

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Medicina

Instituto de Medicina Molecular (IMMPA) UAH/CSIC



**CARACTERIZACIÓN DEL COMPARTIMENTO NO TUMORAL
DEL SISTEMA INMUNITARIO EN PACIENTES CON LLC-B Y SU
RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.**

TESIS DOCTORAL

MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ LUENGO

Alcalá de Henares, 2009

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Medicina

Instituto de Medicina Molecular (IMMPA) UAH/CSIC



**CARACTERIZACIÓN DEL COMPARTIMENTO NO TUMORAL
DEL SISTEMA INMUNITARIO EN PACIENTES CON LLC-B Y SU
RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.**

TESIS DOCTORAL

Miguel Ángel Sánchez Luengo

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto,
Catedrático de Medicina,
Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá.

Alfredo Prieto Martín,
Profesor Contratado Doctor,
Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá.

Jorge Monserrat Sanz,
Profesor Ayudante Doctor,
Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá.

A mis padres y Ana M^a.

AGRADECIMIENTOS

El mundo de la investigación se asemeja a un gran y misterioso océano donde abundan numerosos peligros y en cuyas aguas es fácil naufragar. Yo no lo hice (y eso que mi barco zozobro múltiples veces) y fue debido a que en mi larga y tortuosa travesía por ese océano estuve siempre con los mejores compañeros de viaje que nadie puede soñar nunca.

En primer lugar dar las gracias al director de departamento, Dr. Melchor Álvarez de Mon-Soto, que dirige con gran maestría numerosos barcos en diversos y turbulentos mares. Mi más sincero agradecimiento por la confianza mostrada en mi pequeña embarcación.

Dar las gracias a la Dra. Raquel de Paz del Servicio de Hematología del Hospital Universitario “La Paz” (Madrid) y a la Dra. Isabel Sanroman del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Guadalajara (Guadalajara) por su generosa colaboración en la aportación de las muestras de los pacientes.

Al Dr. Alfredo Prieto, apostaría a señalar como uno de los grandes investigadores que existen por su ingenio y sobre todo por ser una gran persona. Gracias por dejar enrolarme en este barco bajo tus ordenes y por mostrarme grandes valores tanto a nivel científico como personal.

También quiero dar las gracias al Dr. Eduardo Reyes y al Dr. Jorge Moserrat. Al primero de ellos mi enorme gratitud por sus colaboraciones fugaces pero enormemente instructivas y enriquecedoras, todo un ejemplo de eficacia en el trabajo. Al segundo agradecerle su colaboración desinteresada que ha contribuido en gran medida a la llegada a buen puerto de este trabajo.

Quisiera también mencionar a la primera persona que me animo a bañarme por primera vez en las aguas de la investigación, la Dra. M^a José Toro Nozal que me enseñó muchas cosas, entre ellas que no fuera tan pesimista con los resultados.

Ahora que ya estoy a punto de llegar al final de mi travesía no puedo dejar de pensar en la persona que estuvo a mi lado al inicio de este viaje, Paz Prieto, compañera pero sobre todo gran amiga, con una capacidad de trabajo inconmensurable, excelente persona y todo un ejemplo a seguir. Muchas gracias Paz por todo lo que me has enseñado y ser la

luz en mis oscuros comienzos. Ahora que te encuentras en lejanos mares desearte todo lo mejor, seguro que llegarás a buen puerto.

En este largo viaje han sido numerosos los compañeros que estuvieron a mi lado, buscando puertos comunes, ayudándome a no naufragar, animándome, enseñándome, y en muchos casos remando hombro con hombro, a todos ellos muchas gracias.

Gracias a ese gran compañero pero sobre todo gran amigo que es Martín Villaroel “Martinator”, que estuvo conmigo en los buenos pero sobre todo en los malos momentos, que no dejó nunca de animarme, que era capaz de dejar su trabajo para ayudarme en el mío, que no dejó que anduviera sólo en ningún momento de mi travesía y siempre que se complicaban las cosas era el primero en presentarse para remar juntos. Siempre te estaré agradecido por todo amigo.

A la Dra. Leticia Muñoz, amiga por encima de todo, que también estuvo a mi lado en los peores momentos, sin cuyo ánimo y apoyo hubiera sido difícil que terminara este viaje. Gracias por mostrar siempre esa sonrisa que transmite serenidad y que hace que en los días más nublados uno pueda llegar a ver el sol.

Al Dr. David Díaz por enseñarme la apoptosis y otras facetas de la citometría, con el que compartí buenos momentos y me apoyó también en los malos, y que colaboró en gran medida a que este trabajo vea la luz. Gracias por todo amigo.

A María Úbeda excelente persona, con grandes principios, con una capacidad de trabajo envidiable, en la cual también encontré un gran apoyo en los malos momentos y que considero además de compañera una gran amiga. Gracias Mary por ser mi amiga.

A Hugo Barcenilla, excelente compañero, con el que no sólo compartí trabajo sino divertidos momentos. Gracias por hacer que el trabajo fuera un poco más divertido.

Al resto de navegantes en estas aguas turbulentas. A los chicos Cervantes; Lucho y Julio (“Los maestros”) y Leo que nos aportaron otro punto de vista científico y también cultural. Gracias chicos por ser como sois.

A todos aquellos con los que compartí muchas horas en el laboratorio y aunque nuestro trabajo no era el mismo sentía que podía pedirles ayuda en cualquier momento; Esther, Margaret y Mariajo. Muchas gracias por todo chicas, en especial a Mariajo que considero también como amiga.

