

Perfil de expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias de pacientes con leucemia mieloide crónica en respuesta al tratamiento con imatinib

Gene expression profile of pro-inflammatory cytokines of patients with chronic myeloid leukemia in response to imatinib treatment

Bestach Y, Ferrulli M, Krzywinski A, Martorell M, Piaggi D'Agostino A, Ayllón Cabrera I, Larripa I, Belli C

Laboratorio de Genética Hematológica, Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET)/ Academia Nacional de Medicina.

bestachyesica@hotmail.com

TRABAJO PRESENTADO EN SESIÓN ORAL CON MENCIÓN ESPECIAL EN EL MARCO DEL XXIII CONGRESO ARGENTINO DE HEMATOLOGÍA

Fecha recepción: 24/06/2018
Fecha aprobación: 01/08/2018



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA
Volumen 22 n° 2: 127-133
Mayo - Agosto 2018

Palabras claves: leucemia mieloide crónica, *TNF*, *IFNG*, *IL6*, respuesta molecular, imatinib.

Keywords: chronic myeloid leukaemia, *TNF*, *IFNG*, *IL6*, molecular response, imatinib.

Resumen

Imatinib representa la terapia de primera línea actual para pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC). Además de su acción directa inhibiendo BCR-ABL1, también podría modular la respuesta anti-tumoral. Sin embargo, escasos trabajos evalúan posibles eventos inmuno-patológicos relacionados con la expresión de citoquinas al diagnóstico y bajo tratamiento. Por lo tanto, nuestro objetivo fue analizar los niveles de expresión génica de las citoquinas pro-inflamatorias *TNF*, *IFNG* e *IL6* en pacientes con LMC considerando la respuesta molecular al imatinib.

Fueron analizadas 161 muestras de sangre periférica de 92 pacientes (34 con seguimiento) de acuerdo a la respuesta molecular alcanzada, y 26 muestras de individuos controles. La expresión génica fue cuantificada mediante PCR en tiempo real a partir de una alícuota de la muestra utilizada para monitorear el %*BCR-ABL1*.

Nuestros resultados muestran una disminución significativa de los niveles génicos de *TNF*, *IFNG* e *IL6* en pacientes al diagnóstico *versus* los niveles de la población control. Además, se observó un aumen-

to significativo de *TNF* e *IL6* en aquellos pacientes que lograron la respuesta molecular óptima en los diferentes tiempos evaluados durante el tratamiento con imatinib.

Si bien los niveles periféricos de expresión génica de *TNF*, *IFNG* e *IL6* no reflejarían el microambiente tumoral, su dinámica contribuiría en la caracte-

rización de una respuesta inmune anti-LMC a nivel sistémico de acuerdo a la respuesta molecular al imatinib. En conclusión, nuestros resultados son consistentes con un periodo de inmunosupresión al diagnóstico y con un efecto estimulador al iniciar imatinib, sobre todo en pacientes respondedores.

Abstract

Imatinib represents the current first-line therapy for chronic myeloid leukaemia (CML) patients. Besides its direct action targeting BCR-ABL1, imatinib may also influence the anti-tumour response. However, there are few studies that evaluate possible immune-pathological events related to the expression of pro-inflammatory cytokines at diagnosis and during treatment. Therefore, our aim was to describe the dynamic of *TNF*, *IFNG* and *IL6* gene expression regarding molecular response to imatinib.

This study included 161 peripheral blood samples from 92 CML patients (34 serially followed) who were analysed according to the molecular response to imatinib, and 26 from healthy donors. An aliquot of the stored sample used to monitor %BCR-ABL1 was used to quantify the expression of cytokine genes by real time PCR.

Our results show a significant decrease in the gene expression of *TNF*, *IFNG* and *IL6* in patients at diagnosis compared with healthy controls. Also, a significant increase in *TNF* and *IL6* was observed in those patients who achieved the optimal molecular response at the different time points on imatinib therapy.

Despite the peripheral levels of *TNF*, *IFNG* and *IL6* genes may not reflect the tumour microenvironment, the dynamic of cytokine gene expression may account for a systemic anti-CML immune response according to the molecular response to imatinib.

