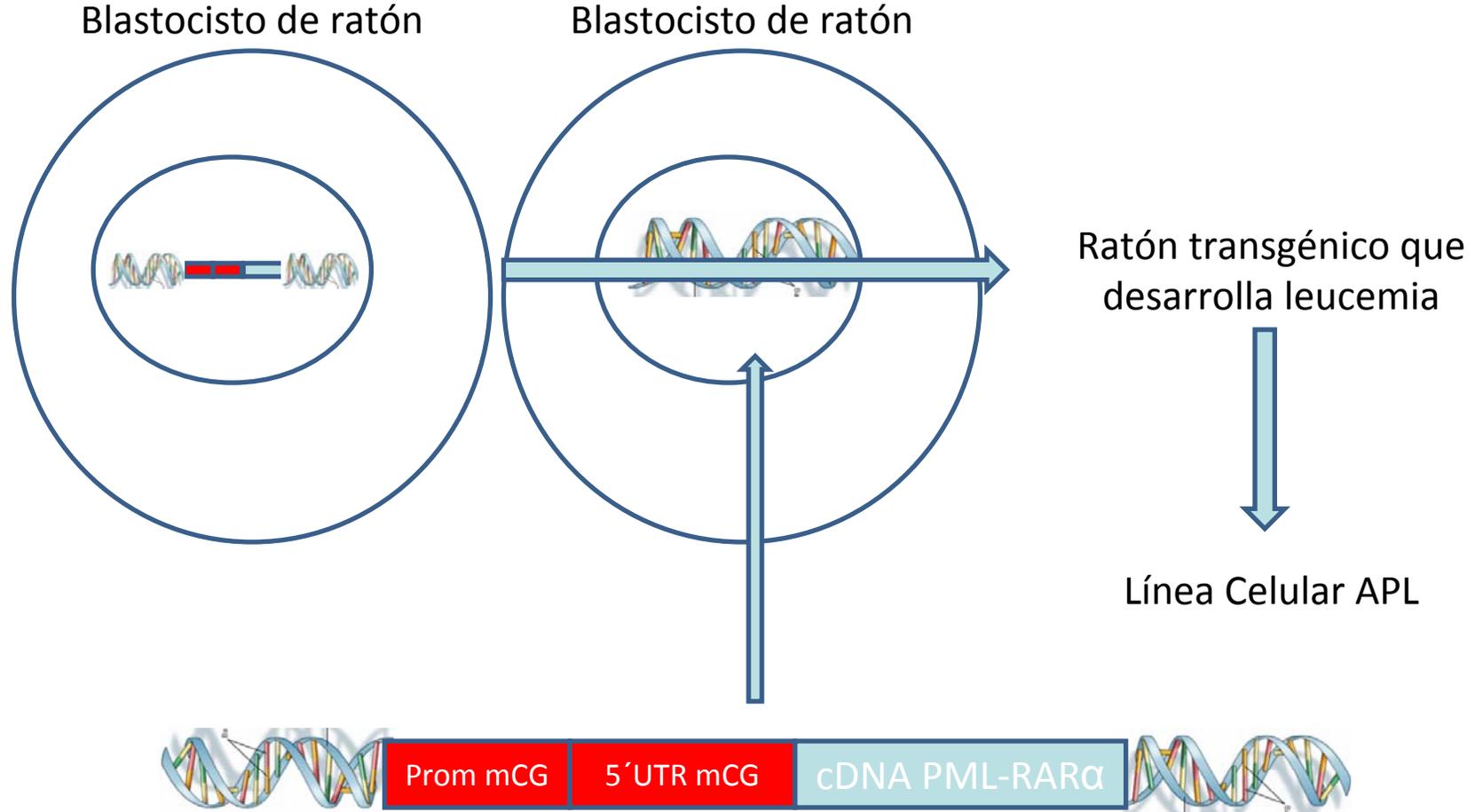
Análisis por citometría de flujo:
Gr-1

Origen de la línea celular de leucemia mieloide aguda

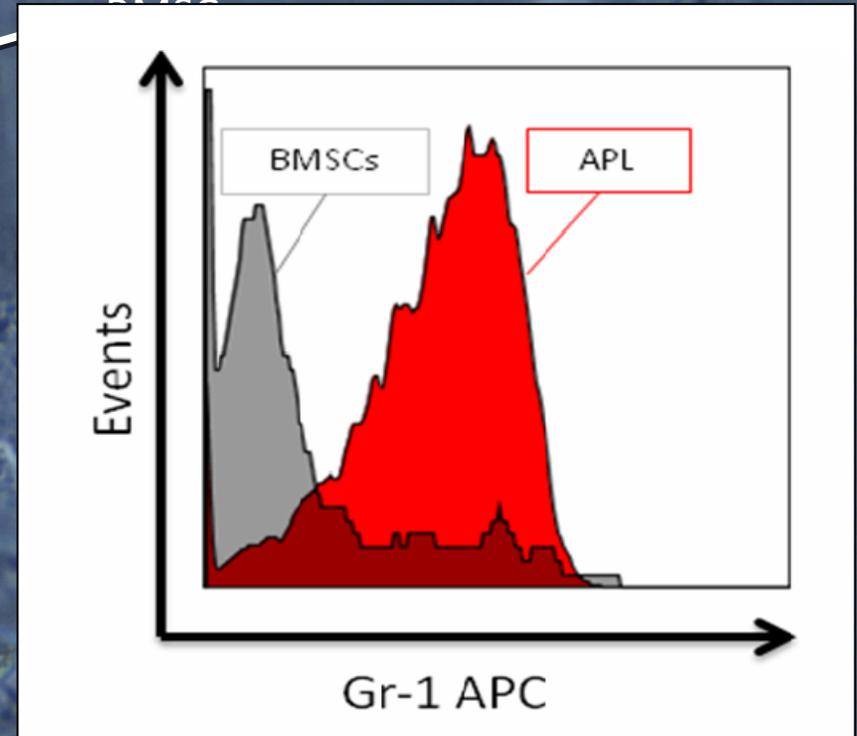
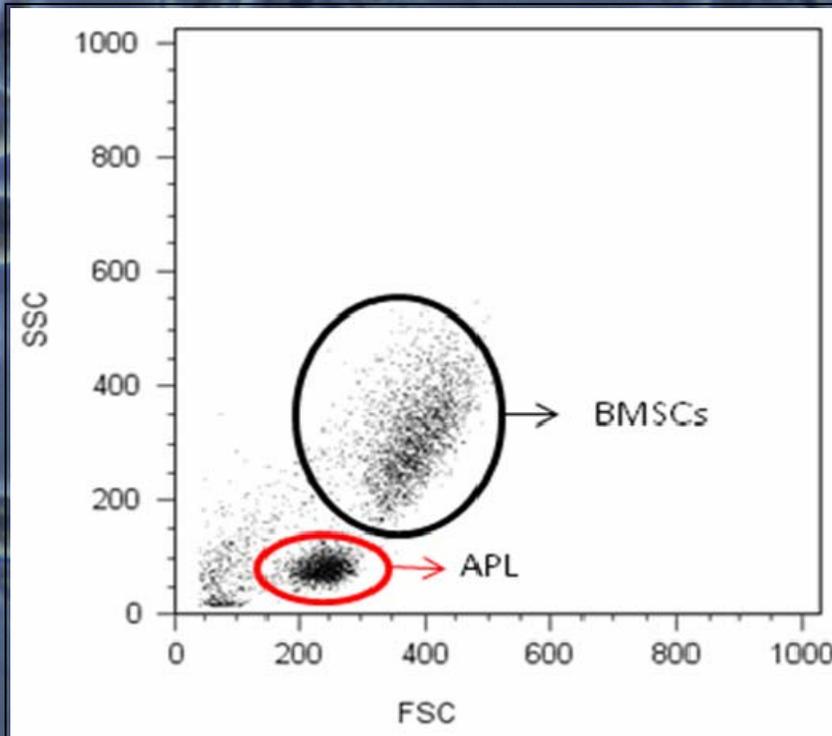


(Westervelt et al, Blood, 2003)

Origen de la línea celular de leucemia mieloide aguda



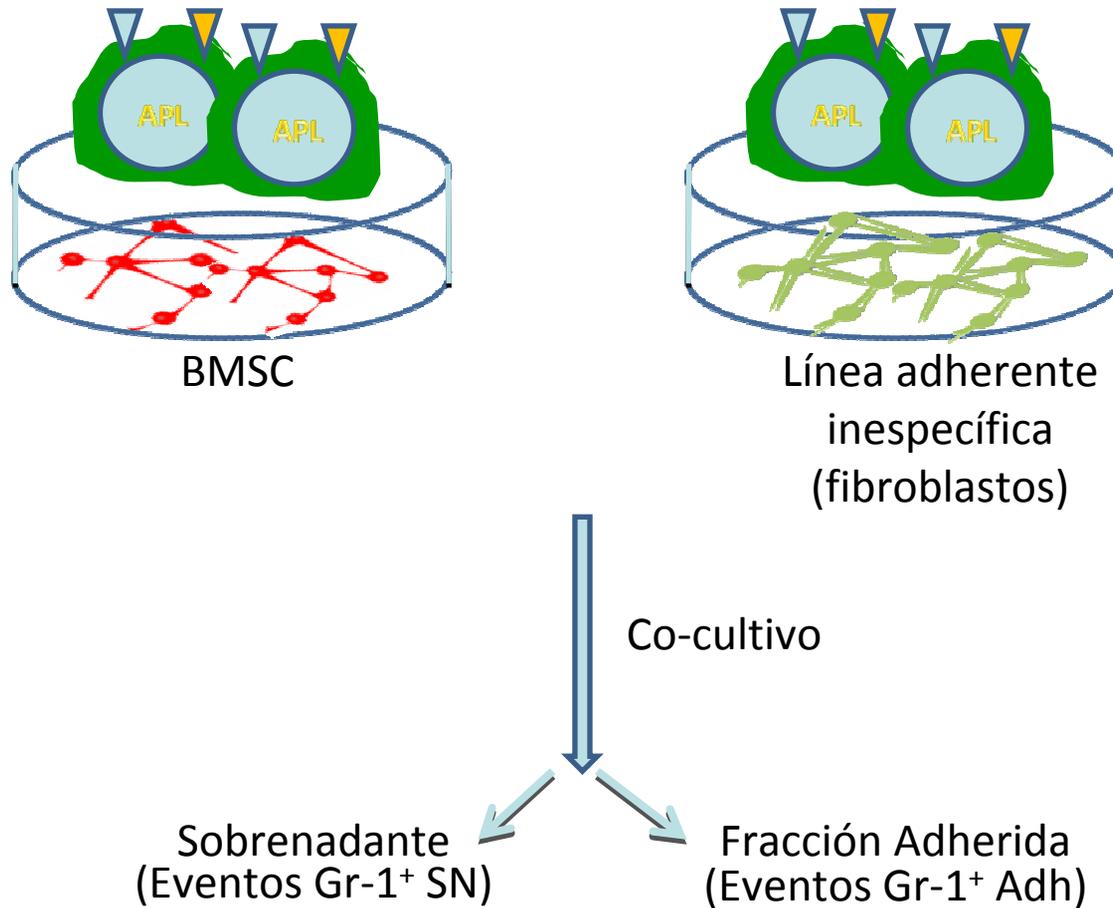
La población de células de leucemia puede ser seguida mediante citometría de flujo



Objetivos Específicos:

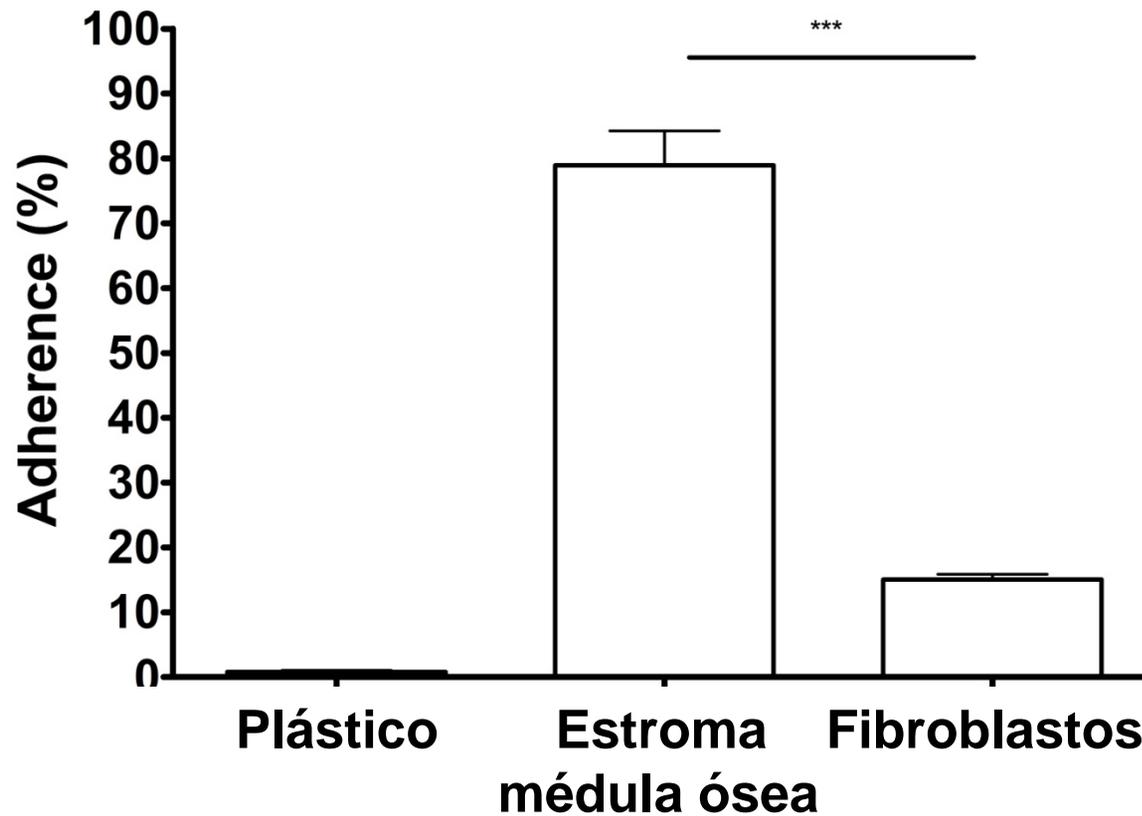
- 1.- Establecer un modelo *in vitro* para evaluar la interacción entre células de LMA y el estroma de la médula ósea.
- 2.-Analizar *in vitro* si existe adherencia entre células de LMA y células de estroma de médula ósea.
- 3.-Estudiar si la presencia de células de estroma de la médula ósea protegen a los blastos de leucemia de la apoptosis inducida por terapia.
- 4.-Evaluar si el estado proliferativo de las células de LMA es alterado por células de estroma de médula ósea.
- 5.-Establecer un modelo *in vivo* de LMA.
- 6.-Analizar *in vivo* si el microambiente de la médula ósea confiere protección a células de LMA tratadas con radioterapia .

-Analizar *in vitro* si existe adherencia entre células de LMA y células de estroma de médula ósea.

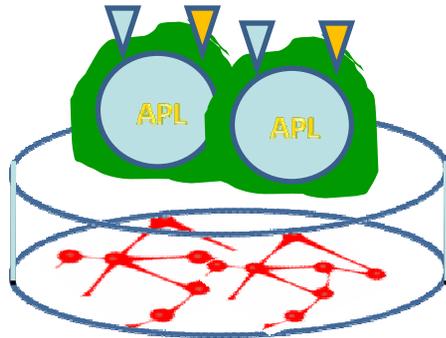


Las células APL se adhieren de manera específica a las células de estroma de médula ósea

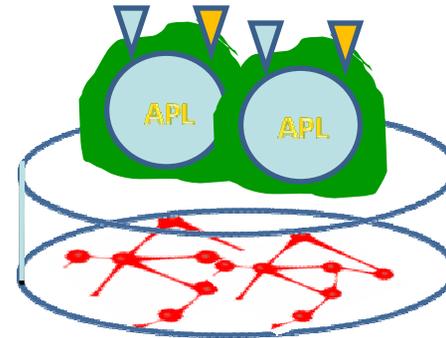
APL Adherence



Evaluación de la presencia de gap junctions entre el estroma de la médula ósea y blastos de leucemia mieloide aguda.