Especialmente quiero dar las gracias a Ana B. Mallo, cuyo apoyo fue crucial en los últimos momentos de mi viaje, sobre todo por las regañinas que me abrían los ojos cuando más lo necesitaba y por confiar en mí cuando ni siquiera yo era capaz de hacerlo. Gracias Ana por ser mi amiga

También quiero agradecer su apoyo a dos de las personas con más bondad que he conocido, la Dra. Inés Rodríguez y Sonia Mur. En especial agradecer a Sonia, no sólo su apoyo en los malos momentos sino también su enorme esfuerzo y trabajo sin el cual parte de esta tesis estaría incompleta.

No quisiera dejar de recordar en estos momentos aquellos viajeros con los que compartí mi travesía en estas aguas y que bien llegaron al final de su viaje o tomaron otras rutas diferentes. Gracias a la Dra. Esperanza Perucha que me ayudo en mis comienzos con grandes indicaciones para no perderme nunca. Mención especial merece una luchadora nata e investigadora impresionante como es la Dra. Elisa D'Angelo que nos enseñó que todo es posible con esfuerzo y tesón, muchas gracias Elisa. Gracias a esos maravillosos compañeros que fueron Guille, Mónica, Cristina, Verónica y Silvia, que tomaron otras rutas y para los que les deseo toda la suerte del mundo.

También quisiera dar las gracias al equipo de secretaría cuyo trabajo diario hace que el nuestro sea mucho más eficaz. Gracias a M^a José, Maribel, Laura y Juan. En especial dar las gracias a Juan "Red" al que considero además de compañero un amigo.

Pero no sólo me sentí acompañado en este largo viaje por estas personas sino también tuve el apoyo y la ayuda en todo momento por otras personas con las cuales comparto un viaje más largo y complicado como es el de la vida.

En primer lugar agradecer a mis padres Mateo y Paulina el que con su duro trabajo pudieran darme la formación adecuada para llegar a cumplir mis sueños, y que siempre confiaron en mí. Muchas gracias por todo.

A mis hermanos Javier y José que me apoyaron en todo lo que hice en la vida. Gracias por estar conmigo siempre.

Mención especial tiene Ana M^a con la cual llevo compartido el 50% de mi vida, que siempre me estuvo apoyando y animando y que ha estado sufriendo conmigo y debido a mí muchos pesares para que yo pueda cumplir mi sueño. Muchas gracias Ana, me siento la persona más afortunada del mundo por tenerte a mi lado, nunca hubiera llegado hasta aquí sin ti.

Como no mencionar al grupo de “la tribuna” con los que comparto desde hace mucho tiempo el viaje de la vida; Alberto e Isabel, “Tito” Carlos y Cruz, Carlos y Belén, David y Almudena, Daní y Silvia, Jesús y Ana. A todos vosotros mil gracias por aguantar mis lamentos perpetuos en nuestras reuniones, por apoyarme y animarme a que no bajara nunca los brazos en esto y otras muchas cosas. Espero sigamos remando todos juntos hasta final de nuestros viajes.

Por último y no por ello menos importante, quisiera también dar las gracias a esa pareja maravillosa de amigos que son Oscar y Loli, gracias por vuestra confianza en mi y vuestro apoyo a lo largo de todos estos años.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.	1
INTRODUCCIÓN.	4
1.- Referencias históricas de la LLC-B.	5
2.-Definición de la enfermedad.	5
3.- Aspectos clínicos.	6
3.1.- Etiología.	6
3.2.- Epidemiología.	7
3.3.- Diagnóstico.	8
3.4.- Clínica.	10
3.5.- Estadios.	11
3.5.1.- Clasificación de Binet.	13
3.5.2.- Clasificación de Rai.	14
3.5.3.- Clasificación de Montserrat.	15
3.5.4.- Otras clasificaciones.	15
3.6.- Factores pronósticos.	18
3.6.1.- Linfocitosis o número de linfocitos circulantes (BLC).	19
3.6.2.- Tiempo de duplicación linfocitaria (TDL).	19
3.6.3.- Patrón histológico de médula ósea.	19
3.6.4.- Análisis cromosómico.	20
3.6.5.- Mutación del gen de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVH).	20
3.6.6.- Expresión de CD38.	21
3.6.7.- Expresión de ZAP-70.	21
3.6.8.- Otros factores pronósticos.	23
3.6.9.- Combinación de factores pronósticos.	24
3.7.- Tratamiento.	25
3.7.1.- Quimioterapia.	28
3.7.2.- Inmunoterapia.	30
3.7.3.- Terapia combinada.	32
3.7.4.- Transplante de células hematopoyéticas.	32
3.7.5.- Otras estrategias terapéuticas.	33
4.- Aspectos biológicos de las células B en la LLC-B.	35
4.1.- Clonalidad.	35
4.2.- Inmunofenotipo.	35
4.3.- Viabilidad celular.	38