In conclusion, our results are in agreement with a significant immune suppression in CML patients at diagnosis and an initial stimulatory effect on the immune system after imatinib initiation, especially in responder patients.

Introducción

Imatinib, el primer inhibidor de tirosina kinasa (ITK), ha revolucionado el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC) y continúa siendo en la actualidad el tratamiento de primera línea de preferencia para estos pacientes⁽¹⁾. Además de la acción directa inhibiendo la actividad de la onco-proteína BCR-ABL1, la terapia con ITK también podría modular la respuesta inmune anti-LMC en los pacientes tratados⁽²⁻⁴⁾.

Una disminución en la respuesta inmune anti-tumoral ha sido descrita en los pacientes con LMC al diagnóstico, asociada a la expansión de poblaciones celulares con actividad inmunosupresora y a la disfuncionalidad de las respuestas inmune efectoras, principalmente células *Natural Killer* (NK) y linfocitos T^(3,5,6). En los pacientes que inician tratamiento con ITK se observa una reactivación del sistema inmune, restaurando la vigilancia inmunológica mediada por células efectoras; así como también, una disminución en el número y función de las células

inmunosupresoras^(3,5-7). Sin embargo, la dinámica de reactivación del sistema inmune de acuerdo a la respuesta de los pacientes a la terapia con ITK no ha sido bien caracterizada.

La mayoría de los trabajos previos presentan heterogeneidad entre sus diseños experimentales, los cuales incluyen el análisis directo en células madre leucémicas, en plasma medular y/o en sangre periférica. Además, existen diferencias en los criterios para evaluar la respuesta a los ITK, y los abordajes longitudinales son escasos⁽⁸⁾. Las citoquinas son mediadores muy importantes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria y, hasta donde tenemos conocimiento, no hay trabajos previos que focalicen un estudio de expresión génica de citoquinas sobre la misma muestra utilizada para el monitoreo del %BCR-ABL1. Por lo tanto, nuestro objetivo fue describir la dinámica de la expresión de los genes *TNF*, *IFNG* e *IL6* en pacientes con LMC de acuerdo a la respuesta molecular al imatinib.

Materiales y métodos

Se analizó un total de 161 muestras de sangre periférica de 92 pacientes con LMC (34 pacientes con múltiples muestras para seguimiento), las cuales

fueron clasificadas de acuerdo a la respuesta molecular específica para el tiempo de tratamiento con imatinib (a una dosis de 400 mg) según los criterios de Baccarani y col, 2015⁽¹⁾ (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características de los pacientes con LMC de acuerdo a la respuesta molecular alcanzada en cada tiempo específico de tratamiento con imatinib.

	Dx (n=23)	3 meses (n=41)		6 meses (n=42)		12 meses (n=26)		≥4 años DMR (n=29)	CN (n=26)
BCR-ABL1 %	-	≤10	>10	<1	≥1	≤0,1	>0,1	≤0,01	-
Muestras n	23	29	12	22	20	16	10	29	26
Edad, años Mediana (rango)	43 (13-80)	52 (13-74)	45 (18-89)	51 (14-74)	47 (19-71)	51 (27-75)	60 (37-81)	59 (26-86)	32 (25-56)
Género M/F	6/12	13/12	6/5	12/8	8/9	9/7	5/5	13/16	9/17

Dx: al diagnóstico; **DMR (deep molecular response):** respuesta molecular profunda; **CN:** controles normales; **M/F:** masculino/femenino.

Además, se analizaron 26 muestras de sangre periférica de individuos sanos como población control. El presente trabajo cuenta con la aprobación de los Comités de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina.

Una alícuota de la muestra de ARN utilizada para monitorear el %*BCR-ABL1* se retro-transcribe mediante un procedimiento estándar a ADN copia. La