Estroma marcado
Calceina-AM



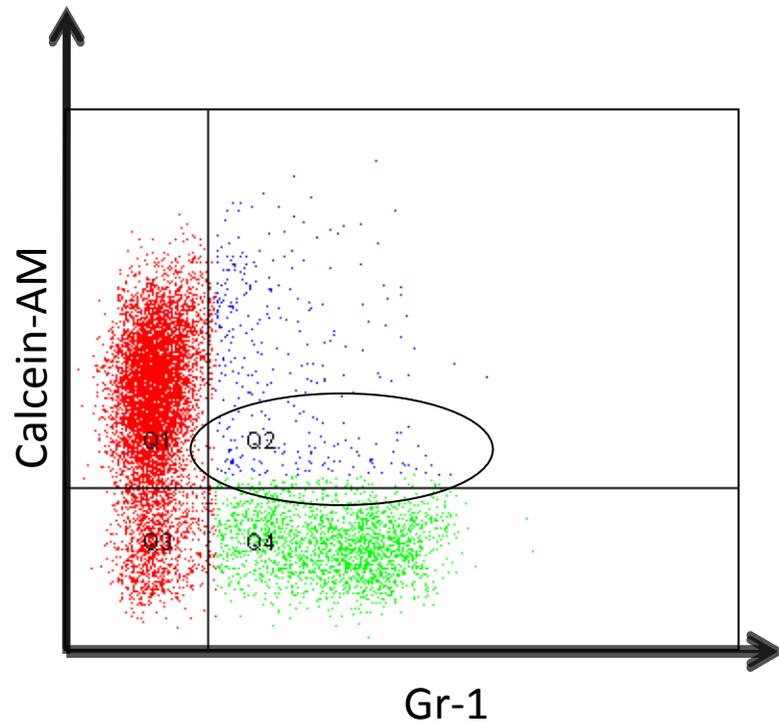
Estroma marcado
Calceina-AM
+
Inhibidor Gap Junctions
Oleamida 50 μ M

Co-cultivo
↓

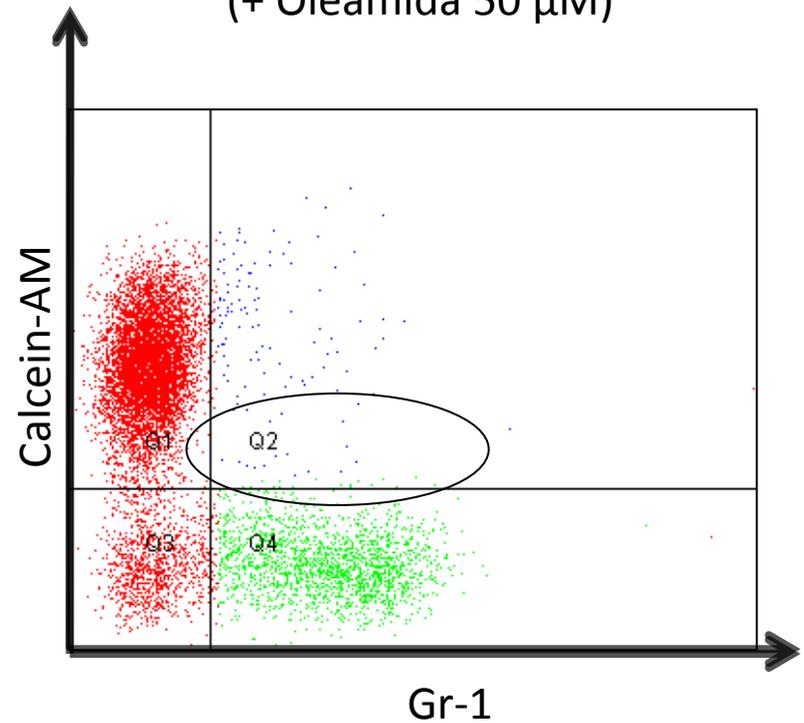
Eventos Gr-1⁺/Calcein-AM⁺

El tratamiento con Oleamida disminuye los eventos Gr-1⁺ / Calceina-AM⁺ evaluados por citometría de flujo.

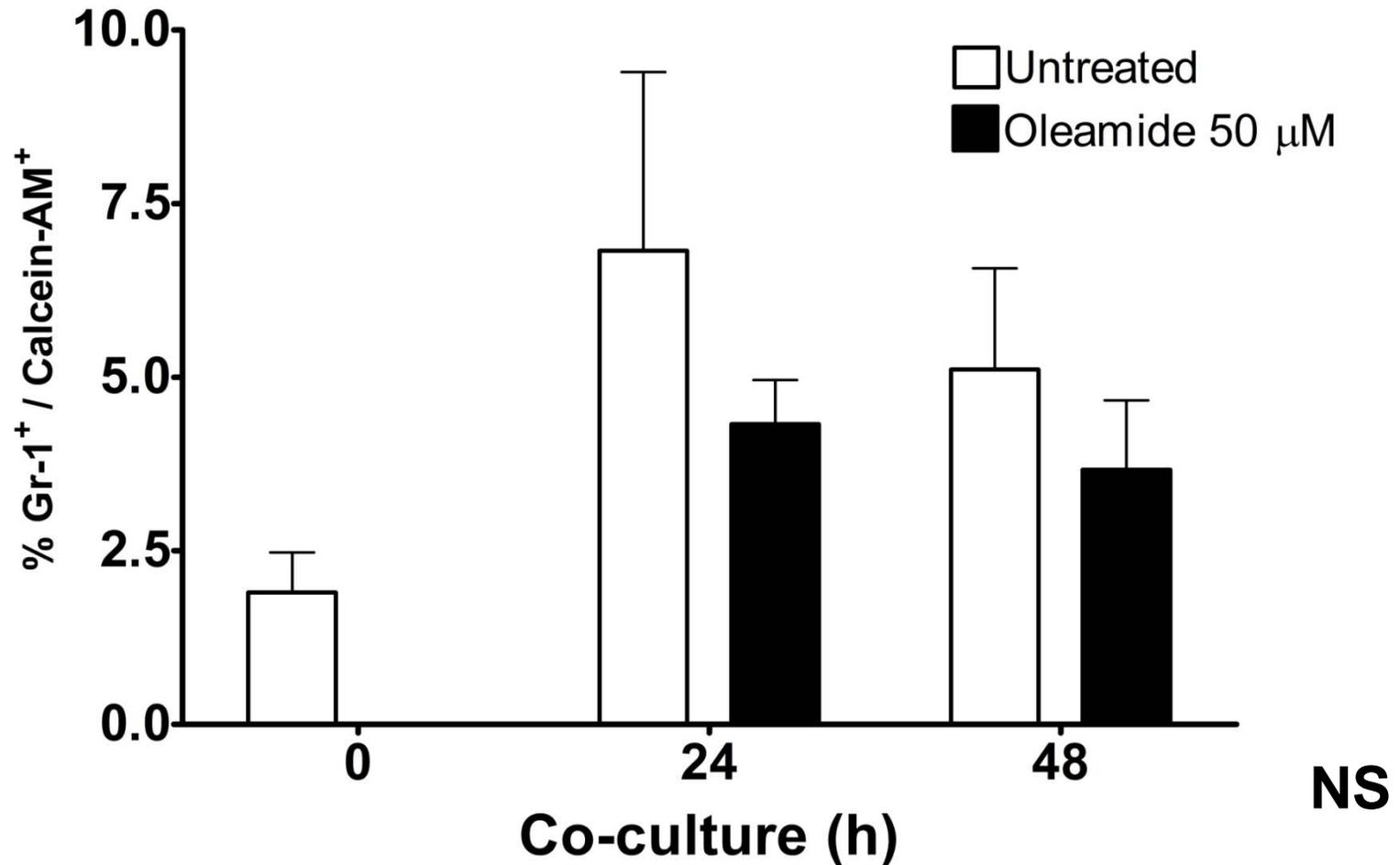
APL + BMSC,
24 horas co-cultivo



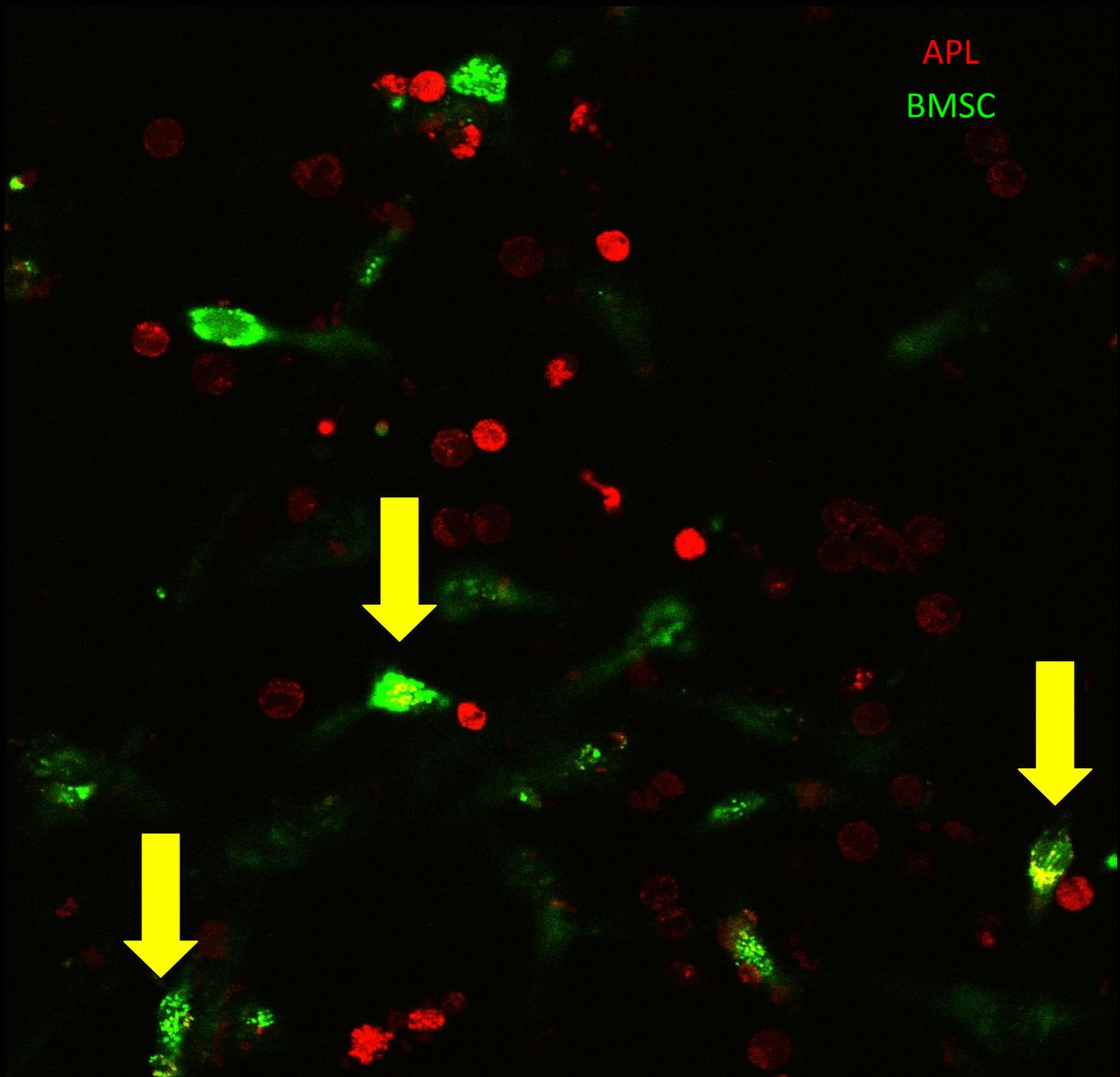
APL + BMSC,
24 horas co-cultivo
(+ Oleamida 50 μ M)



El tratamiento con Oleamida disminuye los eventos Gr-1⁺ / Calceina-AM⁺ evaluados por citometría de flujo.



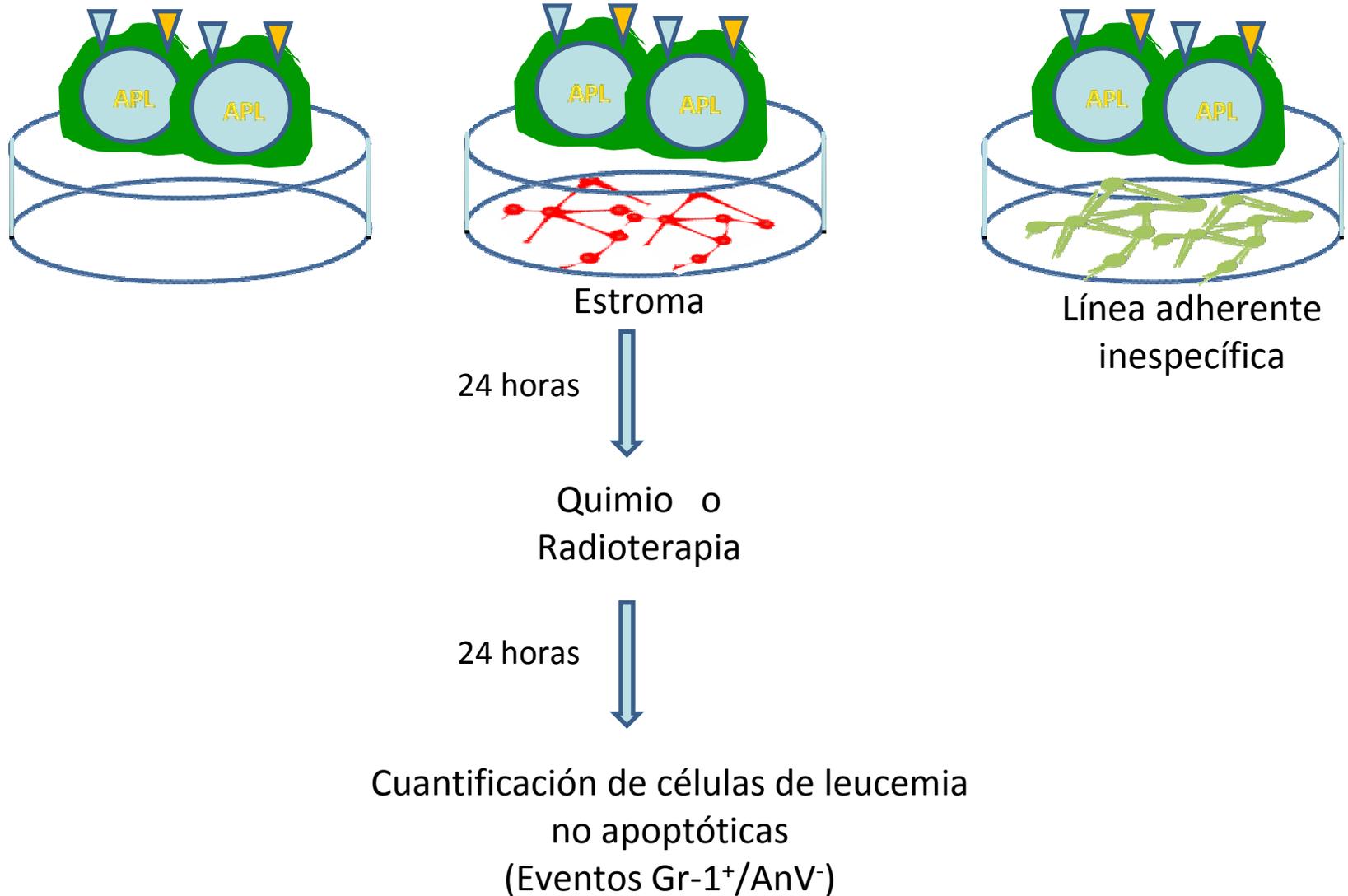
APL
BMSC



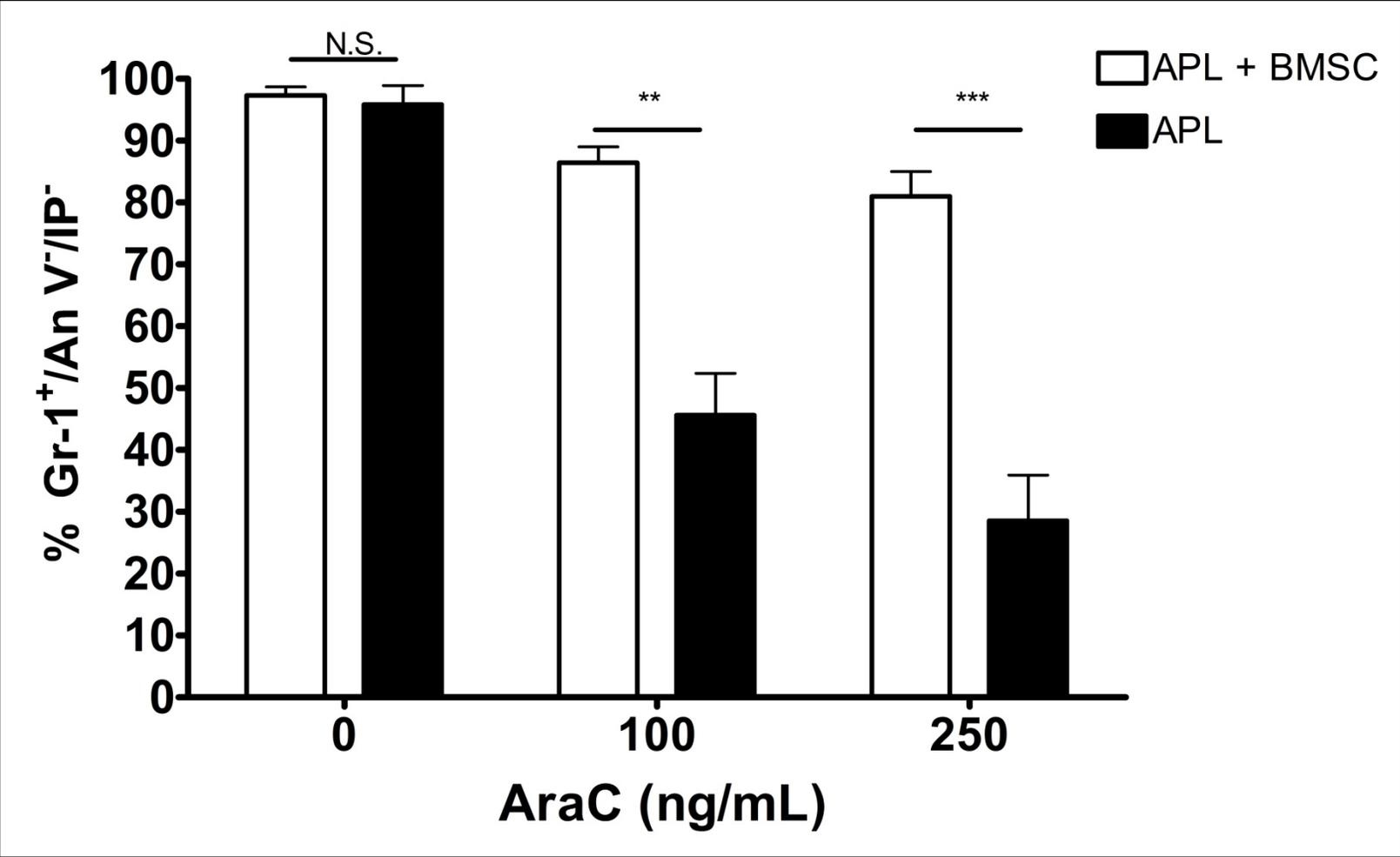
Objetivos Específicos:

- 1.- Establecer un modelo *in vitro* para evaluar la interacción entre células de LMA y el estroma de la médula ósea.
- 2.-Analizar *in vitro* si existe adherencia entre células de LMA y células de estroma de médula ósea.
- 3.-Estudiar si la presencia de células de estroma de la médula ósea protegen a los blastos de leucemia de la apoptosis inducida por terapia.
- 4.-Evaluar si el estado proliferativo de las células de LMA es alterado por células de estroma de médula ósea.
- 5.-Establecer un modelo *in vivo* de LMA.
- 6.-Analizar *in vivo* si el microambiente de la médula ósea confiere protección a células de LMA tratadas con radioterapia .