5.- Alteraciones del sistema inmune en pacientes con LLC-B.	39
OBJETIVOS.	46
MATERIAL Y MÉTODOS.	49
1.- Población objeto de estudio.	50
2.- Obtención de las muestras biológicas.	51
3.- Separación de las células mononucleares de sangre periférica.	51
4.- Recuento y estudio de la viabilidad celular.	52
5.- Estudio inmunofenotípico.	53
5.1.- Marcaje de superficie.	53
5.1.1.- Linfocitos T, B, células NK y TK.	53
5.1.2.- Monocitos.	58
5.1.3.- Células Dendríticas.	59
5.2.- Marcaje intracelular.	61
5.2.1.- Determinación de células FOXP-3.	61
5.2.2.- Determinación de ZAP-70.	63
6.- Estudios funcionales.	64
6.1.- Estudios de la apoptosis en células T.	64
6.2.- Estudio del porcentaje de linfocitos T productores de citocinas.	67
7.- Análisis estadístico de datos.	69
8.- Búsqueda bibliográfica.	70
RESULTADOS.	71
1.- Análisis fenotípico de las células dendríticas (DCs) de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	72
2.- Análisis fenotípico de monocitos de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	73
2.1.- Estudio fenotípico de los monocitos CD14 ⁻ CD16 ^{hi} de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	74
2.2.- Estudio fenotípico de los monocitos CD14 ^{hi} CD16 ⁻ de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	77
2.3.- Estudio fenotípico de los monocitos CD14 ^{low} CD16 ^{hi} de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	80
2.4.- Estudio fenotípico de los monocitos CD14 ^{hi} CD16 ^{low} de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	82
2.5.- Estudio fenotípico de los monocitos CD14 ^{hi} CD16 ^{hi} de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	85

3.- Alteraciones de las principales poblaciones linfocitarias, de células NK y TK de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	88
4.- Análisis fenotípico de linfocitos B de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	91
5.- Estudio fenotípico de los linfocitos T CD4+ de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	93
6.- Estudio fenotípico de los linfocitos T CD8+ de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	99
7.- Alteraciones de las principales subpoblaciones de células NK (CD3-CD56+) de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	104
8.- Alteraciones de la población de células TK (CD3+CD56+) de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	107
9.- Estudio de la apoptosis de linfocitos T en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	108
9.1.- Estudio de la apoptosis en linfocitos T CD4+.	108
9.2.- Estudio de la apoptosis en linfocitos T CD8+.	115
9.3.- Estudio de la correlación entre la apoptosis de linfocitos T y la expresión de CD45RO y CD95.	121
10.- Estudio del porcentaje de células productoras de citocinas en los diferentes estados de activación de los linfocitos T en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.	123
10.1.- Estudio del porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de citocinas.	123
10.2.- Estudio del porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de citocinas.	125
DISCUSIÓN.	129
CONCLUSIONES.	154
BIBLIOGRAFÍA.	157
SUMMARY.	179

ABREVIATURAS

AcMo: Anticuerpos monoclonales.

AI: Índice de apoptosis.

APC: Aloficocianina.

APCs: Células presentadoras de antígenos.

BCL: Número de linfocitos circulantes.

BCR: Receptor de células B.

BDCA: Antígeno de células dendríticas sanguíneas.

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico.

CD: Antígeno de diferenciación linfocitaria.

CTLA-4: Cytotoxic T- Lymphocyte-associated protein 4.

DCs: Células dendríticas.

EMA: Monoacida de etidio.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FOXP-3: Foxkhead box P-3 (expresado en células T reguladoras).

FSC: Luz dispersada hacia delante.

G6PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

IFN: Interferon.

Ig: Inmunoglobulina.

IgVH: Región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

IL: Interleucina.

IWCLL: International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia.

LDH: Láctico deshidrogenasa.

LLC-B: Leucemia linfática crónica de células B.

mDC: Célula dendrítica mieloide.

MFI: Intensidad media de fluorescencia.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

NCI-WG: National Cancer Institute Working Group.

NK: Natural killer.

PB: Pacific blue.

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica.

PBS: Tampón fosfato salino.

pDC: Célula dendrítica plasmacitoide.

PE: Ficoeritrina.

PercP: Conjugado de la proteína clorofilperidina.

PMA: Acetato de 12-forbol 13-miristato.

PTK: Proteína tirosina quinasa.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa.

SSC: Luz dispersada lateralmente.

Syk: Spleen tyrosine kinase (tirosina quinasa de las células B).

TCR: Receptor de células T.

TDL: Tiempo de duplicación linfocitaria.

TK: Timidina quinasa.

TNF: Factor de necrosis tumoral

TTM: Masa tumoral total.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

ZAP-70: Zeta-associated protein-70.

INTRODUCCIÓN

1. REFERENCIAS HISTÓRICAS DE LA LLC-B.

La enfermedad que hoy conocemos como leucemia fue descrita tanto en sus formas mieloides como linfoides en 1845 por Virchow y Bennet. Posteriormente, en 1889, Ebstein diferenció las formas crónicas y agudas en función del curso clínico de la enfermedad. Las primeras referencias a la leucemia linfática crónica de células B (LLC-B) fueron realizadas por Kundrat, Turk, Symmers y Osler entre los años 1893 y 1918, siendo en 1924 cuando se dio una definición clara de la patología.

En 1966 se publicó una descripción de la LLC-B que incluía criterios diagnósticos, estrategias terapéuticas y supervivencia de los pacientes (Boggs DR, 1966). En este mismo año dentro de la enfermedad se diferenciaron grupos de pacientes que tenían diferentes pronósticos en la evolución de la enfermedad debido al incremento relativo de la cifra de linfocitos en sangre periférica (Galton D, 1966). De esta manera se logró por primera vez clasificar a los pacientes según el grado de desarrollo de la enfermedad y su curso evolutivo.

Pero fue a partir de la década de los 80 y gracias a los avances logrados a nivel de la biología celular y molecular, cuando se ha obtenido una gran información acerca de la biología de las células B en la leucemia. Esto nos ha llevado no sólo a una mejor clasificación de los pacientes sino a una mayor comprensión de los mecanismos que están implicados en la enfermedad y en las alteraciones del sistema inmune que la acompañan.

2. DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD.

La LLC-B es una enfermedad linfoproliferativa crónica, indolente, no curable, caracterizada por la acumulación progresiva de linfocitos B monoclonales de aspecto maduro pero funcionalmente incompetentes (Kipps TJ, 2002). De acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se considera una enfermedad idéntica, aunque en diferente estadio, al linfoma difuso de células B pequeñas.

3. ASPECTOS CLÍNICOS.

3.1. Etiología.

Los factores desencadenantes de la enfermedad son todavía desconocidos. Se ha intentado relacionar con algunos factores ambientales y hereditarios sin que se observe una relación clara (Preston DL, 1994; Yuille MR, 2000). También se ha sugerido una tendencia familiar en la LLC-B pero sin que existan datos concluyentes.

No obstante aproximadamente entre el 40-70% de los pacientes con LLC-B presentan anomalías citogenéticas. Entre estas anomalías, las más frecuentes son la trisomía 12 que se ha identificado en un 10-20% de los pacientes con LLC-B (Jurlander J, 1998) y que además ha sido asociada con una morfología atípica de las células leucémicas, con un estado avanzado de la enfermedad y un peor pronóstico, sin embargo se cree que es secundaria a la enfermedad (Montserrat E, 1997; Falini B, 1997).

Otra de las anomalías más frecuente es la delección del cromosoma 13 (del 13q12-14, 13q14-22) distal al gen del retinoblastoma tipo 1 y que afectan a un 7% de los pacientes (Kay NE, 1995; Montserrat E, 1997). Las delecciones del cromosoma 6 (del 6q21 y del 6q23) afectan a un 7% de los pacientes con leucemia, los cuales poseen una mayor masa tumoral pero sin embargo tienen una supervivencia y una respuesta al tratamiento similar a la del resto de los pacientes (Stilgenbauer S, 1999). Las delecciones del cromosoma 11 (11q22-23) están presentes en el 20% de los pacientes y se asocian con estadios clínicos más avanzados, adenomegalias marcadas, niveles de hemoglobina más bajos, menor tiempo libre de tratamiento y una menor supervivencia de los pacientes (Dohner H, 1997; Zhu Y, 1999). En menor medida también se observan alteraciones en el cromosoma 14 (14q+), esta anomalía afecta a los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

En un porcentaje de los pacientes que oscila entre el 14 y el 40% se observan cambios en el cariotipo a lo largo de la enfermedad. Esto, unido a que se observa una asociación de varias de estas anomalías cromosómicas con estadios avanzados de la enfermedad, peor pronóstico y en definitiva con una menor supervivencia, indica que existe una evolución del cariotipo a lo largo de la enfermedad, detectándose el cambio más

frecuente en la delección del cromosoma 11 (Fegan C, 1995; Kay NE, 1995; Tabertero MD, 1995; Montserrat E, 1997). En relación al origen de la enfermedad se ha estudiado el papel que pueden desempeñar algunos oncogenes sin lograr resultados positivos al respecto. Sin embargo la expresión de algunos parece estar relacionada con su desarrollo. Este es el caso de los genes de las proteínas *bcl-1* y *bcl-2* que están sobreexpresadas en un 5-15% de los pacientes con leucemia y en algunos casos de manera excepcional *bcl-3* (Nilsson K, 1992; Montserrat E, 1997).

Entre un 10% y 15% de los casos se han descrito mutaciones del gen *p53* (localizado en el brazo corto del cromosoma 17) las cuales se asocian a progresión de la enfermedad, resistencia a la terapia y mal pronóstico (Kay NE, 1995; Hamblin T, 1997). También se han observado alteraciones en los genes que codifican para proteínas tirosina kinasa (PTK) como *lcr* y *c-fgr* (Rozman C, 1995). En un 10% de los pacientes existen delecciones de los genes que codifican para proteínas inhibitorias de ciclinas como p15 y p16, y hasta en un 85% de los casos existe la sobreexpresión de la ciclina D2 (Delmer A, 1995; Montserrat E, 1997).

Por último y siempre relacionados con la progresión de la enfermedad se ha demostrado la sobreexpresión de los protooncogenes *c-mos*, *c-myc* y en algunos casos de *a-myb* (Montserrat E, 1997).

3.2. Epidemiología.

La leucemia linfática crónica es la forma más frecuente de leucemia en los países occidentales, teniendo muy baja incidencia en los países asiáticos. Esto podría deberse a una cierta base genética la cual todavía no se ha confirmado tal y como se indicó en el apartado anterior.

La incidencia de la enfermedad está estrechamente relacionada con la edad, aumentando con la misma. Así mientras que en personas de más de 50 años la incidencia es de 5 casos por 100.000 personas y año, en aquellas personas de más de 80 años ésta es de 30 por 100.000. La edad media de diagnóstico es de 70 años pero no son excepcionales los pacientes de 30 y 40 años, dándose en un tercio de los pacientes con menos de 60 años (Montserrat E, 1991; Hernández JA, 1995).

Por otro lado parece existir una relación con el sexo del individuo ya que existe un mayor número de hombres que de mujeres afectadas, en concreto la enfermedad predomina en varones en proporción de 2:1.