expresión de los genes *TNF*, *IFNG* e *IL6* es cuantificada mediante PCR en tiempo real utilizando *SYBR Green PCR Select Master Mix* (Applied Biosystems) en un ciclador *Rotor-Gene Q* (Qiagen). La cuantificación de los genes de las citoquinas es relativa al gen *GAPDH* y se estima aplicando el método comparativo ΔC_t . Los cebadores diseñados para el presente trabajo se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Cebadores utilizados para la cuantificación de las citoquinas mediante PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Secuencia de referencia del ARNm	Tamaño producto de PCR
TNF	Fw: GCCTCTTCTCCTTCCTGATCG Rv: CAGCTTGAGGGTTTGCTACA	NM_000594.3	195 pb
IFNG	Fw: GACCAGAGCATCCAAAAGAGTG Rv: TGCAGGCAGGACAACCATTA	NM_000619.2	263 pb
IL6	Fw: TTCGGTACATCCTCGACGGC Rv: TCACCAGGCAAGTCTCCTCA	NM_000600.4	171 pb
GAPDH	Fw: ATCACCATCTTCCAGGAGCGA Rv: GGTTACACCCATGACGAAC	NM_002046.5	190 pb

Fw: forward, **Rv:** reverse, **pb:** pares de bases.

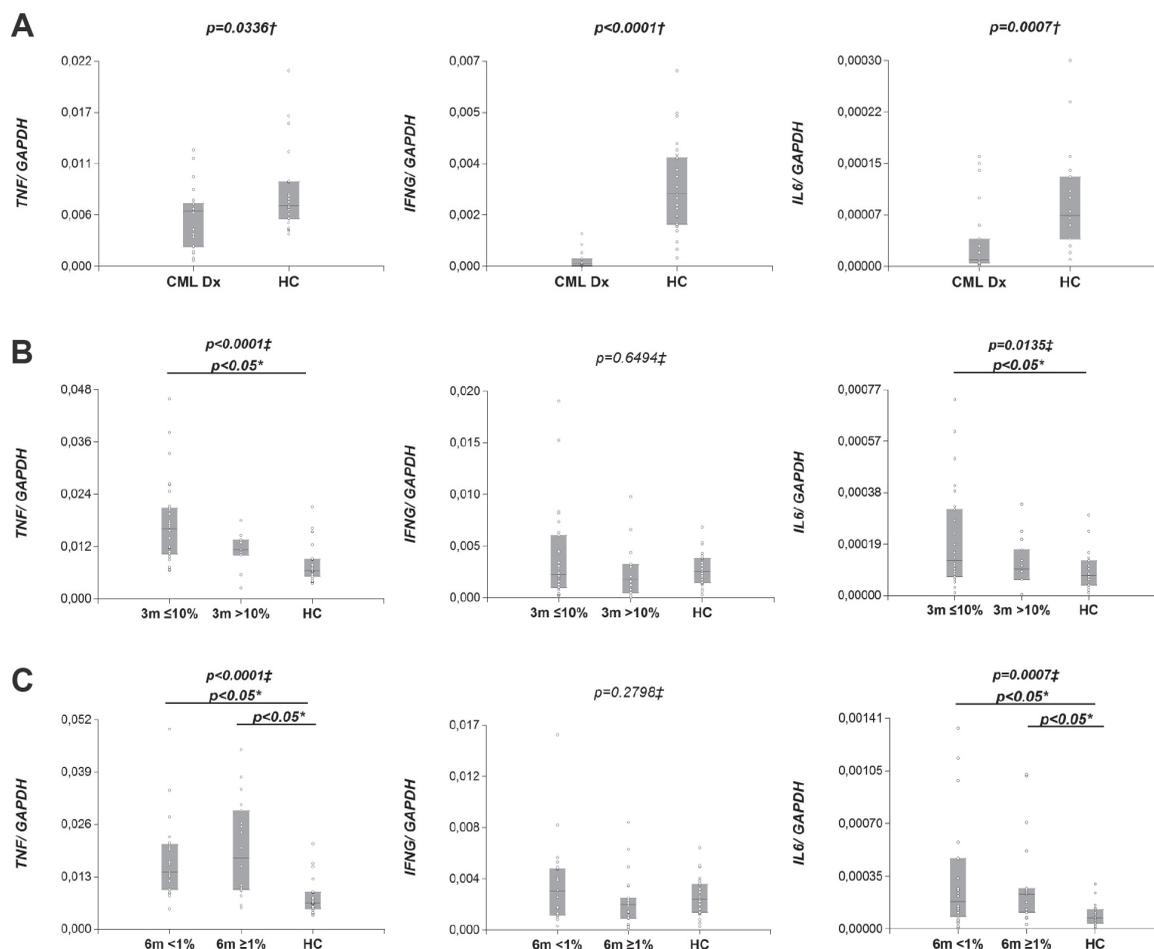
El análisis estadístico se realizó utilizando el programa InfoStat versión 2017 (Universidad de Córdoba, Argentina). Los test Mann-Whitney U/ Kruskal-Wallis fueron aplicados para evaluar diferencias entre muestras independientes y el test Wilcoxon entre muestras pareadas. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El gráfico de *Heatmap* fue obtenido utilizando el paquete R versión 3.4.1.