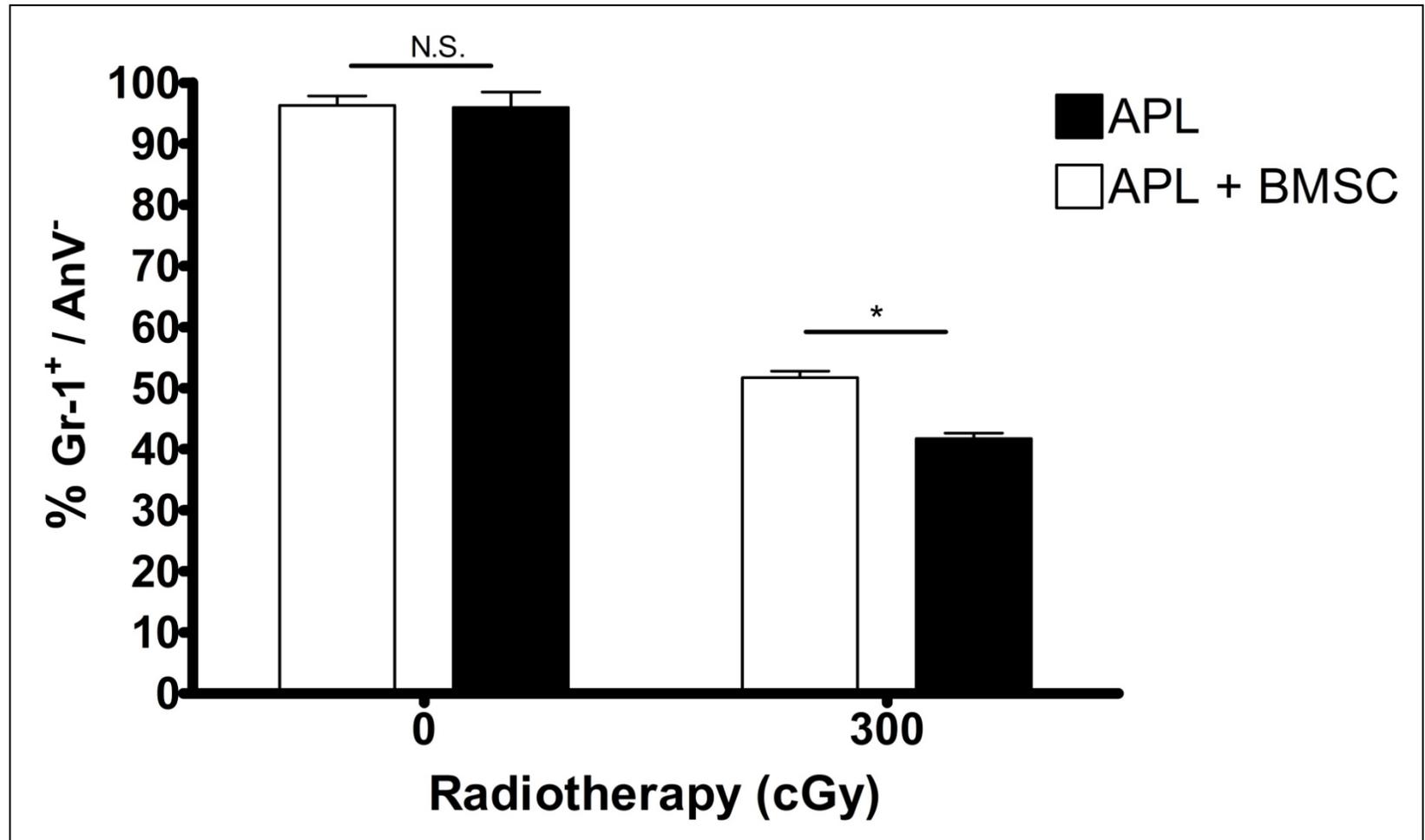
-Estudiar si la presencia de células de estroma de la MO protegen a los blastos de leucemia de la apoptosis inducida por terapia.



Las células de estroma de MO protegen a las células de leucemia de la muerte celular inducida por quimioterapia

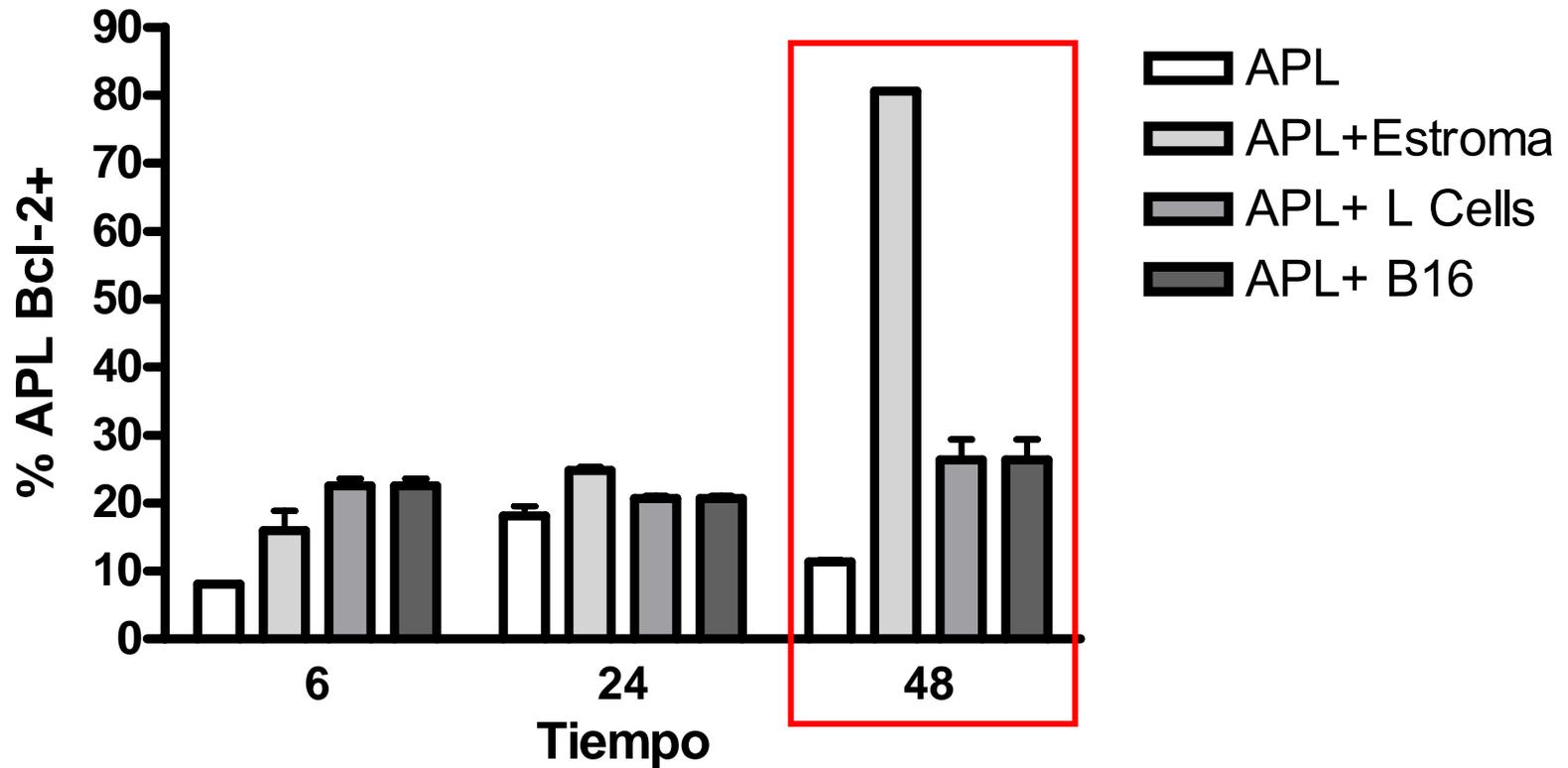


Las células de estroma de MO protegen a la leucemia de la muerte celular inducida por radioterapia



El estroma de MO induce expresión de bcl-2 en APL

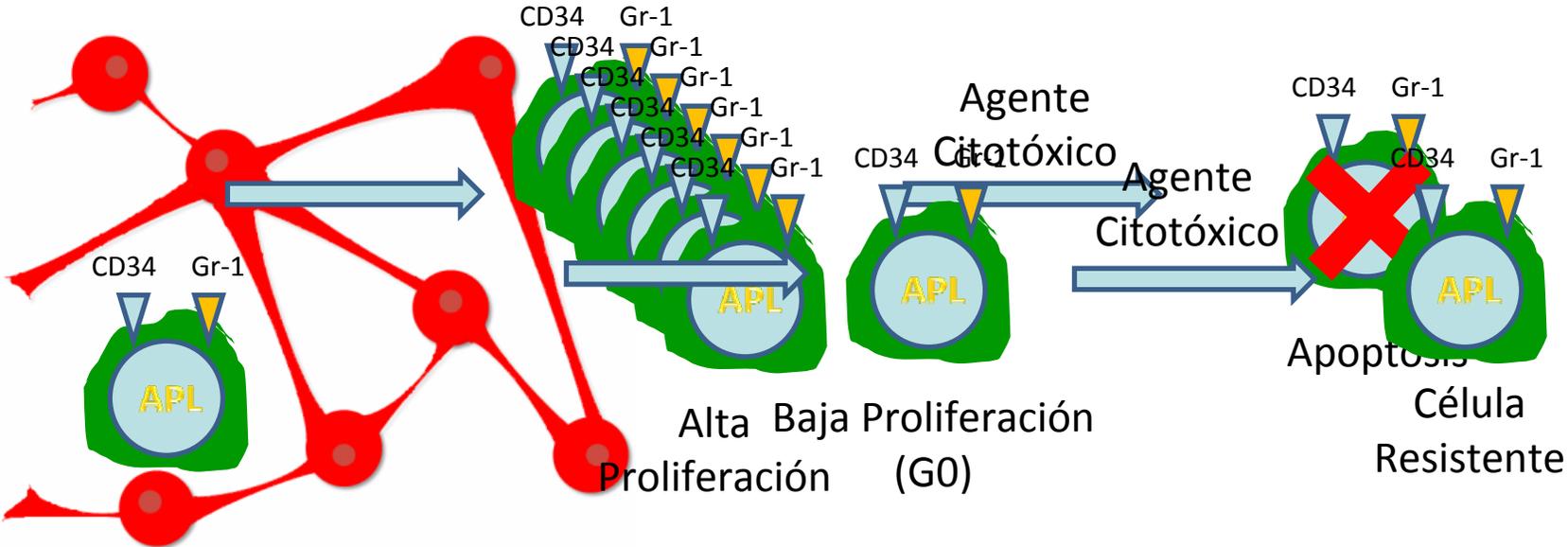
BCL-2



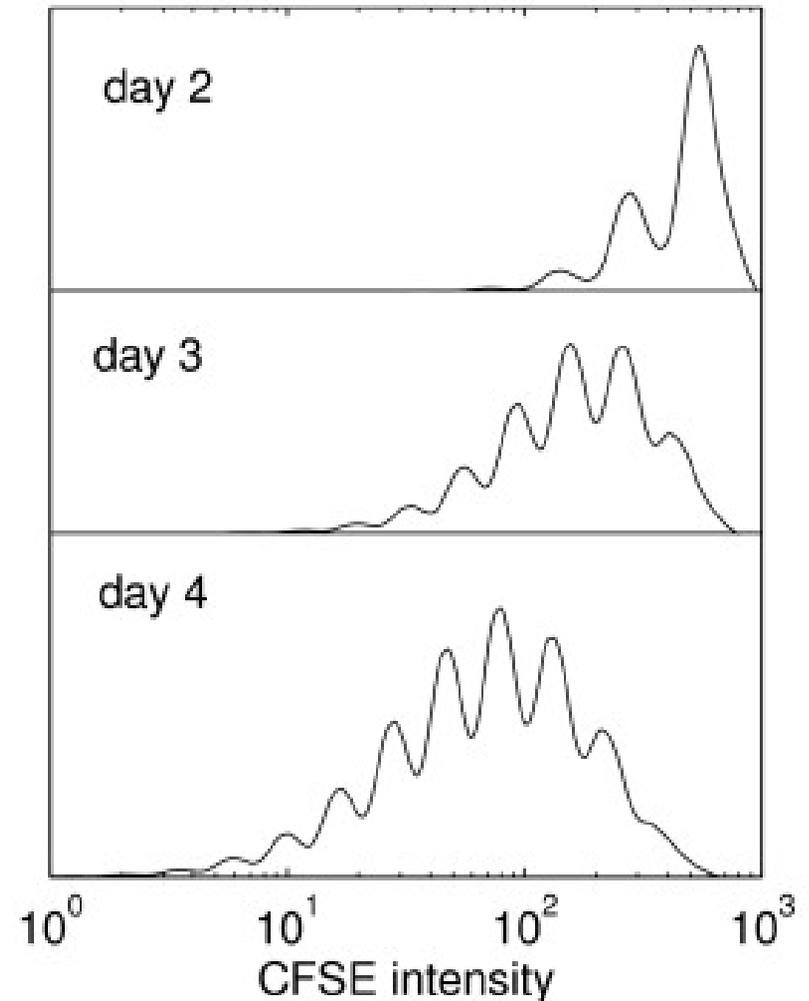
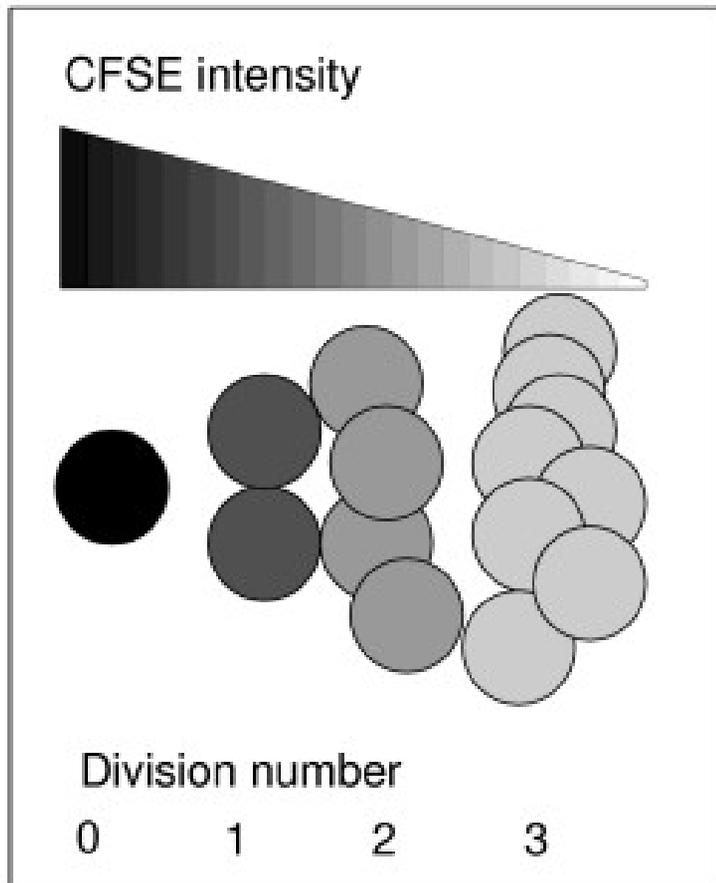
Objetivos Específicos:

- Establecer un modelo *in vitro* para evaluar la interacción entre células de LMA y el estroma de la médula ósea.
- Analizar *in vitro* si existe adherencia entre células de LMA y células de estroma de médula ósea.
- Estudiar si la presencia de células de estroma de la médula ósea protegen a los blastos de leucemia de la apoptosis inducida por terapia.
- Evaluar si el estado proliferativo de las células de LMA es alterado por células de estroma de médula ósea.
- Establecer un modelo *in vivo* de LMA.
- Analizar *in vivo* si el microambiente de la médula ósea confiere protección a células de LMA tratadas con radioterapia .