3.3. Diagnóstico.

El elemento esencial para el diagnóstico de la leucemia linfática crónica es el determinación en sangre periférica de una linfocitosis absoluta ($\geq 5.000/\mu\text{l}$) en la que predominan linfocitos de pequeño tamaño, con escaso citoplasma y núcleos redondos con cromatina condensada y nucléolos evidentes.

Normalmente, la proporción de linfocitos atípicos es $<10\%$. A pesar de que existen casos de leucemia linfática crónica atípicos desde el punto de vista morfológico e inmunofenotípico, el diagnóstico no debiera de aceptarse sin haber descartado previamente otros síndromes linfoproliferativos crónicos con expresión leucémica. El grupo de trabajo The FAB Cooperative Group (Bennet JM, 1989) establece el término LLC de tipo mixto cuando $>10\%$ de células en sangre son grandes (o prolinfocitos), pero esto no es compartido por todos los autores (Rai KR, 2000a).

Por tanto en el diagnóstico es importante diferenciar la enfermedad de otros procesos infecciosos que cursan con una linfocitosis reactiva y de varias enfermedades linfoproliferativas como son: el linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma linfoplasmocítico, linfoma del manto, linfoma esplénico de la zona marginal, leucemia de células peludas, leucemia de linfocitos granulares grandes, leucemia de células T del adulto, leucemia prolinfocítica y leucemia linfática crónica de células T (Rai KR, 2000). Este diagnóstico diferencial se puede realizar en base al inmunofenotipo característico de la LLC-B de acuerdo con los marcadores propuestos por los diferentes grupos de trabajo. Este inmunofenotipo debe incluir junto a los marcadores típicos (CD5, CD19, CD20, CD23 y CD24) el marcador CD79 y el marcador FMC7 que en el caso de la LLC-B tienen una expresión débil o ausente para el primero y negativa para el segundo, pudiendo así diferenciarse del linfoma del manto, linfoma esplénico de la zona marginal y la leucemia de células peludas que se caracterizan por ser CD23 negativo, CD79 positivo y FMC7 positivo.

Diferentes grupos de trabajo han establecido los criterios para el diagnóstico de la LLC-B. Así los requerimientos establecidos por el International Workshop on Chronic Lymphocytic Leucemia (IWCLL, 1989) son los siguientes:

- Linfocitosis sostenida durante al menos 4 meses ($\geq 5.000/\mu\text{l}$), cifra está que debe llegar a $10.000/\mu\text{l}$ si no puede realizarse estudio fenotípico.
- Aspirados de médula ósea que indiquen una infiltración linfocitaria mayor del 30% o biopsia medular que muestre un claro patrón de infiltración linfocitaria. En este caso la afectación de la médula ósea excluye cualquier necesidad de repetir el recuento linfocitario de sangre periférica ya que la médula no sufre alteraciones en los procesos reactivos infecciosos que pueden equivocar el diagnóstico por recuento.
- Inmunofenotipo de los linfocitos de sangre periférica mostrando positividad para los antígenos asociados a las células B CD5, CD19, CD20, CD23 y CD24. Bajos niveles de inmunoglobulinas de superficie y presencia de una única cadena ligera ya sea kappa (κ) o lambda (λ).

Otro grupo de trabajo, The National Cancer Institute Working Group (NCI-WG) (Cheson BD, 1988; Cheson BD, 1996) propone los mismos criterios incluyendo en el inmunofenotipo la positividad para el antígeno asociado a las células B CD21 y leve positividad para el antígeno CD20. Este grupo de trabajo no considera indispensable la demostración de la infiltración de la médula ósea para el diagnóstico de la leucemia linfática crónica, no obstante indica que es recomendable el aspirado y biopsia de médula ósea si el paciente va a ser incluido en ensayos clínicos. Sin embargo, el grado de infiltración de la médula ósea proporciona a los clínicos información relevante sobre el pronóstico de la enfermedad por lo que es aconsejable practicar un aspirado y biopsia de la médula ósea en todos los enfermos con leucemia linfática crónica.

Por último señalar que existen algunas alteraciones bioquímicas típicas en los pacientes con LLC-B como son la alta actividad de la enzima 3- y 5-láctico-deshidrogenasa (LDH) y baja actividad de la 1-LDH. Pero en ningún caso sirven por si solas para realizar un diagnóstico de la enfermedad.

3.4. Clínica.

La sintomatología que presenta esta enfermedad es muy variable, desde una situación asintomática donde el diagnóstico se presupone al realizar controles analíticos rutinarios (25% de los casos) hasta aquellos casos donde se presentan síntomas como astenia intensa, pérdida de peso, sudoración preferentemente nocturna, fatiga, fiebre, reducción de la tolerancia al ejercicio y en ocasiones hemorragias (Jarque I, 1991).

El síntoma principal más común en las consultas médicas es la aparición de adenopatías (Rai KR, 2000; Kipps TJ, 2002) las cuales tienen un número, características, tamaño y localización muy variables (principalmente se afectan las áreas inguinal, cervical y axilar), seguido de esplenomegalia y hepatomegalia (Boggs DR, 1966; Binet JL, 1981). También pueden afectarse órganos linfoides extraganglionares como el anillo de Waldeyer y de manera más excepcional otros órganos como la piel (Rai KR, 2000; Kipps TJ, 2002) así como pueden verse afectados el mediastino, retroperitoneo o mesenterio (Kipps TJ, 2002).