Resultados

Los pacientes con LMC al diagnóstico presentaron niveles génicos de *TNF*, *IFNG* e *IL6* significativamente disminuidos en comparación con los niveles de la población control ($p = 0,0336$, $p < 0,0001$ and $p = 0,0007$; respectivamente) (Figura 1A). Al evaluar los pacientes bajo tratamiento con imatinib, aquéllos que lograron una respuesta molecular temprana (EMR: *early molecular response*; $BCR-ABL1 \leq 10\%$ a los 3 meses) aumentaron significativamente los niveles génicos de *TNF* e *IL6* con respecto a los niveles de la población control (Figura 1B).

El análisis a los 6 meses mostró un aumento de la expresión de los genes *TNF* e *IL6* tanto en los pacientes respondedores ($BCR-ABL1 < 1\%$) como en los no respondedores ($\geq 1\%$) (Figura 1C). Mientras que, a los 12 meses, este aumento sólo se observó para *TNF* en los pacientes respondedores ($BCR-ABL1 \leq 0,1\%$) (Figura 1D). Los niveles génicos de estas citoquinas se restauraron a niveles normales en pacientes con respuesta molecular profunda ($BCR-ABL1 \leq 0,01\%$) sostenida por, al menos, 4 años (Figura 1E).

De acuerdo con el perfil de expresión génica de las citoquinas el análisis del gráfico *Heatmap* muestra un dendrograma que clasifica 3 conglomerados principales: un primer conglomerado que individualiza pacientes al diagnóstico con expresión disminuida; un conglomerado opuesto con altos niveles de expresión que incluye la mayoría de los pacientes con respuestas óptimas según el tiempo de tratamiento, y un conglomerado central compuesto por pacientes que no lograron una respuesta apropiada de acuerdo a los criterios establecidos (Figura 1F).