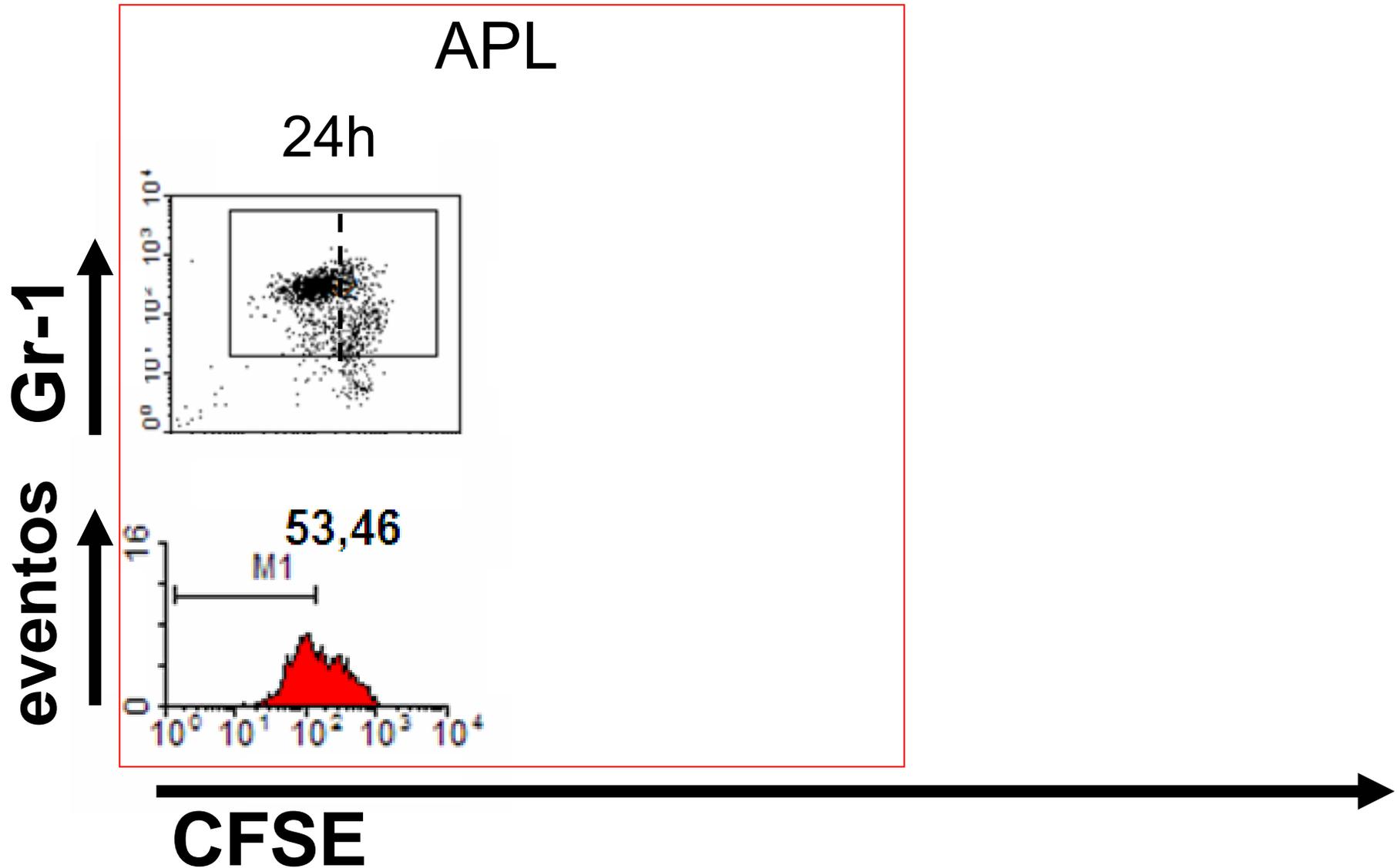
Modelo de resultados in vitro



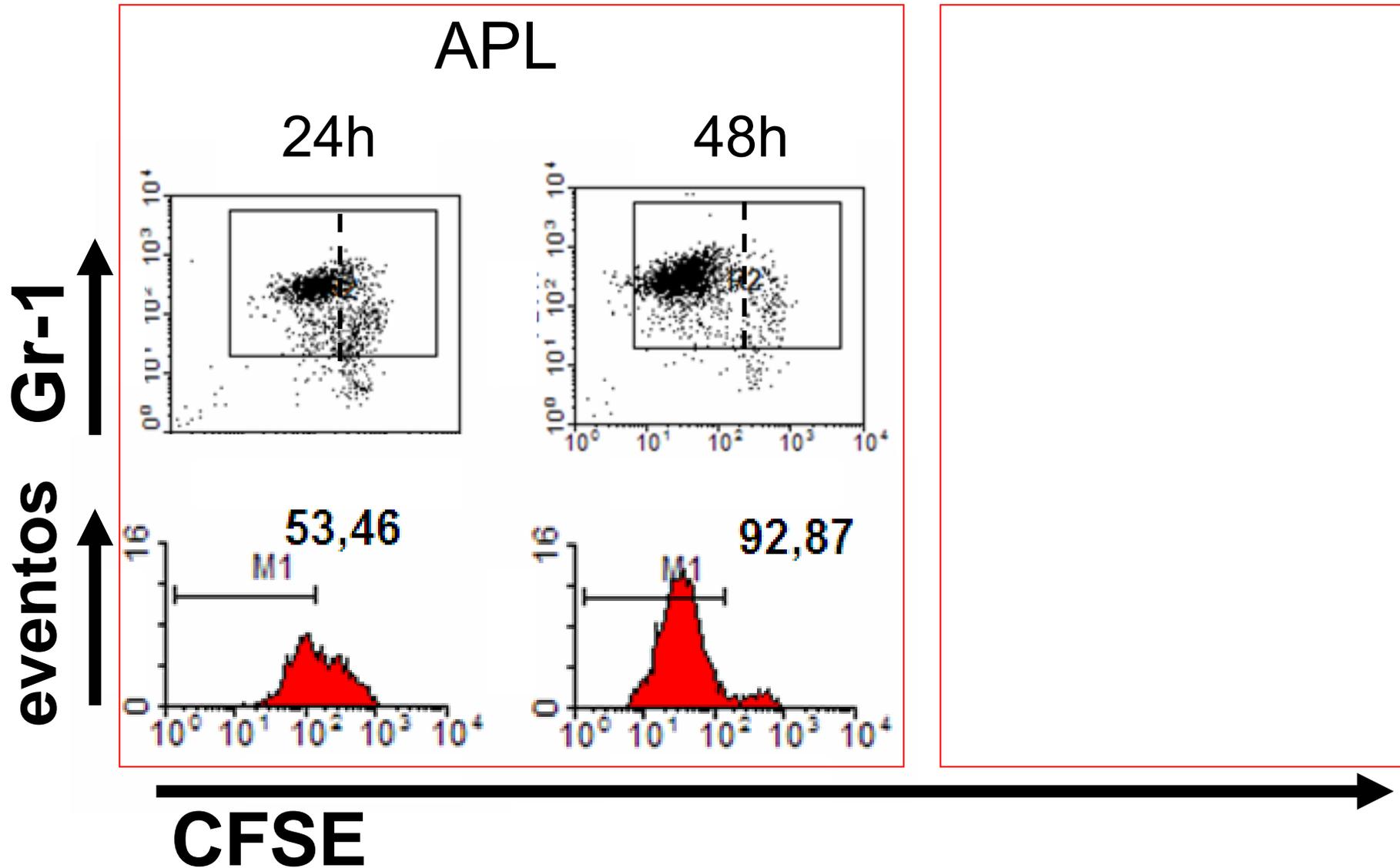
CFSE entra pasivamente a la célula, esterasas intracelulares clivan grupos acetato resultando expresión de grupos fluorescentes



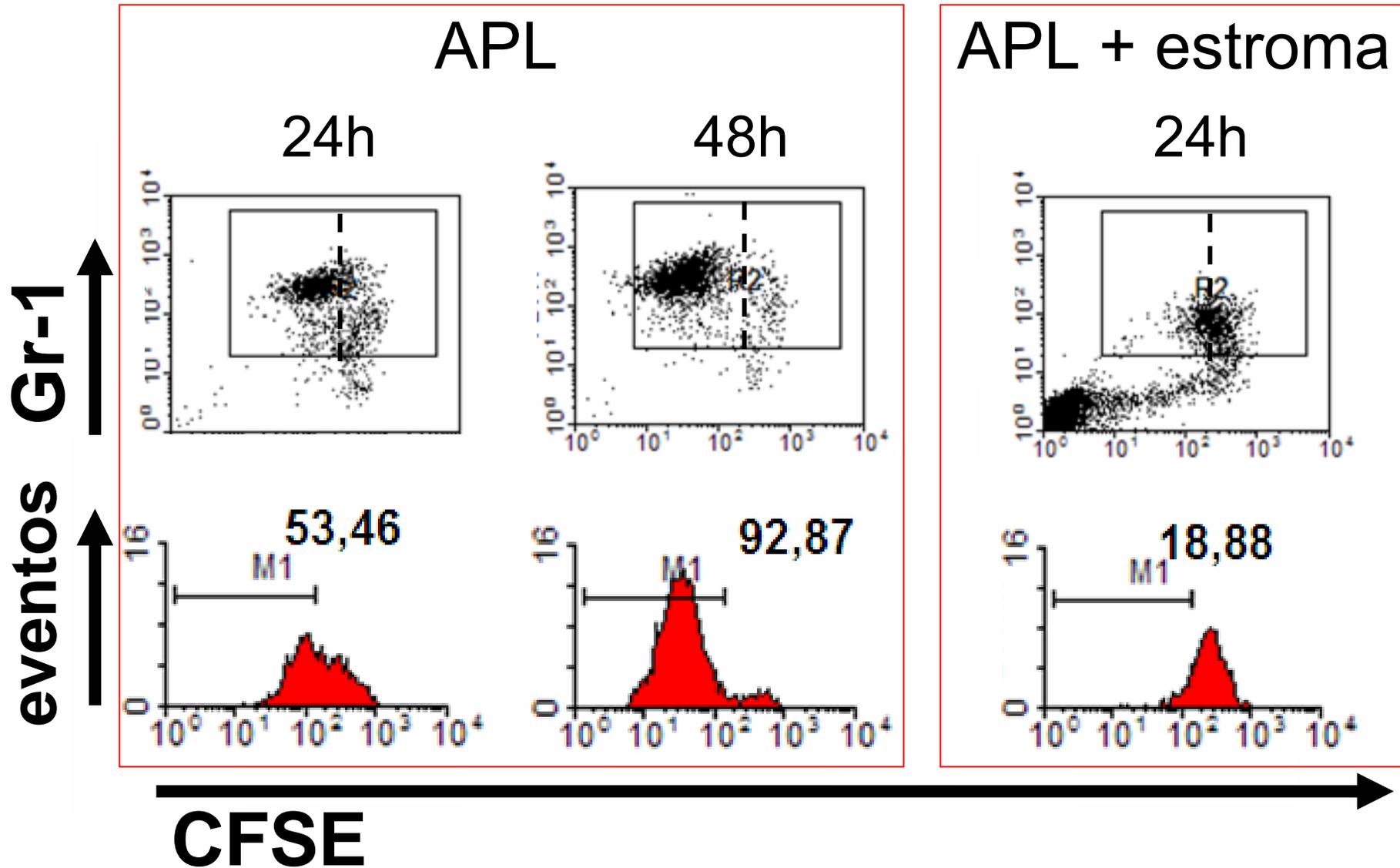
El estroma de médula ósea recluta APL en G0



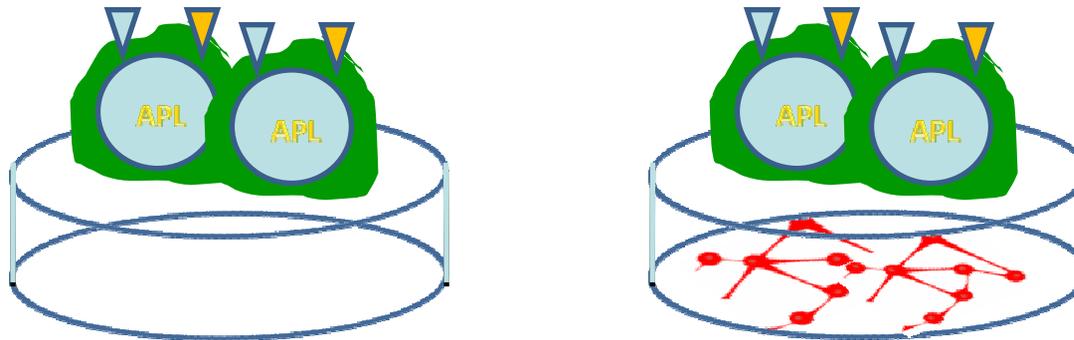
El estroma de médula ósea recluta APL en G0



El estroma de médula ósea recluta APL en G0



-Evaluar si el estado proliferativo de las células de LMA es alterado por células de estroma de MO



Co-cultivo durante
24 horas

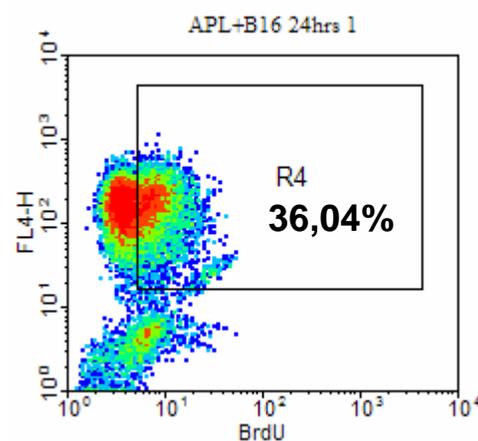
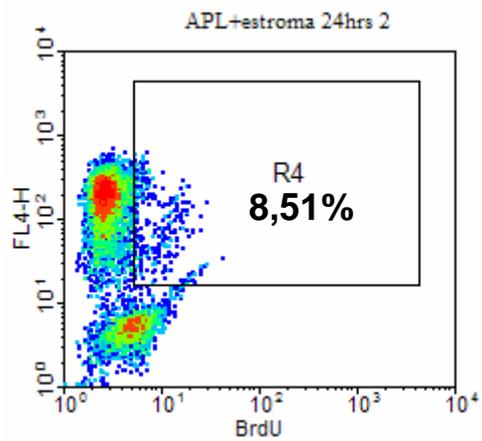
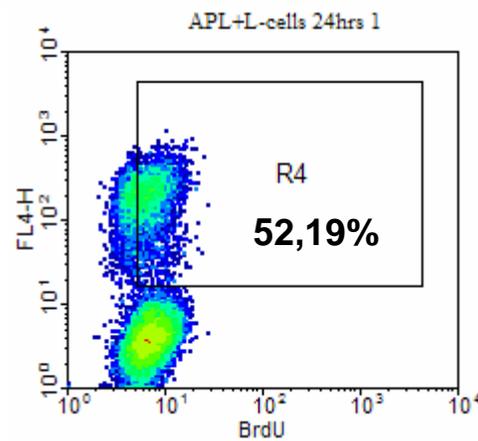
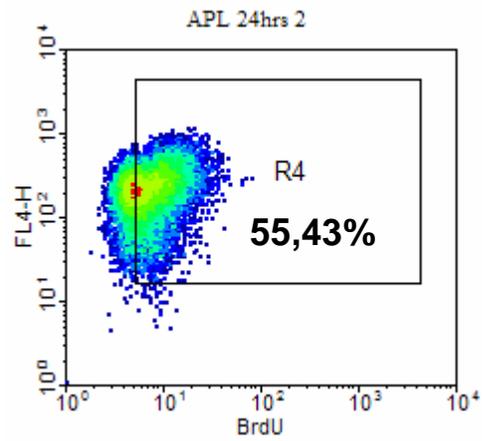
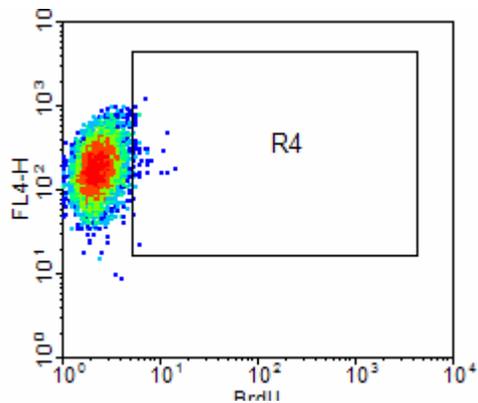
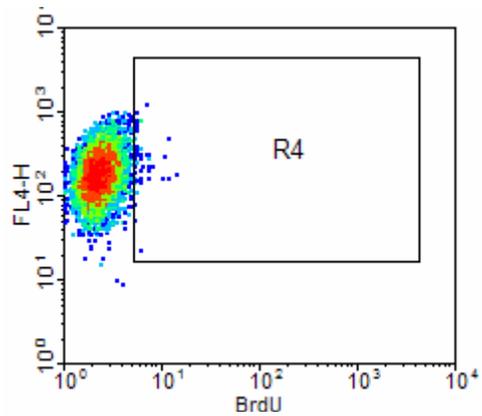


Pulso de BrdU

Cultivo durante
6 horas

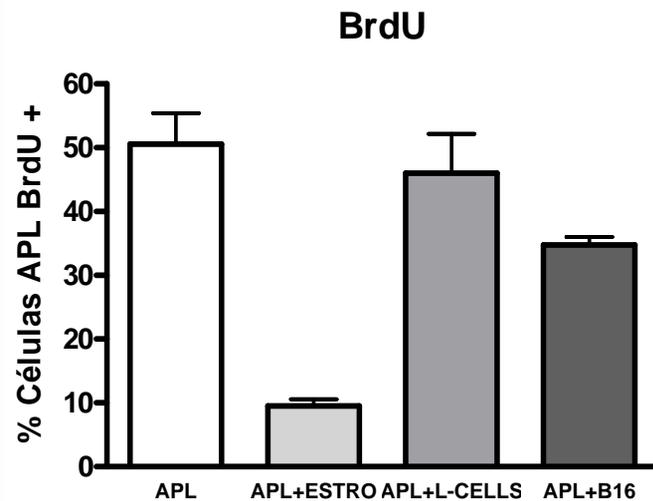


Cuantificación de células de leucemia en
proliferación
(Eventos Gr-1⁺/BrdU⁺)