En numerosas ocasiones se produce una presentación clínica relacionada con la deficiencia inmunológica que se establece en estos pacientes. Este es el caso de la anemia hemolítica donde se produce un excesivo secuestro de glóbulos rojos por el bazo además de reducirse la producción de glóbulos rojos debido a la infiltración en médula ósea de los linfocitos y su eliminación por anticuerpos autoreactivos (Digiero G, 1991; Mauro FR, 2000). También se puede producir una trombopenia autoinmune debida a una baja producción de las plaquetas, secuestro excesivo en bazo y/o destrucción por anticuerpos autoreactivos (Digiero G, 1991).

La alteración autoinmune más típica es la hipogammaglobulinemia que aparece asociada en un 50% de los pacientes con LLC-B (Digiero G, 1991; Bartik MM, 1998) dándose en este caso una respuesta defectuosa frente a las infecciones y las vacunaciones que incrementa la vulnerabilidad de los pacientes a infecciones

bacterianas, siendo las infecciones la primera causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes de LLC-B (Montserrat E, 1995).

Las principales infecciones en los pacientes de LLC-B son las causadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Bartik MM, 1998; Morrison VA, 1998). El descenso en los niveles de inmunoglobulinas no sólo se debe a la disfunción de las células T y B en estos pacientes sino que también se debe a una disfunción presente en las células B no clonales bien por efecto de la dilución o el microambiente creado por las células neoplásicas.

Por último señalar que en un 10% de los pacientes con LLC-B se observa la aparición de tumores no hematológicos lo cual puede estar relacionado con la deficiencia inmunológica que poseen estos pacientes.

La alteración analítica más común es la linfocitosis, generalmente $>10.000/\mu\text{l}$ y más frecuentemente $>100.000/\mu\text{l}$ aunque como se indicó en el apartado anterior sobre el diagnóstico un número de linfocitos $>5.000/\mu\text{l}$ acompañado de confirmación inmunofenotípica es indicativo de la enfermedad. Las células B leucémicas presentan un aspecto maduro (aunque una minoría pueden ser prolinfocitos) y representan el 50-100% de los leucocitos adquiriendo un aspecto deformado al extender la muestra de sangre en un portaobjetos (“Smudge cells”).

En cuanto a otras alteraciones de laboratorio señalar que la biopsia de médula ósea demuestra un porcentaje de linfocitos $>30\%$ de las células nucleadas (Rai KR, 2000; Kipps TJ, 2002). Por su parte la biopsia ganglionar muestra un patrón de linfoma linfocítico difuso de células pequeñas (Morrison VA, 1998).

Otras anomalías frecuentes de carácter analítico son la anemia, trombopenia, aplasia pura de la serie roja, neutropenia, niveles elevados de IgM, enzima LDH sérica y de beta-2-microglobulina.

3.5. Estadios.

La leucemia linfática crónica es una enfermedad generalmente indolente con un curso de unos 10-20 años. Algunos pacientes tienen una evolución más agresiva y mueren rápidamente en 2-3 años desde el primer diagnóstico pero la mayoría de los pacientes muere en 5-10 años con un inicio indolente y una fase terminal de 1-2 años caracterizada por las complicaciones de la enfermedad o del tratamiento.

La existencia de esa evolución tan variable de la enfermedad con supervivencias que oscilan desde el diagnóstico entre 2 y 20 años, y con una gran diferencia entre un carácter indolente o agresivo de la enfermedad, hace necesario por un lado encontrar un sistema de clasificación de los pacientes por grupos de diferente pronóstico, y por otro lado la de encontrar una serie de factores con carácter pronóstico que nos permitan predecir la evolución de los pacientes.

En consecuencia la clasificación de los pacientes con leucemia linfática crónica es útil no sólo para predecir el pronóstico sino también para estratificar a los pacientes con el fin de comparar e interpretar los resultados clínicos, seleccionando a los pacientes que deben ser tratados y escogiendo el momento más adecuado para hacerlo (Shanafelt TD, 2004).

Con el transcurso del tiempo los pacientes tienden a progresar de estadios tempranos a intermedios y avanzados, sin embargo, si el tratamiento aplicado logra una remisión parcial o completa y el paciente pasa de una categoría más avanzada a otra categoría más favorable, el pronóstico mejora y se suele ajustar a la última categoría alcanzada.

Indicar que la leucemia linfática crónica no tiene un sistema de clasificación estándar. La mayoría de las clasificaciones por grupos de pronóstico se han basado en la idea generalizada de que la acumulación de las células tumorales en la enfermedad es gradual y progresiva comenzando en la médula ósea y sangre, afectando de manera progresiva a los ganglios, hígado y bazo llegando en última instancia a comprometer la función de la médula ósea. Basándose en este concepto las clasificaciones más utilizadas son la clasificación de Rai y la clasificación de Binet, si bien existen otros sistemas de clasificación que suelen ser más complejos y de difícil aplicación diaria. En este sentido el grupo de trabajo International Workshop on Chronic Lymphocytic Leucemia (IWCLL, 1989) indicó que la manera correcta de clasificar y discriminar grupos de pacientes con diferente supervivencia es la integración en un mismo esquema de la clasificación de Rai y Binet. De esta manera cada estadio de Binet es subclasificado de acuerdo al estadio de Rai sobre la diferente evolución de la enfermedad y de su pronóstico (A 0, A I, A II; B I, B II; C III, C IV).