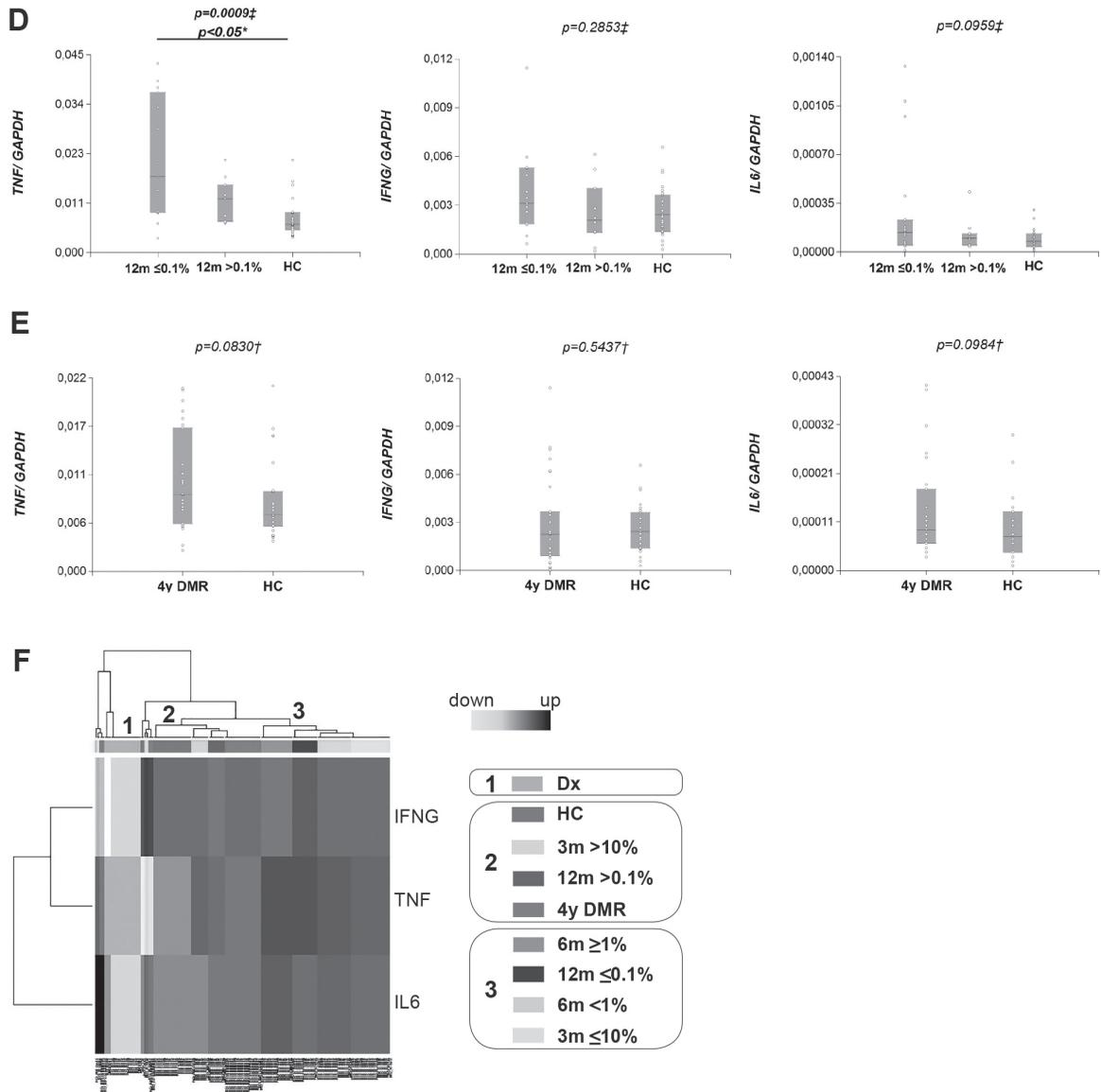


Figura 1. Niveles de expresión génica de las citoquinas TNF, IFNG e IL6 en pacientes con LMC al diagnóstico y bajo tratamiento con imatinib en comparación con controles normales. (A) Pacientes al diagnóstico. Pacientes que logran o no la respuesta óptima en diferentes tiempo del tratamiento: (B) 3 meses, (C) 6 meses y (D) 12 meses. (E) Pacientes con respuesta molecular profunda sostenida durante, al menos, 4 años. (F) Gráfico Heatmap mostrando un dendograma que clasifica tres conglomerados principales de acuerdo al perfil de expresión génica. † Test Mann-Whitney U, ‡ test Kruskal-Wallis y * comparaciones múltiples del test Kruskal-Wallis. Los diagramas de caja especifican el rango inter-cuartílico y las líneas indican las medianas. Dx: al diagnóstico; HC (healthy controls): controles normales; DMR (deep molecular response): respuesta molecular profunda.

Por otro lado, una subpoblación de pacientes con seguimiento fue analizada a fin de caracterizar la dinámica de la expresión génica de estas citoquinas en relación a los niveles del transcrito *BCR-ABL1*, en pacientes respondedores y no respondedores. En este estudio longitudinal se observó que la expresión génica de las tres citoquinas está disminuida

en pacientes al diagnóstico, con niveles de transcrito *BCR-ABL1* altos; mientras que un aumento en los niveles génicos de las citoquinas fue observado luego de iniciar el tratamiento con imatinib, con perfiles diferentes entre respondedores y no respondedores (Figura 2A). Cabe destacar, que fue detectado un incremento significativo de 3 veces en los niveles

de *TNF* ($p=0,0444$) y de 13 veces en los niveles de *IL6* ($p=0,0038$) entre el diagnóstico y los 3 meses bajo terapia con imatinib en aquellos pacientes que lograron una EMR. Mientras que el incremento de

IFNG fue significativo a los 3 meses tanto en los respondedores (17 veces; $p=0,0018$) como en los no respondedores (11 veces; $p=0,0404$) (**Figura 2B**).