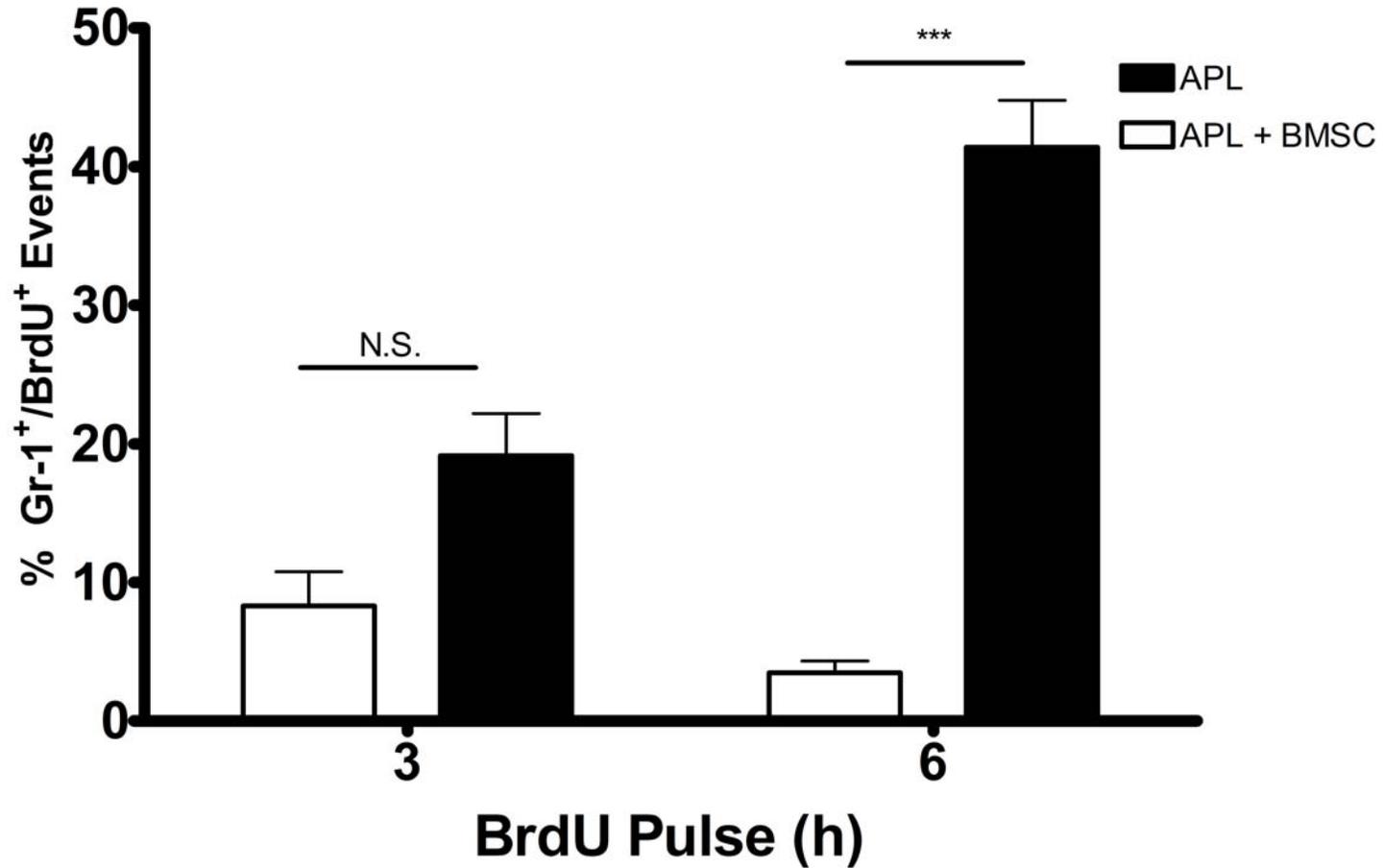


GR-1

BrdU



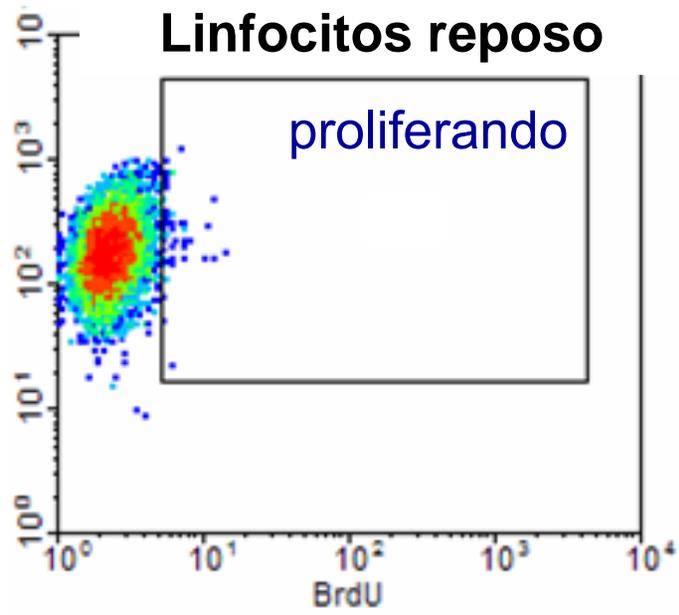
El estroma de MO recluta APL en G0



24h



Gr-1



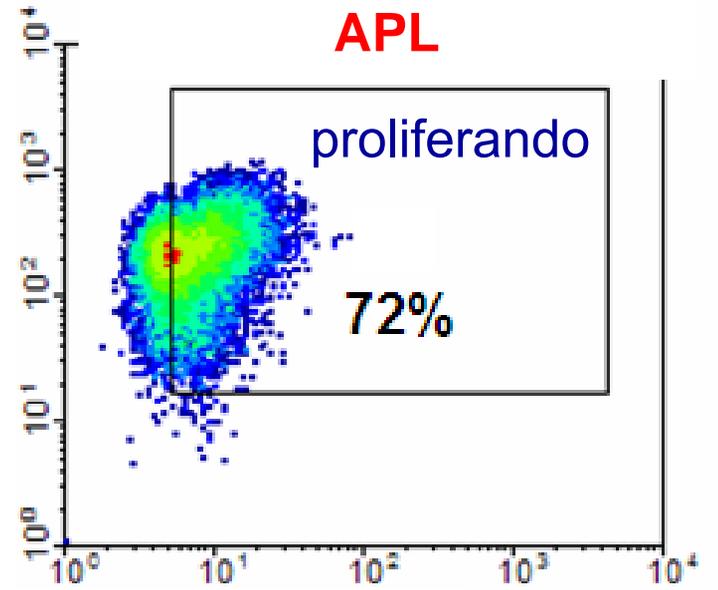
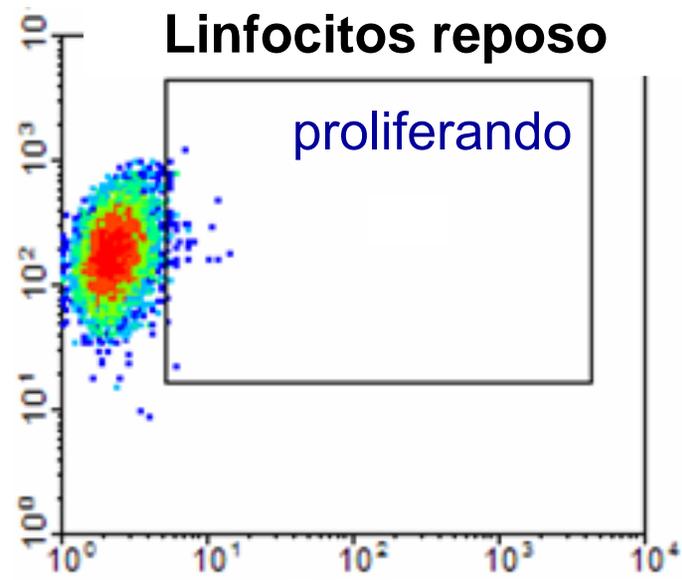
BrdU



24h



Gr-1

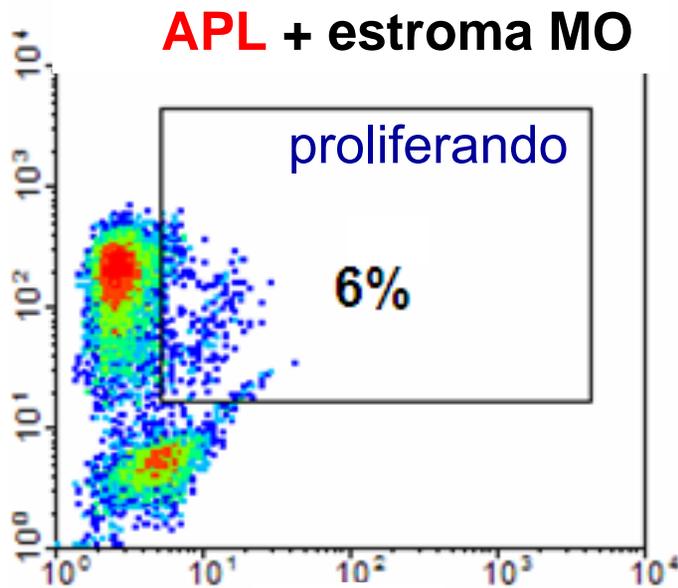
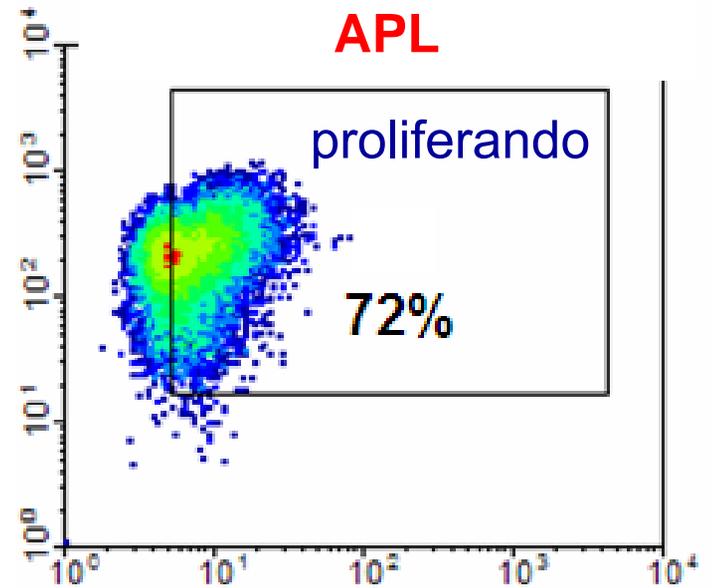
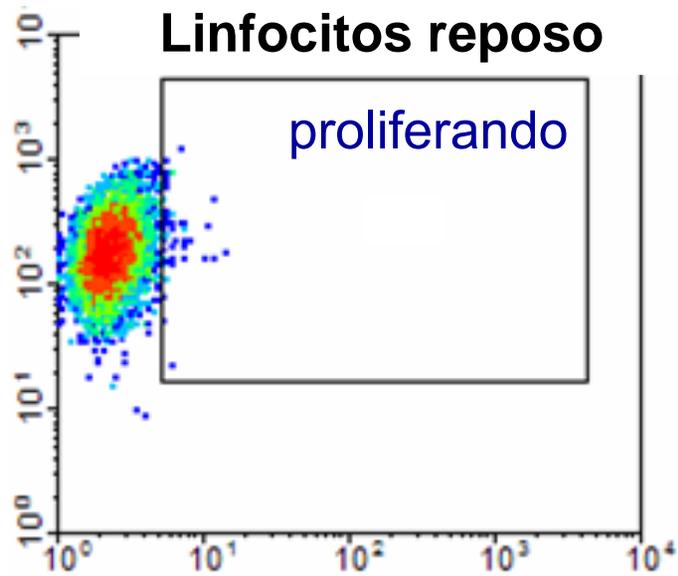


BrdU



24h

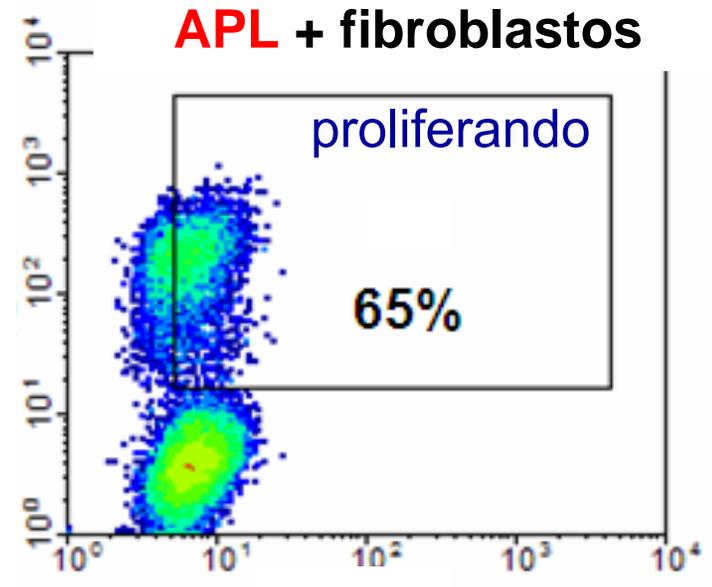
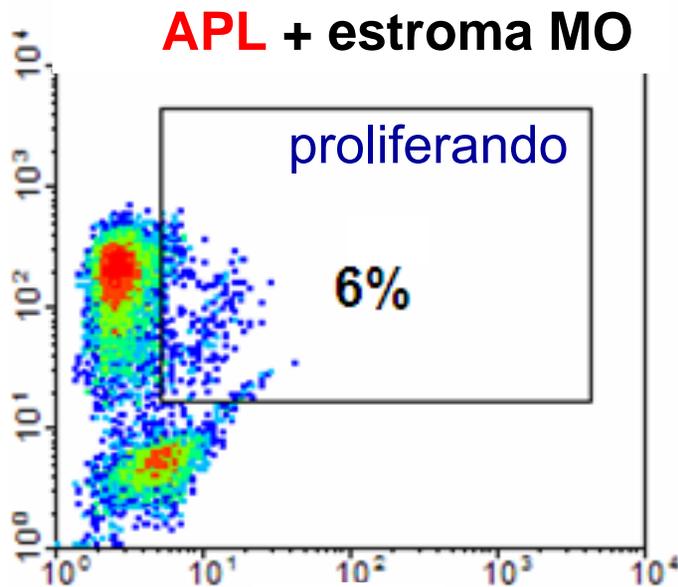
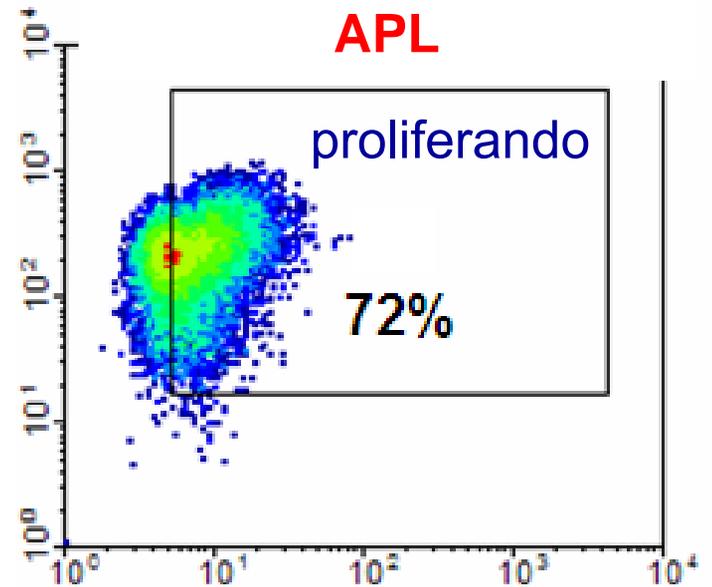
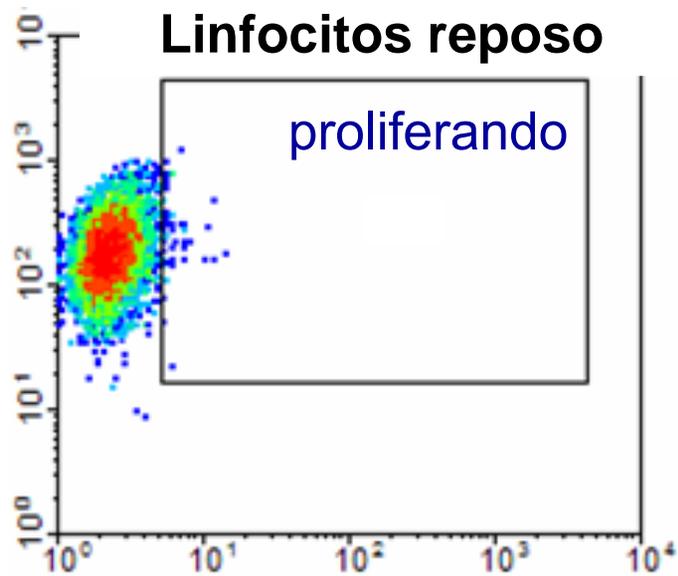
↑
Gr-1