3.5.1. Clasificación de Binet.

Es el sistema de clasificación utilizado mayoritariamente en Europa. El primer sistema de clasificación fue establecido en 1977 (Binet JL, 1977), en dicho sistema se establecían cinco estadios independientes atendiendo al grado de linfocitosis periférica y medular, la presencia de nódulos linfáticos palpables, evidencia de esplenomegalia y/o hepatomegalia y la presencia de anemia. Posteriormente en 1981 el mismo Binet (Binet JL, 1981) basándose en un trabajo donde demostró la ausencia de diferencias en la supervivencia de pacientes de varios de los estadios de su sistema de clasificación, modificó éste pasando de cinco estadios a sólo tres.

En esta nueva clasificación establecida en 1981, los tres estadios se determinan por el número de áreas linfoides afectadas (unilateral o bilateralmente) como son el área cervical, axilar, inguinal, el bazo y el hígado. Además se tiene en cuenta la presencia o ausencia de anemia y trombopenia. A su vez en esta clasificación se tiene en cuenta la supervivencia de los pacientes la cual correlaciona con el estadio clínico (Tabla 3.5.1.1).

Tabla 3.5.1.1.: Sistema de clasificación de Binet.

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS		SUPERVIVENCIA (media en años)
A	Ausencia de anemia*	< 3 áreas ganglionares aumentadas de tamaño†	Equivalente a la población normal de similar sexo y edad
B	Ausencia de trombocitopenia**	≥3 áreas ganglionares aumentadas de tamaño	7 años
C	Anemia y/o Trombocitopenia	Cualquier número de áreas ganglionares aumentadas de tamaño	2 años

* Valores para la determinación de la anemia:

Ausencia de anemia: valores de hemoglobina $\geq 10\text{g/dl}$.

Presencia de anemia: valores de hemoglobina $< 10\text{g/dl}$.

** Valores para la determinación de la trombocitopenia:

Ausencia de trombocitopenia: número de plaquetas $\geq 100.000/\mu\text{l}$.

Presencia de trombocitopenia: número de plaquetas $< 100.000/\mu\text{l}$.

† Exploración (unilateral o bilateralmente) de cada una de las siguientes áreas ganglionares: cervical, axilar, inguinal; bazo e hígado.

3.5.2. Clasificación de Rai.

Este sistema de clasificación, el más utilizado en EE.UU. fue el primero de los sistemas de estadiaje ampliamente aceptado. Dicho sistema fue descrito en 1975 por Rai (Rai KR, 1975) y englobaba a los pacientes en cinco estadios basándose en la presencia de adenopatías, hepatomegalia y/o esplenomegalia, y se tienen en consideración la cifra de linfocitos en sangre periférica que debe de ser $\geq 15.000/\mu\text{l}$ y un porcentaje de infiltración en médula ósea $> 40\%$.

No obstante, tal como se indicó en el apartado correspondiente al diagnóstico, siguiendo las recomendaciones de los diferentes grupos de trabajo sobre LLC (NCI-WG y IWCLL), los mismos autores recomiendan que estos niveles sean reducidos a un número de linfocitos $\geq 5.000/\mu\text{l}$ en sangre periférica y un porcentaje de infiltración en médula ósea $> 30\%$ (Rai KR, 2000). Debido a que una clasificación con cinco estadios es poco manejable a la hora de realizar ensayos terapéuticos, en 1987 los autores realizaron una revisión del sistema de clasificación (Rai KR, 1987) agrupando los cinco primeros estadios en sólo tres grupos de riesgo atendiendo al grado de supervivencia de los pacientes, quedando una clasificación más simple pero de idéntico valor pronóstico (Tabla 3.5.2.1).

Tabla 3.5.2.1.: Sistema de clasificación de Rai.

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	RIESGO	SUPERVIVENCIA (media en años)
0	Linfocitosis en sangre y médula ósea.*	Bajo	> 12
I	Linfocitosis y adenopatías.	Intermedio	8
II	Linfocitosis y hepatomegalia y/o esplenomegalia. Con o sin adenopatías.	Intermedio	6
III	Linfocitosis y anemia.** Con aumento o no del tamaño de ganglios, bazo e hígado.	Alto	< 2
IV	Linfocitosis y trombocitopenia.† Con aumento o no del tamaño de ganglios, bazo e hígado. Con o sin anemia.	Alto	< 2

* Valores para la determinación de linfocitosis e infiltración en médula ósea:

Número de linfocitos en sangre: $> 15.000/\mu\text{l}$, actualmente se aceptan valores de linfocitos $> 5.000-10.000/\mu\text{l}$. Infiltración linfocitaria en médula ósea: $> 40\%$ de linfocitos, actualmente se aceptan valores de infiltración $> 30\%$.

** Valores para la determinación de anemia: se determina la presencia de anemia en aquellos casos donde se obtengan valores de hemoglobina $< 11\text{g/dl}$ ó un hematocrito $< 33\%$.

† Valores para la determinación de trombocitopenia: se determinara la presencia de trombocitopenia en aquellos casos donde se obtenga un número de plaquetas $< 100.000/\mu\text{l}$.

3.5.3. Clasificación de Montserrat.

Los dos sistemas de clasificación descritos hasta el momento tienen la problemática de agrupar a los pacientes en estadios demasiado amplios donde en ocasiones es difícil determinar la progresión del paciente. Los trabajos del Grupo de Barcelona dirigidos por el Dr. E. Montserrat determinaron la existencia de lo que denominaron LLC-B “smouldering” o quiescente y que permite en el estado inicial de la enfermedad diferenciar a los pacientes que van a tener una estabilidad en el curso de la enfermedad de aquellos en los que el curso de la enfermedad será progresivo (Montserrat E, 1988).