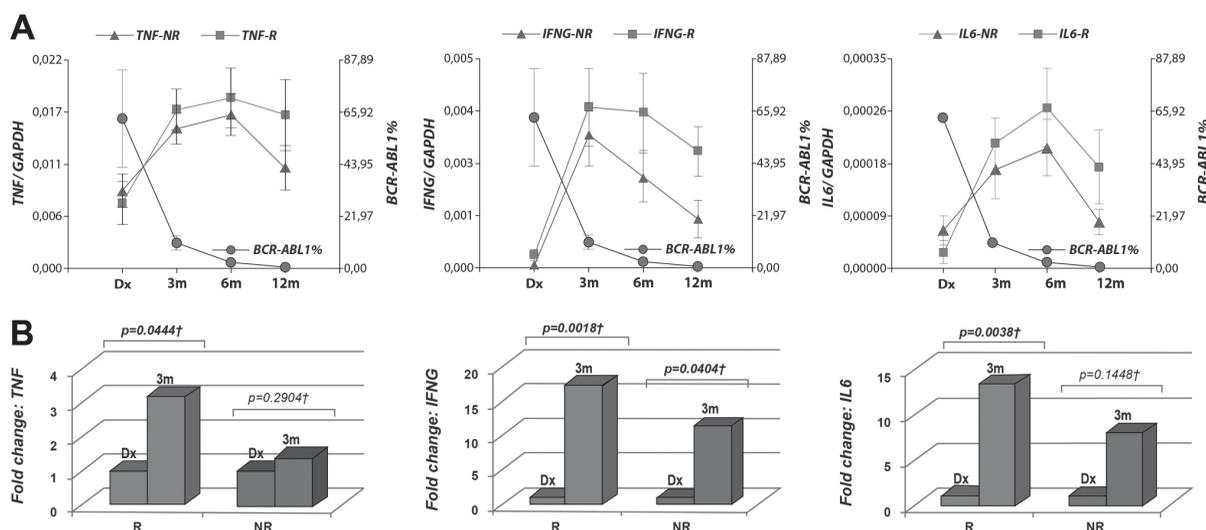


Figura 2. Dinámica de la expresión génica de *TNF*, *IFNG* e *IL6* en una subpoblación de pacientes con LMC dividida en dos grupos de acuerdo a la respuesta molecular al imatinib. (A) Análisis longitudinal que describe la dinámica de la expresión génica de las citoquinas frente al nivel de BCR-ABL1 durante el primer año de tratamiento. Los gráficos de perfiles multivariados indican la media \pm error estándar para cada punto de tiempo. (B) Cambio en los niveles de expresión entre los pacientes al momento del diagnóstico y luego de 3 meses de tratamiento (R: n=8 y NR: n=4). † Test de Wilcoxon para muestras pareadas. Dx: al diagnóstico; R: respondedores; NR: no respondedores.

Discusión

La alteración en los niveles de citoquinas y la disfuncionalidad de las células efectoras contribuyen a una limitación en la respuesta inmune anti-LMC en el momento del diagnóstico^(3,5,6). En nuestro trabajo la disminución de los niveles génicos de *TNF*, *IFNG* e *IL6* en los pacientes al diagnóstico es consistente con un período de inmunosupresión inicial pre terapia con imatinib. Nuestros resultados concuerdan con hallazgos previos, en los cuales fue observada una fuerte supresión de células CD3+ que producen TNF- α e INF- γ en muestras de sangre de pacientes con diagnóstico reciente⁽⁹⁾. Además, varios estudios han demostrado que las proporciones de células NK se encuentran disminuidas y que los linfocitos T presentan alteraciones funcionales, las cuales incluyen disminución de la expresión de la cadena TCR ζ , de la actividad citotóxica y de la producción de citoquinas Th1, especialmente TNF- α e INF- γ ⁽⁸⁾. Además del efecto directo de los ITK sobre BCR-ABL1, esta terapia también podría influir en la inmunidad anti-tumoral^(3,5-7). Aunque varios estudios