→
BrdU

24h

↑
Gr-1

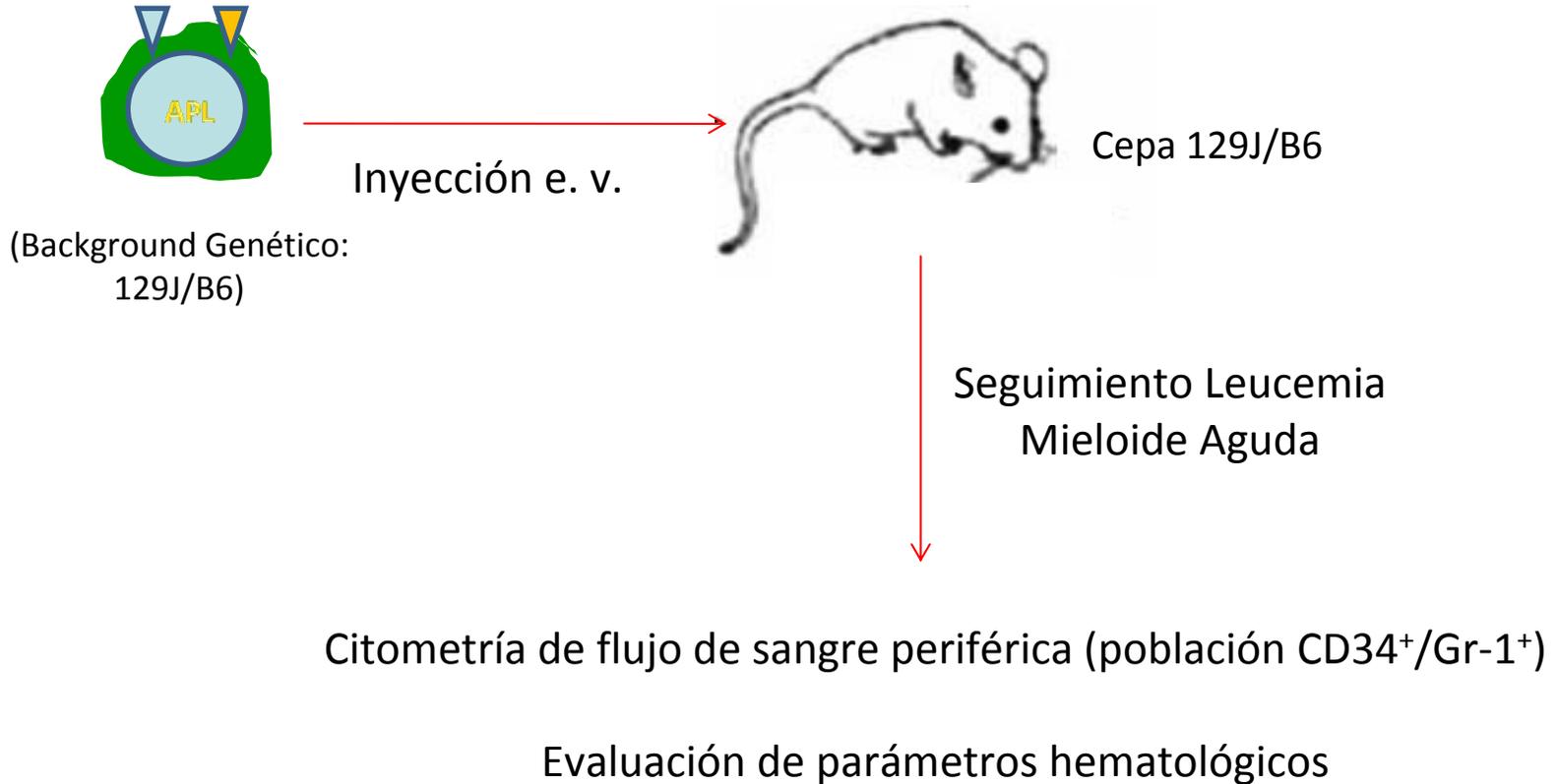


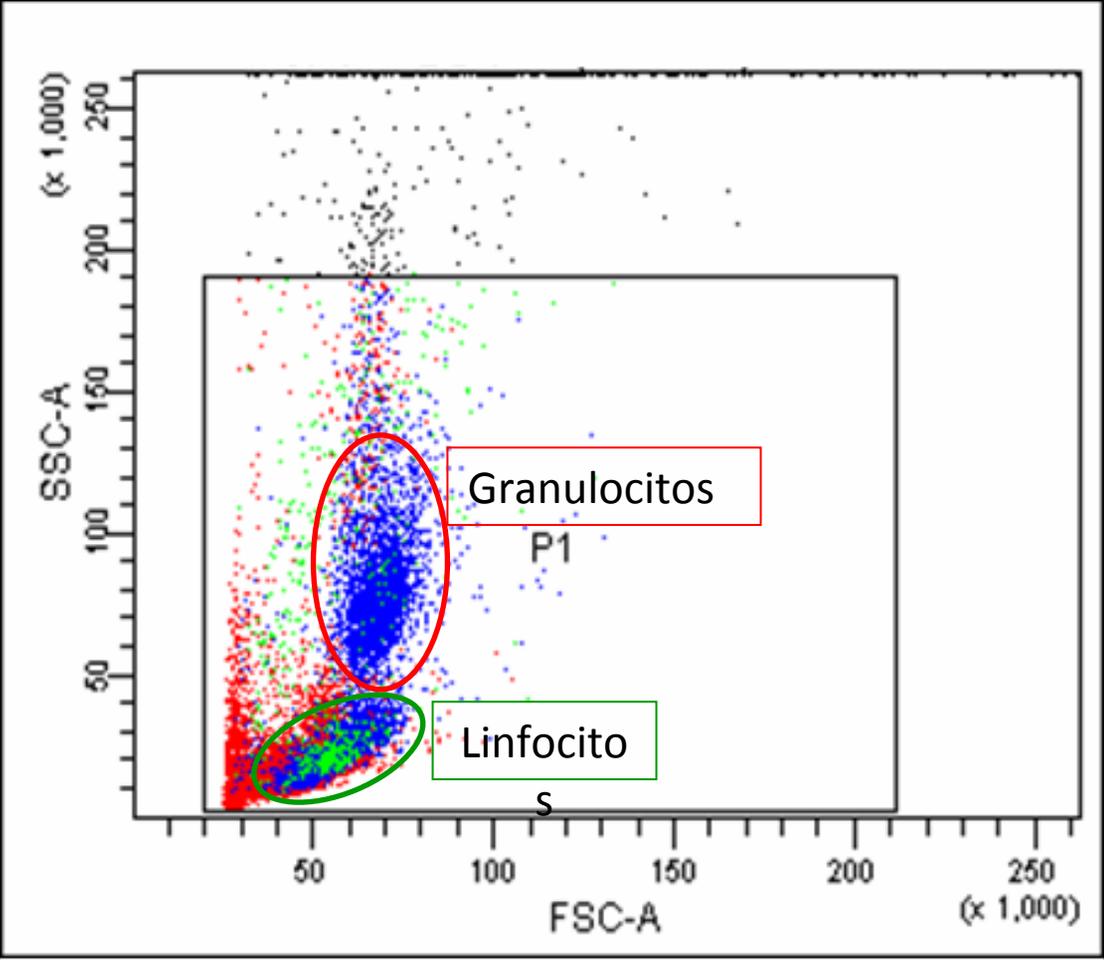
→
BrdU

Objetivos Específicos:

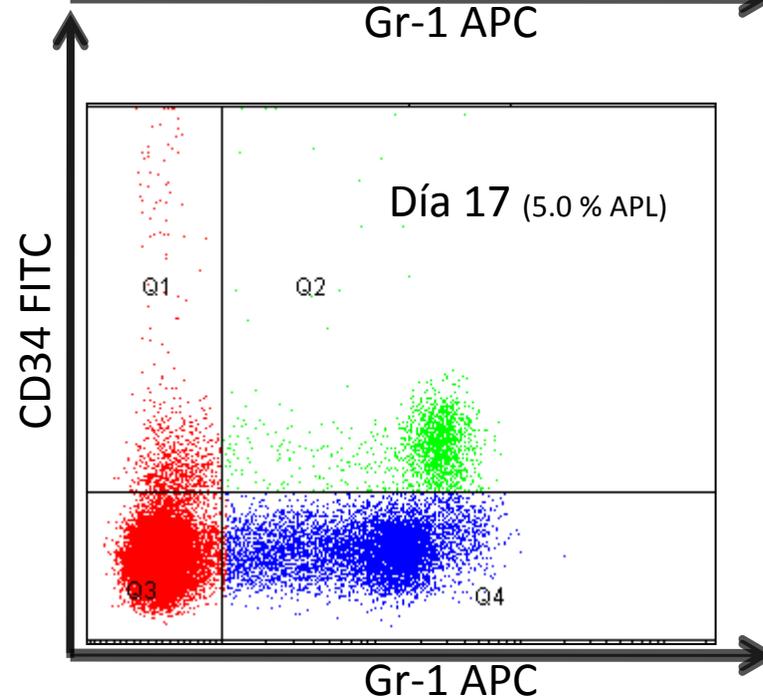
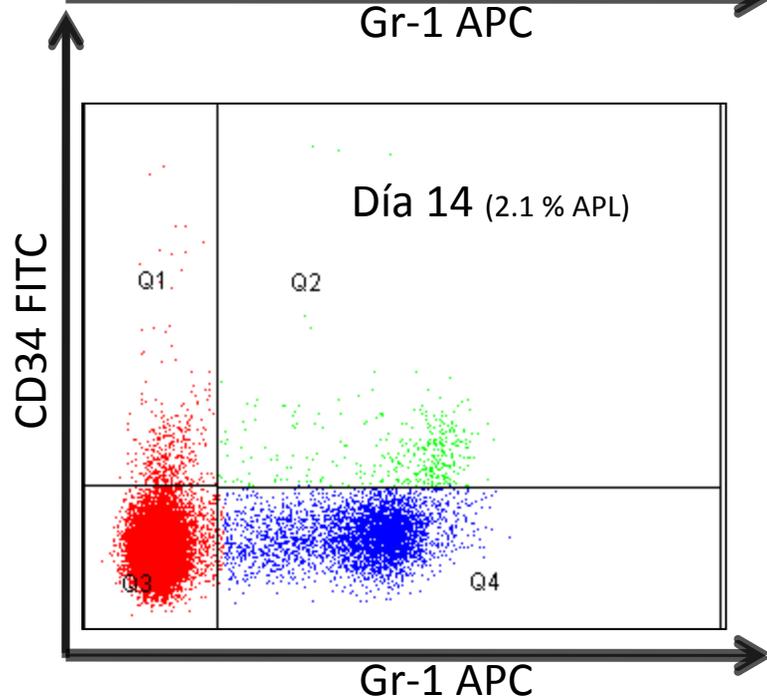
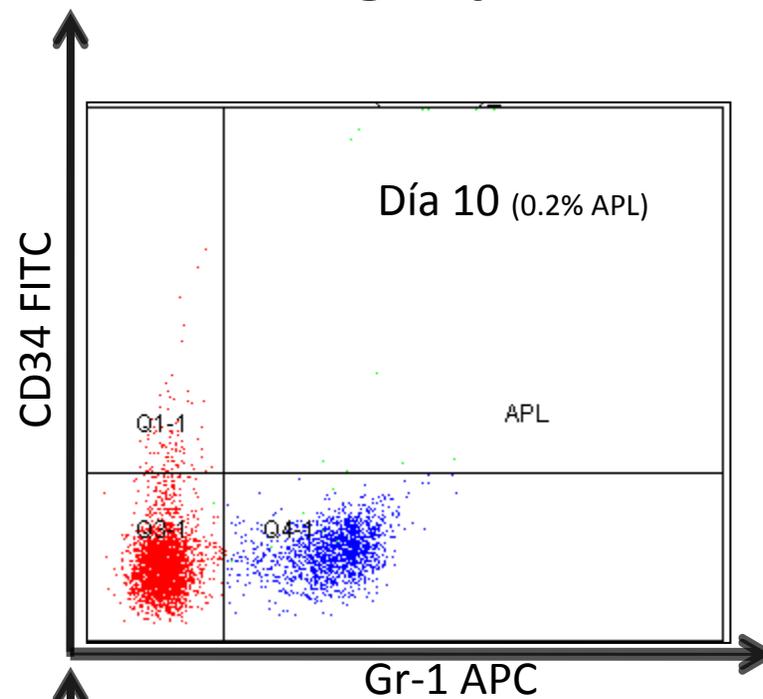
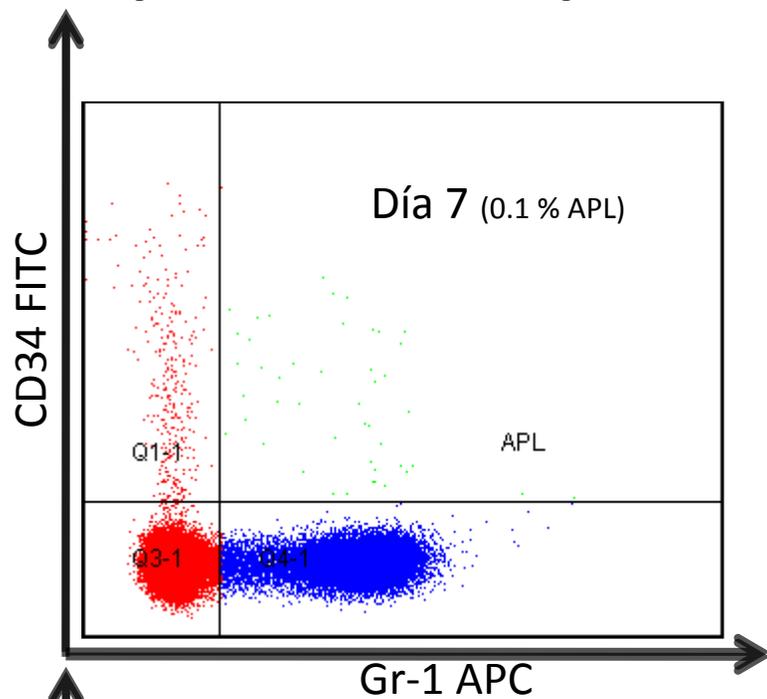
- 1.- Establecer un modelo *in vitro* para evaluar la interacción entre células de LMA y el estroma de la médula ósea.
- 2.-Analizar *in vitro* si existe adherencia entre células de LMA y células de estroma de médula ósea.
- 3.-Estudiar si la presencia de células de estroma de la médula ósea protegen a los blastos de leucemia de la apoptosis inducida por terapia.
- 4.-Evaluar si el estado proliferativo de las células de LMA es alterado por células de estroma de médula ósea.
- 5.-Establecer un modelo *in vivo* de LMA.
- 6.-Analizar *in vivo* si el microambiente de la médula ósea confiere protección a células de LMA tratadas con radioterapia .

-Establecer un modelo *in vivo* de LMA.





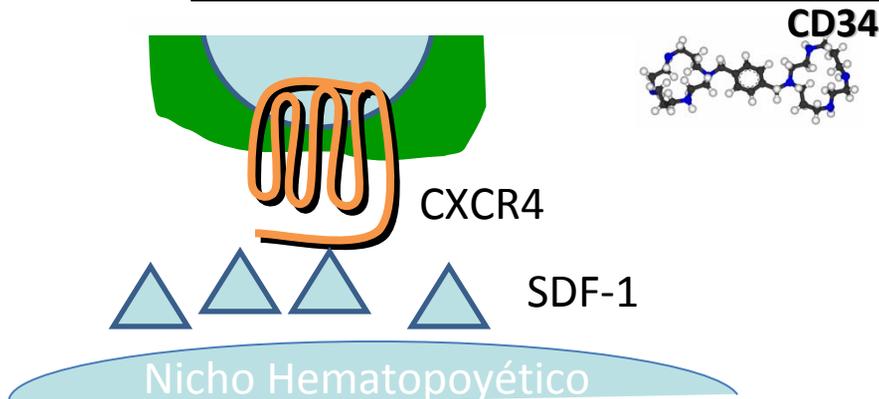
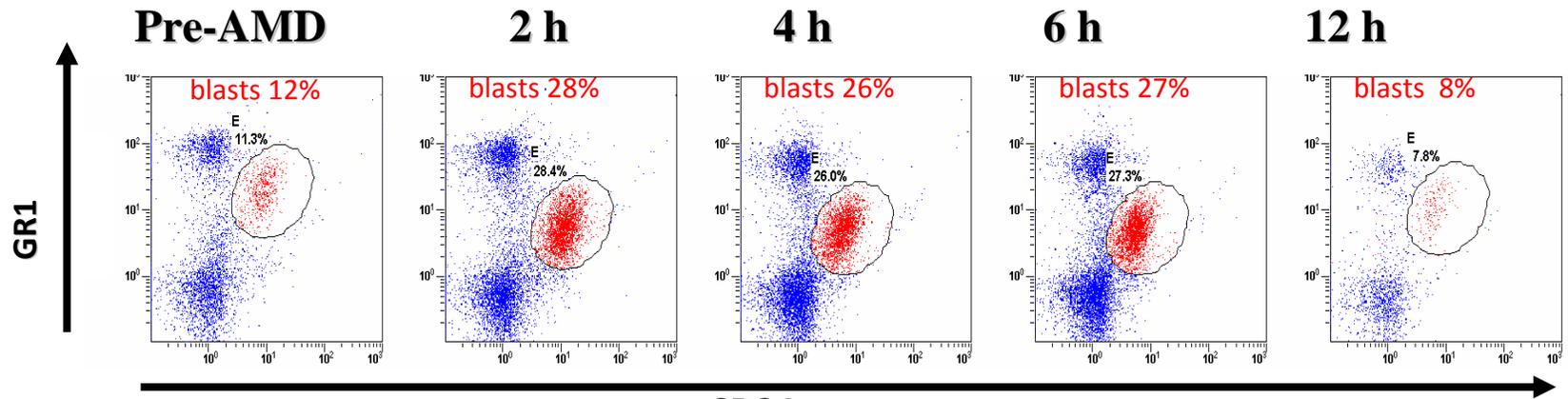
Expansión de la población de LMA en sangre periférica



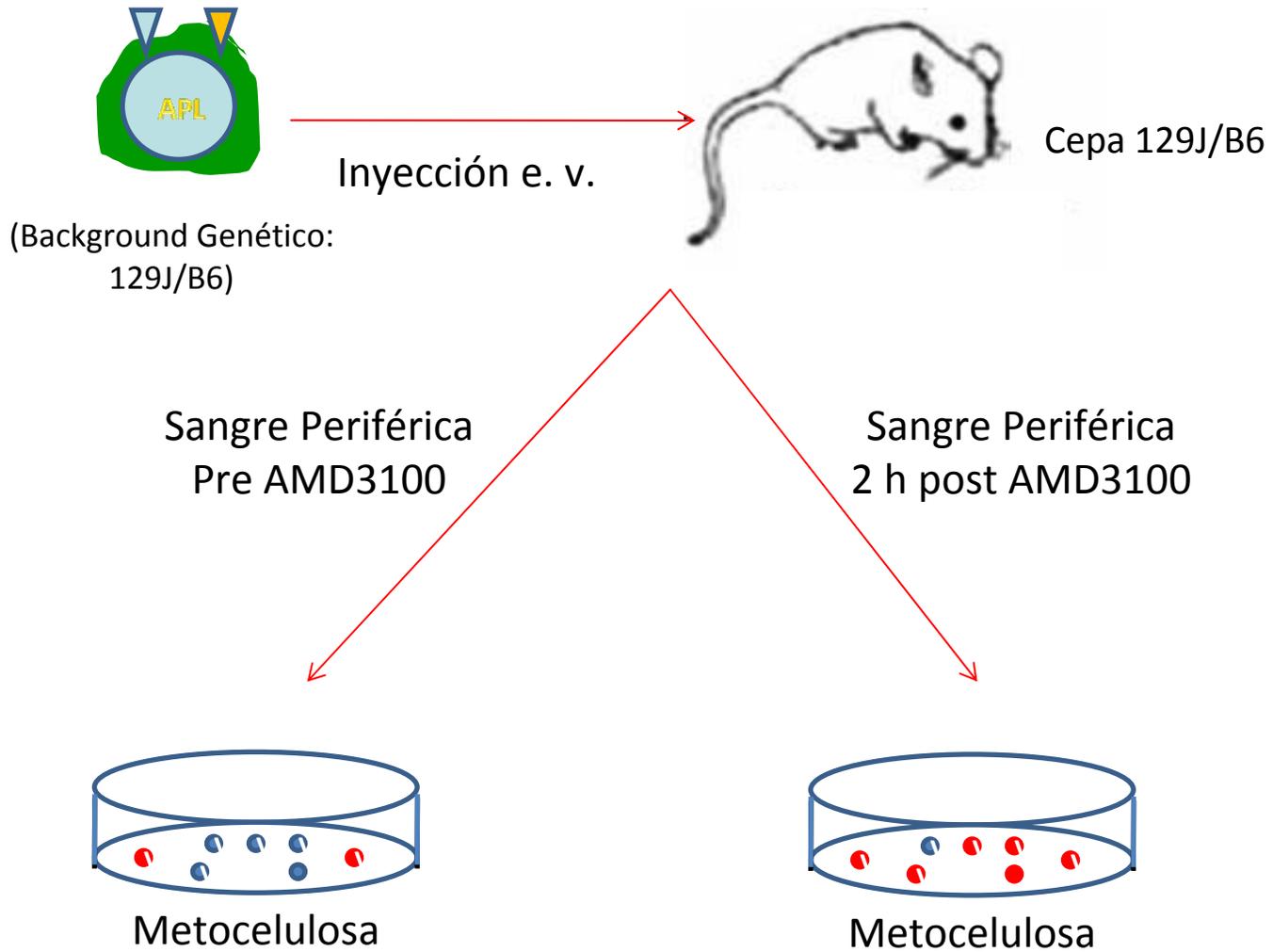
Objetivos Específicos:

- 1.- Establecer un modelo *in vitro* para evaluar la interacción entre células de LMA y el estroma de la médula ósea.
- 2.-Analizar *in vitro* si existe adherencia entre células de LMA y células de estroma de médula ósea.
- 3.-Estudiar si la presencia de células de estroma de la médula ósea protegen a los blastos de leucemia de la apoptosis inducida por terapia.
- 4.-Evaluar si el estado proliferativo de las células de LMA es alterado por células de estroma de médula ósea.
- 5.-Establecer un modelo *in vivo* de LMA.
- 6.-Analizar *in vivo* si el microambiente de la médula ósea confiere protección a células de LMA tratadas con radioterapia .

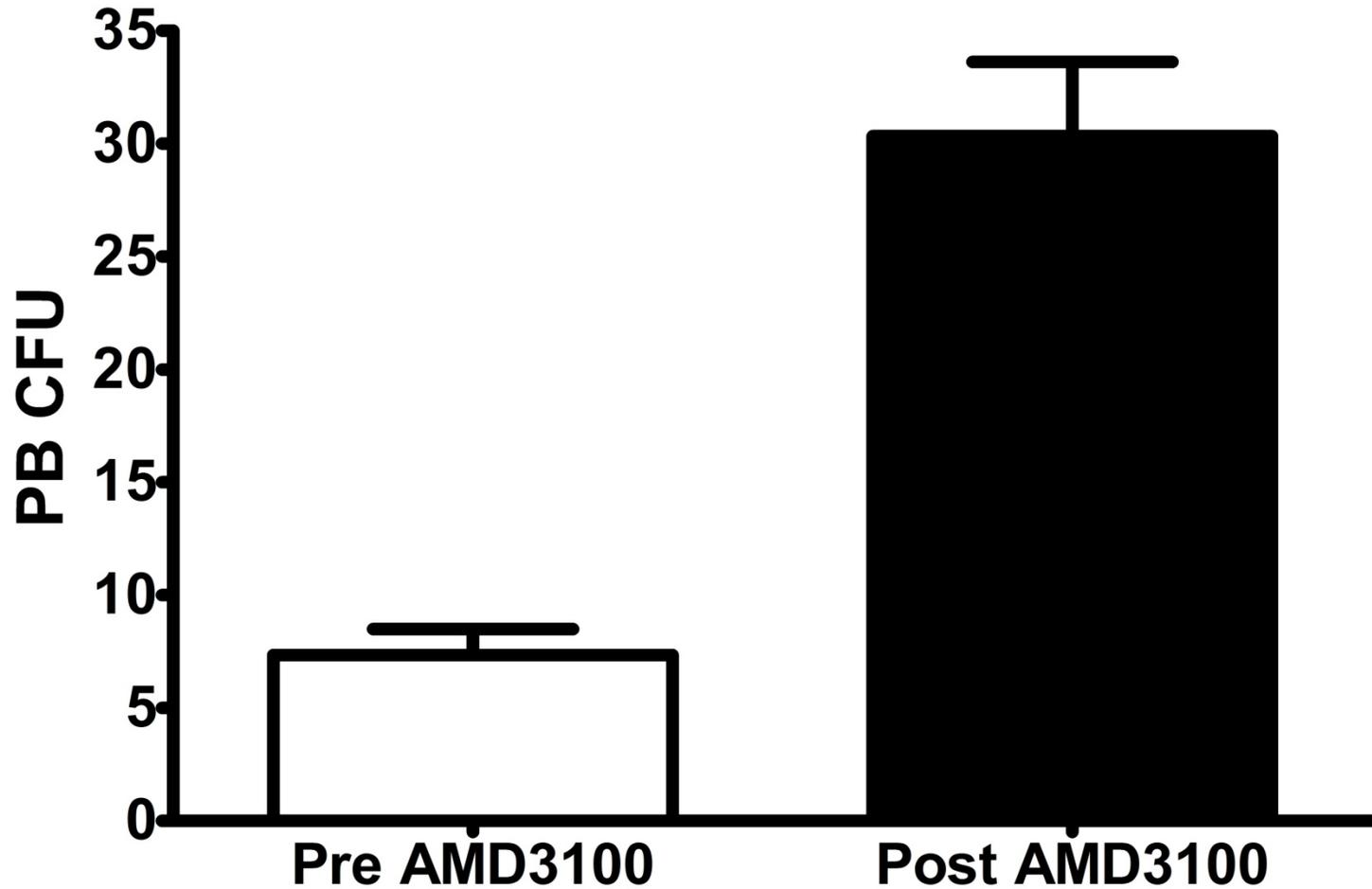
-AMD3100 es un antagonista competitivo de CXCR4, moviliza células de leucemia desde la MO a la sangre periférica.



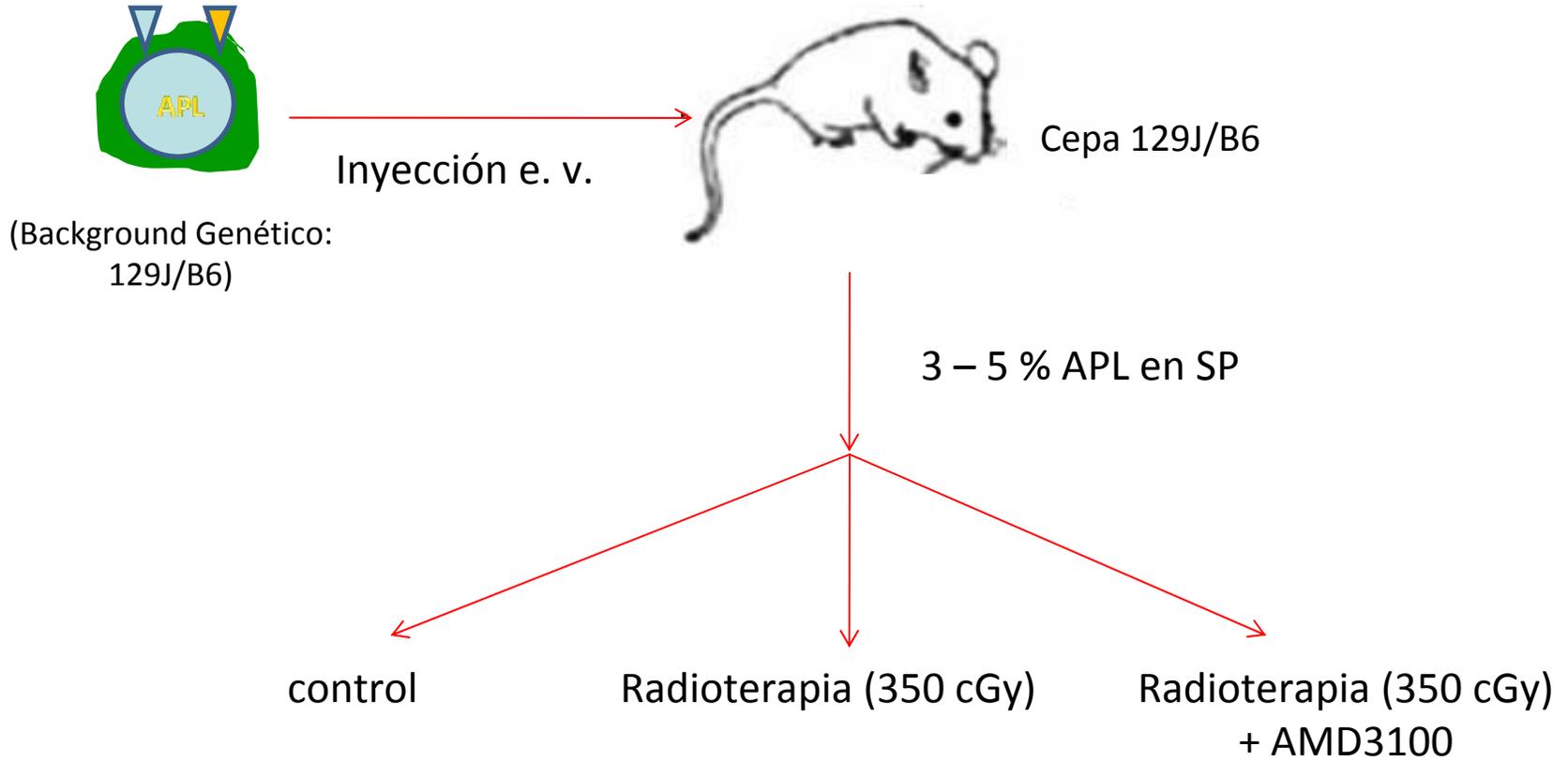
(Nervi, datos en prensa)

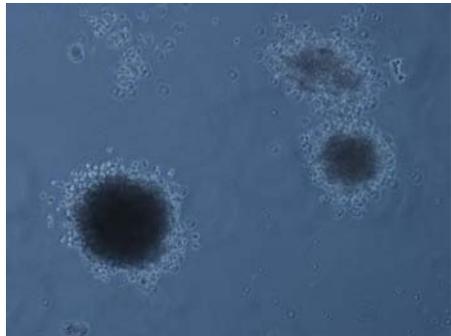


AMD3100 moviliza APL-CFU *in vivo*

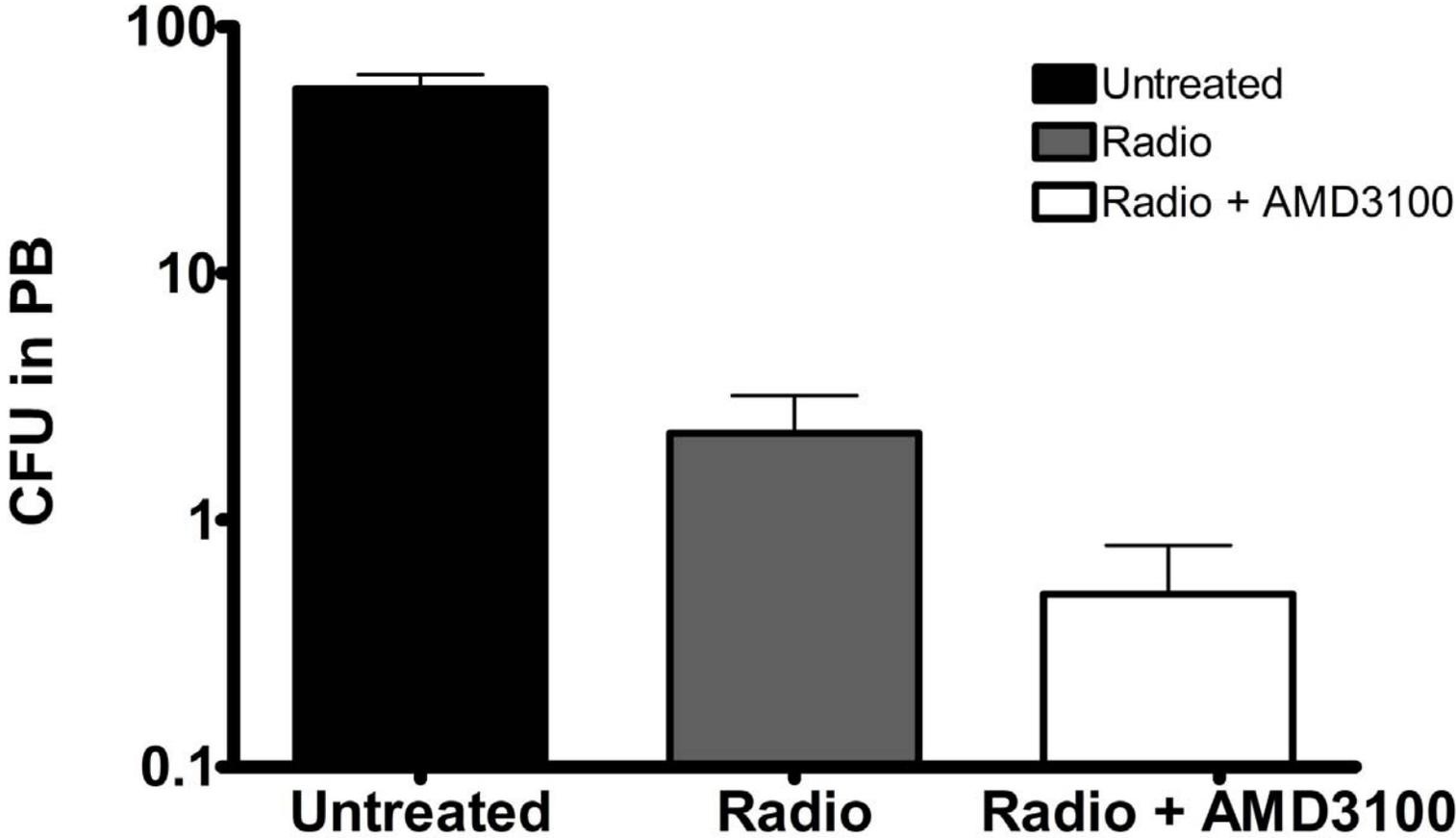


-Analizar *in vivo* si el microambiente de la MO confiere protección a células de LMA tratadas con radioterapia