sugieren una restauración inmune en pacientes con LMC tratados con ITK, el nivel de reactivación inmune de acuerdo a la respuesta a la terapia no ha sido bien documentado. Chen y col, 2015, observaron una recuperación en las frecuencias de las células Th1, Th17 y Th22 en los pacientes tratados con imatinib. Sin embargo, no especifican ni el tiempo ni la respuesta alcanzada⁽¹⁰⁾. Por otro lado, la remisión hematológica se asoció con un aumento significativo de células CD3+ que producen citoquinas pro-inflamatorias Th1⁽⁹⁾ y esta respuesta de células T se mantiene mientras continúe la remisión⁽⁷⁾. Además, los pacientes con una respuesta citogenética completa tienden a presentar una reactividad mayor de las células NK⁽¹¹⁾. Nuestros resultados evidencian una dinámica de expresión génica diferente de acuerdo a la respuesta molecular alcanzada en pacientes tratados con imatinib, principalmente para los genes *TNF* and *IL6*. La citoquina IL-6 juega varios roles modulando la actividad de células tumorales e inmunes, pero

no está claro cómo controla la respuesta inmune del huésped en pacientes con cáncer. IL-6 es producida por diferentes tipos de células y promueve una respuesta Th17 anti-tumoral en el contexto de TGF- β 1^(10,12), cuya respuesta se amplifica mediante una interacción sinérgica con TNF- α ⁽¹²⁾, lo cual apoya los resultados obtenidos.

Los niveles periféricos de expresión génica de citoquinas no reflejarían el microambiente tumoral, y los cambios en los niveles de ARN mensajero y proteína podrían no correlacionar en forma completa debido a diferentes mecanismos involucrados en la regulación de la transcripción y la traducción. Sin embargo, la dinámica de la expresión génica de *TNF*, *IFNG* e *IL6* contribuiría en la caracterización de una respuesta inmune anti-LMC a nivel sistémico de acuerdo a la respuesta molecular al imatinib, diferenciando pacientes que responden de los que no. En conclusión, nuestros resultados son consistentes con un periodo de inmunosupresión al diagnóstico y con un efecto estimulador al iniciar imatinib, sobre todo en pacientes respondedores.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran que no poseen conflictos de interés.

Bibliografía

- Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol.* 2015; 94:S2141-147.
- Fei F, Yu Y, Schmitt A y col. Dasatinib inhibits the proliferation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Br J Haematol.* 2009; 144:195-205.
- Giallongo C, Parrinello N, Tibullo D y col. Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) are increased and exert immunosuppressive activity together with polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in chronic myeloid leukemia patients. *PLoS One.* 2014; 9:e101848.
- Zitvogel L, Rusakiewicz S, Routy B, Ayyoub M, Kroemer G. Immunological off-target effects of imatinib. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13:431-446.
- Christiansson L, Söderlund S, Mangsbo S y col. The tyrosine kinase inhibitors imatinib and dasatinib reduce myeloid suppressor cells and release effector lymphocyte responses. *Mol Cancer Ther.* 2015; 14:1181-1191.
- Hughes A, Clarson J, Tang C y col. CML patients with deep molecular responses to TKI have restored immune effectors and decreased PD-1 and immune suppressors. *Blood.* 2017; 129:1166-1176.
- Chen CI, Maecker HT, Lee PP. Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment. *Blood.* 2008; 111:5342-5349.
- Hughes A, Yong ASM. Immune Effector Recovery in Chronic Myeloid Leukemia and Treatment-Free Remission. *Front Immunol.* 2017; 8:469.
- Ptackova P, Petrackova M, Hindos M y col. Intracellular Cytokines Produced by Stimulated CD3+ Cells from Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Acta Haematol.* 2017; 137:148-157.
- Chen P, Wang M, Li D y col. The alteration and clinical significance of Th22/Th17/Th1 cells in patients with chronic myeloid leukemia. *J Immunol Res.* 2015; 2015:ID416123.
- Hayashi Y, Nakamae H, Katayama T y col. Different immunoprofiles in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib, nilotinib or dasatinib. *Leuk Lymphoma.* 2012; 53:1084-1089.
- Asadzadeh Z, Mohammadi H, Safarzadeh E y col. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell Immunol.* 2017; 322:15-25.