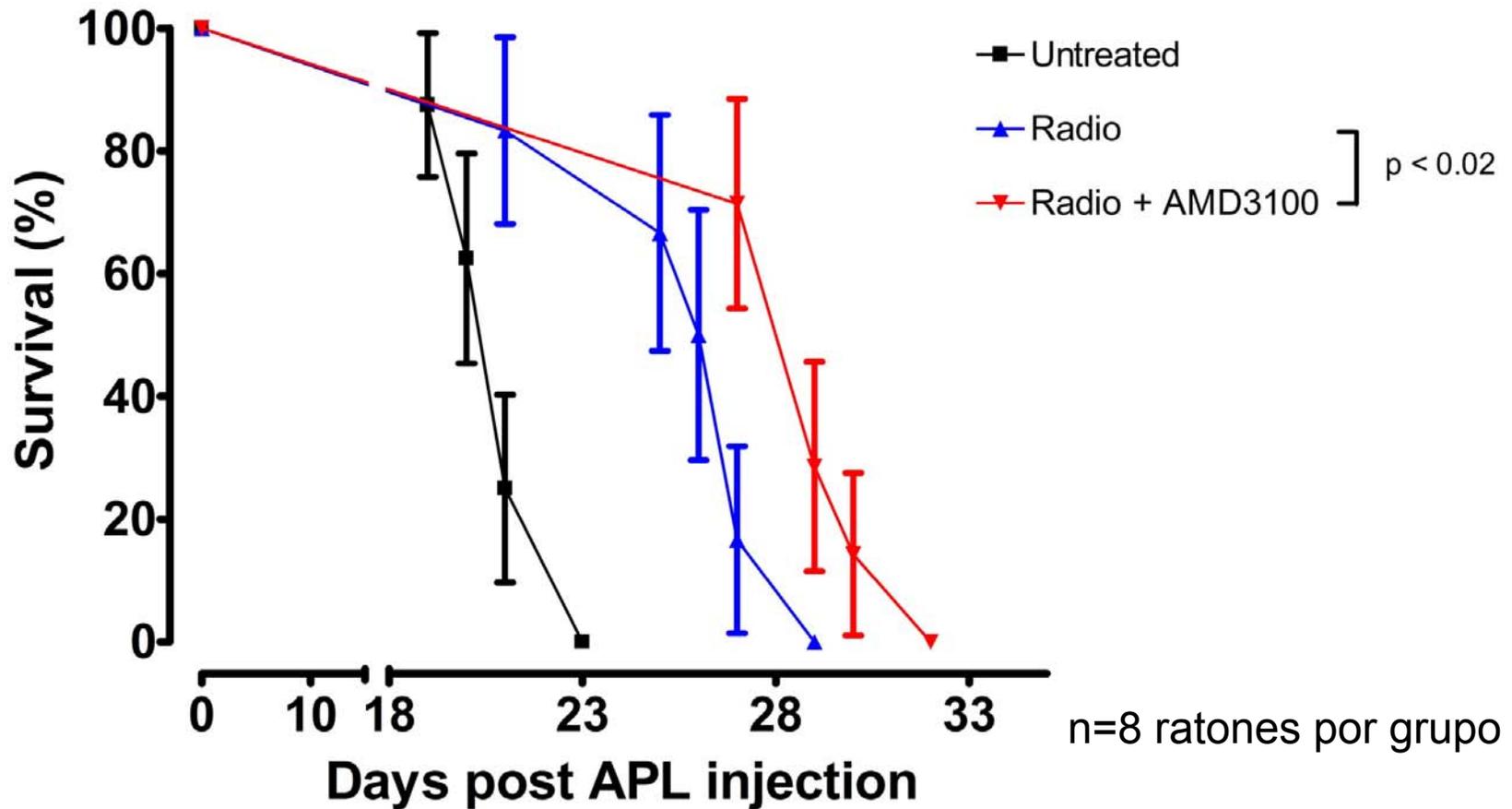




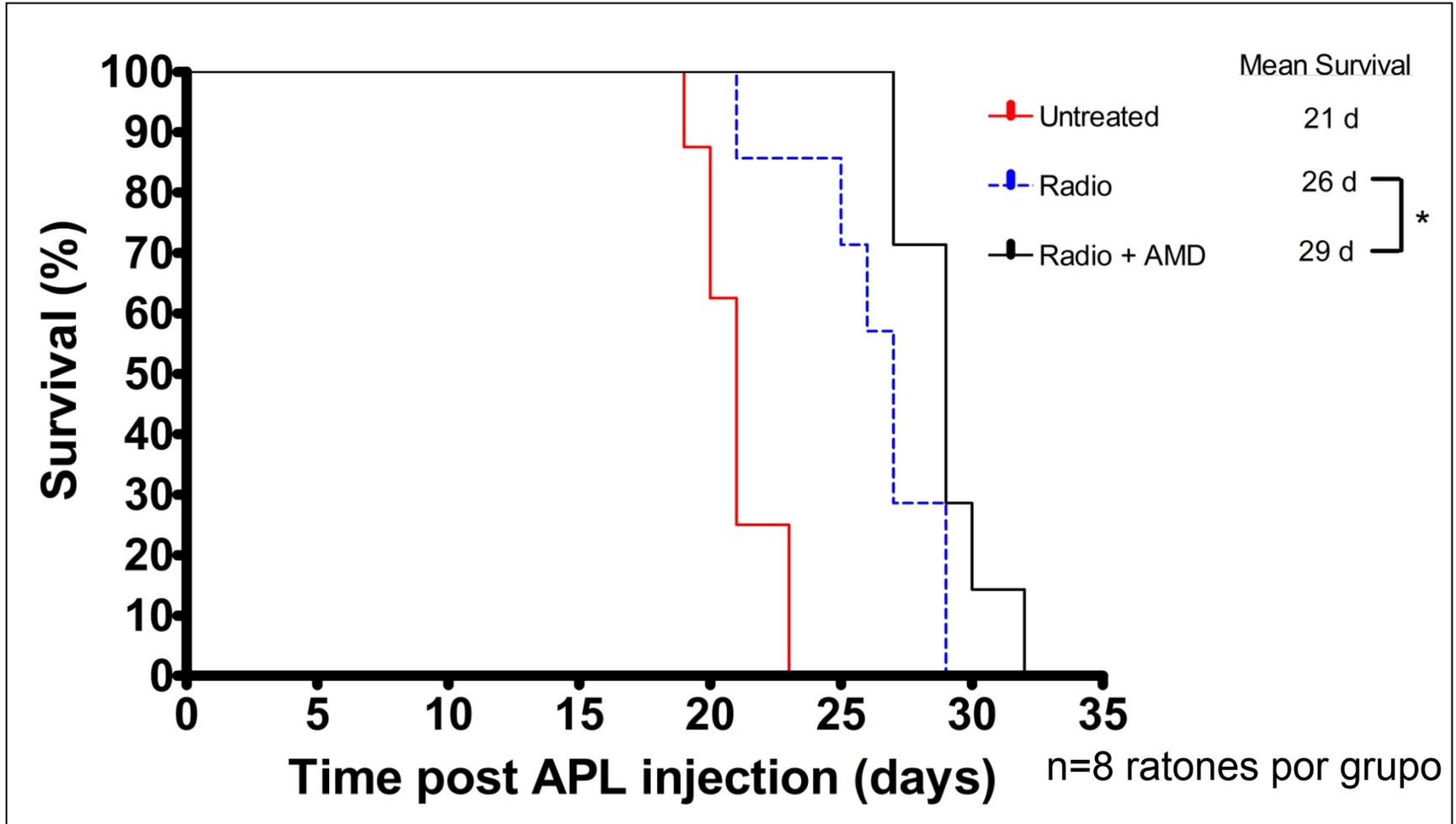
APL-CFU



Ratones leucémicos tratados con radioterapia y AMD3100 sobreviven más que ratones tratados con radioterapia solamente.



Ratones leucémicos tratados con radioterapia y AMD3100 sobreviven más que ratones tratados con radioterapia solamente.



CONCLUSIONES

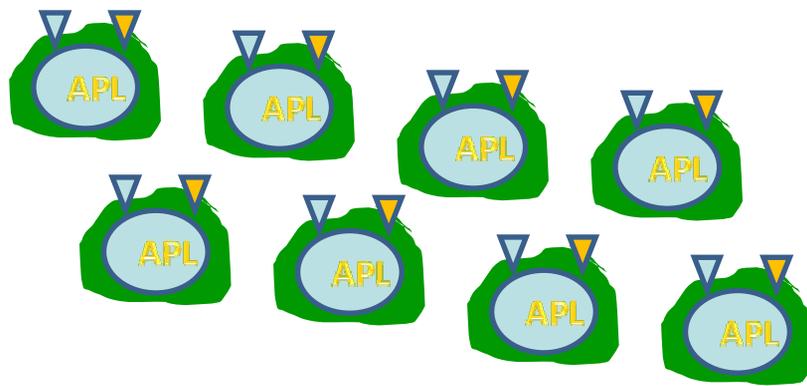
1. La leucemia APL interactúa específicamente con el estroma de MO
2. El estroma de MO protege a APL de apoptosis inducida por quimio o Rt en modelos in vitro e in vivo.
3. Los mecanismo probablemente asociados son:
 - El estroma de la MO recluta células precursoras de leucemia en G0, reduciendo su susceptibilidad a agentes citotóxicos ciclo celular dependientes.
 - Pudiera haber paso de señales antiapoptóticas entre estroma y APL mediado por gap junctions.
 - AMD3100 pudiera movilizar preferencialmente células precursoras de leucemia de la médula ósea a la sangre periférica, aumentando impacto del tratamiento.
4. La interrupción en la comunicación entre la célula tumoral y el estroma podrían ofrecer una nueva estrategia que contribuyera a curar el cáncer.

Circulación

Moléculas de Adhesión ↓

Proliferación ↑

n

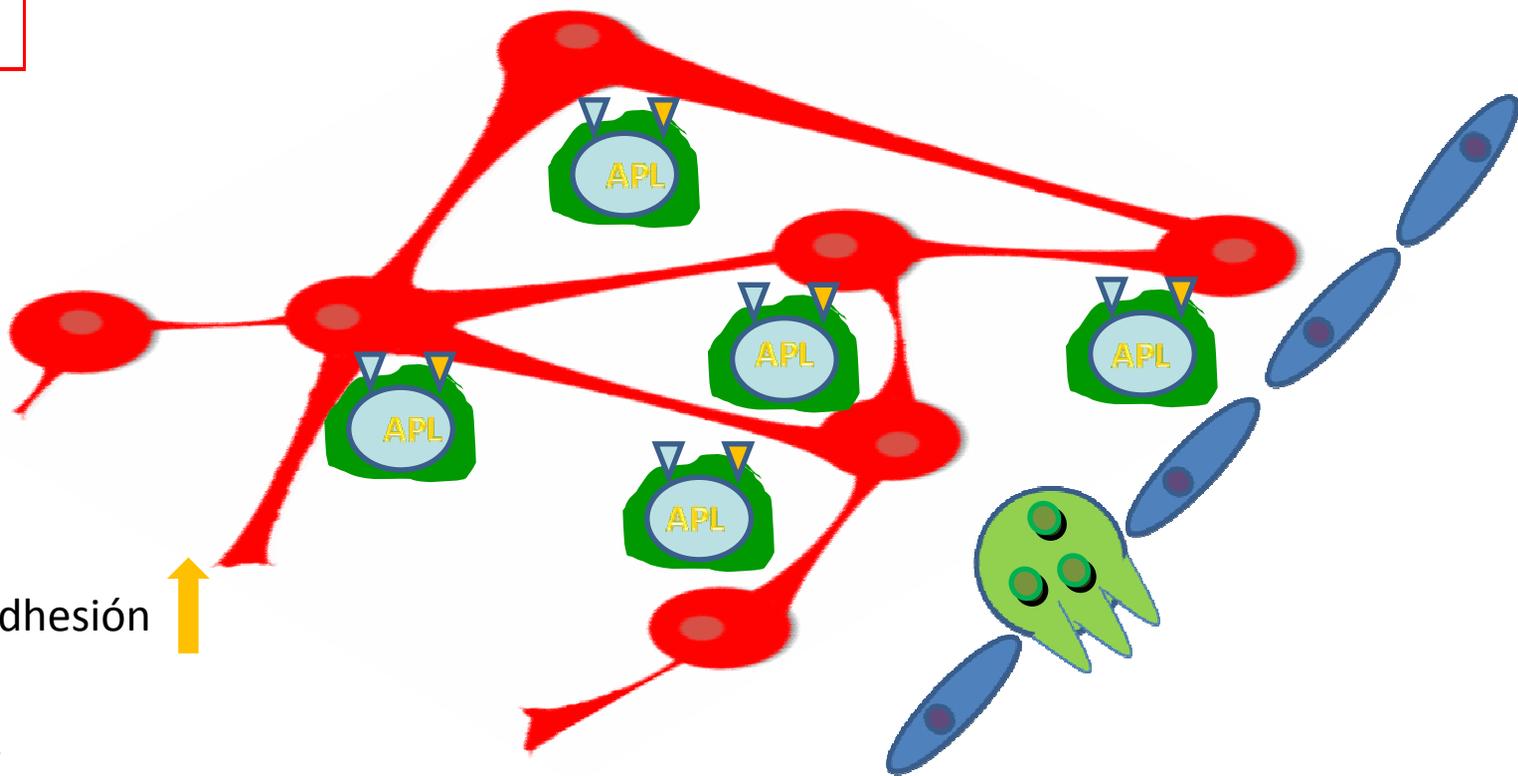


Médula Ósea

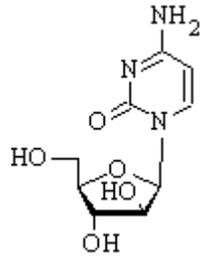
Moléculas de Adhesión ↑

Proliferación ↓

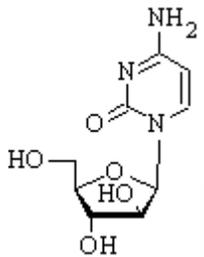
n



Circulación

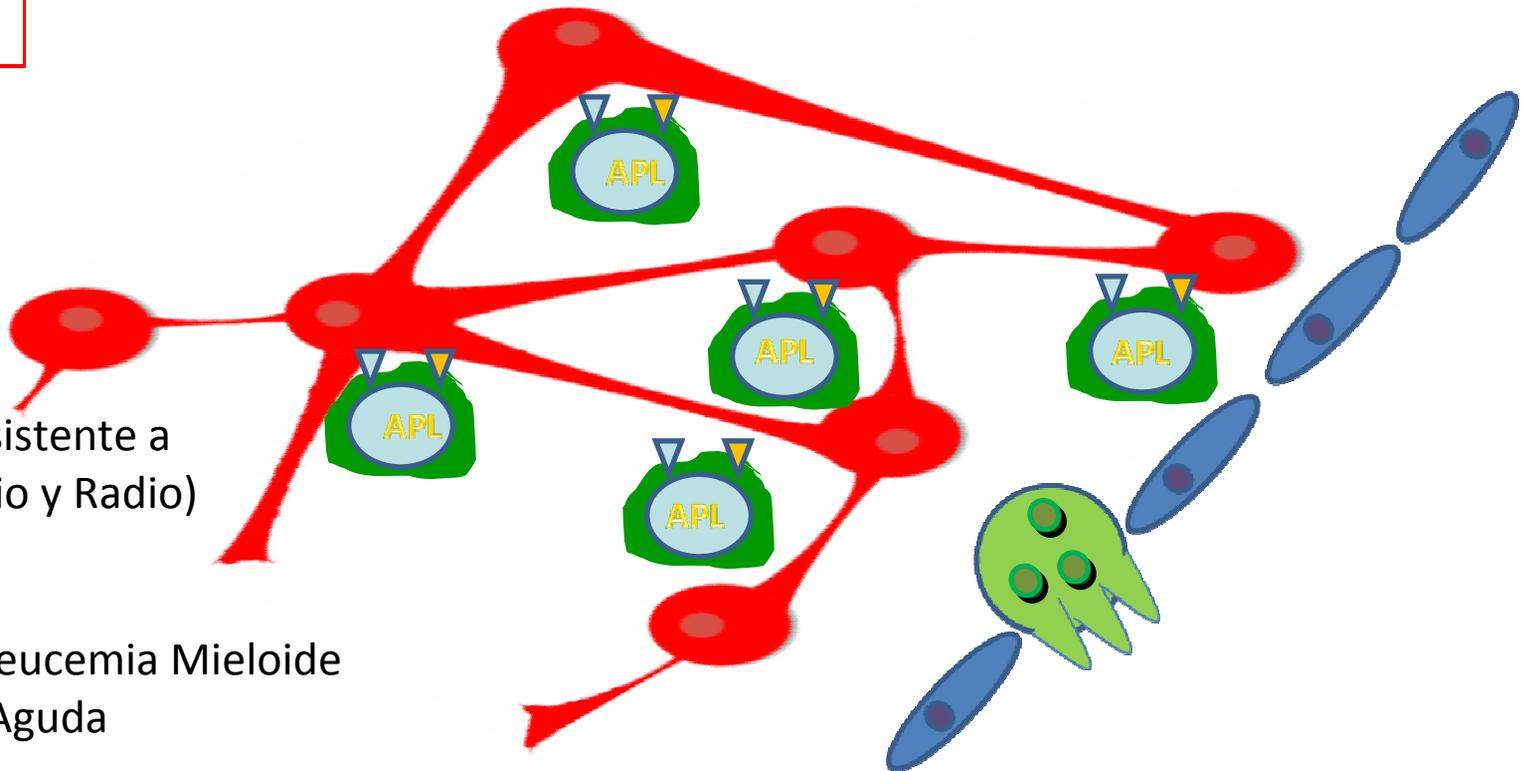


Médula Ósea



Población resistente a
Terapia (Quimio y Radio)

Recaída de Leucemia Mieloide
Aguda





AGRADECIMIENTOS



EQUIPO

- Tesista Francisco Barriga
- Eric Riquelme, Bioquímico
- Richard Broekhuizen, tecnólogo holandés
- Dr. Pelayo Besa, radioterapeuta
- Sra. Marta Maffioletti, Laboratorio de Hematología
- PhD Alexis Kalergis, C. Biológicas/Medicina

FONDOS

- Núcleo Millenium
- Facultad de Medicina de la Universidad Católica, DIPUC