Un paciente con LLC-B se clasificará como LLC-B “smouldering” o quiescente si: pertenece al estadio A de Binet y/o de bajo riesgo de Rai, una cifra de linfocitos en sangre $< 30.000/\mu\text{l}$, los valores de hemoglobina son $\geq 13\text{g/dl}$, el tiempo de duplicación linfocitaria (TDL) es mayor de doce meses y su patrón histológico de médula ósea es no difuso. En este caso estos pacientes se caracterizan por tener una media de supervivencia similar a la población española de igual sexo y edad (Montserrat E, 1993).

3.5.4. Otras clasificaciones.

Tal y como se indicó al comienzo de este apartado, además de los sistemas de clasificación descritos hasta ahora existen otros diferentes que se basan en los mismos criterios (número de linfocitos en sangre, órganos linfoides afectados, valores de hemoglobina,...) o en otros diferentes como pueden ser la morfología de los linfocitos o los valores de LDH. Estas clasificaciones son las siguientes:

➤ Clasificación TTM.

Esta clasificación fue desarrollada en 1981 por Jacksic (Jacksic B, 1981) y se basa en el cálculo de un índice de masa tumoral total (TTM) que ayuda a predecir la supervivencia del paciente. Dicho índice de masa tumoral está definido a través de la fórmula:

$$\text{TTM} = \sqrt{\text{BLC}} + \text{gl} + \Delta\text{b}$$

donde:

BLC = indica el número de linfocitos en sangre por μl .

gl = es el diámetro en cm del mayor ganglio linfático palpable.

b = son los cm del bazo bajo el margen costal izquierdo.

Los pacientes se categorizan en dos grupos: pacientes con un tiempo de supervivencia mayor de 101 meses si el valor de índice TTM < 9 y pacientes con un tiempo de supervivencia menor de 39 meses si el valor del índice TTM > 9 .

➤ Clasificación de Mandelli.

Esta clasificación está basada tanto en los criterios de diagnóstico de la LLC-B (señalados en el apartado 3.3) como en factores que determinan un mal pronóstico (Mandelli F, 1987). Así se diferencian 4 estadios, donde el estadio 0 se define puramente con los criterios diagnósticos de la LLC-B y los estadios I, II, III y IV se definen con los siguientes factores de mal pronóstico: número de linfocitos en sangre $>60.000/\mu\text{l}$, valores de hemoglobina $<11\text{g/dl}$, más de 2 cm de afectación de las áreas linfoides o más de 3 cm de afectación del bazo y/o del hígado.

➤ Clasificación de Lee.

Clasificación desarrollada en 1987 (Lee JS, 1987), que esta basada en los valores de la enzima LDH en combinación con otros factores de riesgo como son: niveles de fosfatasa alcalina en suero por encima de 80 UI/dl, niveles de ácido úrico en suero mayores de 7 mg/dl y tener menos de 60 años.

En esta clasificación los pacientes se agrupan en tres estadios:

- Estadio de bajo riesgo: pacientes que presentan valores elevados de LDH en suero (>325 UI/dl).
- Estadio de riesgo intermedio: pacientes que presentan valores elevados de LDH en suero más alguno de los factores de riesgo indicados.
- Estadio de riesgo alto: pacientes que presentan valores elevados de LDH y dos o más de los factores de riesgo considerados.

➤ Clasificación morfológica.

Esta clasificación no busca categorizar los pacientes sino más bien pretende identificar tres variantes de la enfermedad de acuerdo a la morfología de las células B extraídas de sangre periférica (Orfao A, 1988; Newman RA, 1993). Las variantes de la enfermedad son:

- LLC-B típica: en este caso más del 90% de los linfocitos son pequeños con una elevada relación núcleo/citoplasma, cromatina condensada, nucleolos no visibles y citoplasma ligeramente basófilo.

- LLC-B atípica o de células grandes: suele darse en el 20-30% de los pacientes con LLC-B. Los linfocitos tienen un tamaño mediano o grande, el citoplasma es más grande, basófilo con gránulos azurófilos, núcleo redondeado y la cromatina está menos condensada con nucleolos ocasionalmente visibles.
- LLC-B mixta: se observa una mezcla de linfocitos pequeños o intermedios con algunos prolinfocitos. En este caso la presencia de prolinfocitos en los pacientes es del 11-54%.

3.6. Factores pronósticos.

Los sistemas de clasificación anteriormente descritos solucionan en parte el problema de la predicción del curso de la enfermedad para los pacientes. Tanto los sistemas de clasificación de Rai como de Binet aunque categorizan a los pacientes en estadios que indican mayor o menor riesgo según su supervivencia, están ciertamente limitados a la hora de predecir el curso de la enfermedad, sobre todo en los pacientes con estadios menos avanzados. Esto es resuelto, en parte, por el sistema de clasificación de Montserrat el cual permite precisamente en los estadios menos avanzados diferenciar aquellos pacientes con una mejor o peor evolución en la enfermedad.

Debido a las limitaciones que plantean los sistemas de clasificación a la hora de establecer un pronóstico en la enfermedad se han estudiado numerosos parámetros que permiten separar a los pacientes atendiendo a la estabilidad del curso de la enfermedad. Muchos de estos parámetros están disponibles ya para médicos e investigadores (Chiorazzi N, 2005). El uso de estos parámetros no sólo está encaminado para la clasificación de los pacientes sino también para ayudar en la evaluación de la necesidad terapéutica, selección de la terapia más adecuada y control de la misma. Los parámetros generalmente no guardan relación entre sí y algunos de ellos están pendientes de estudios prospectivos que verifiquen su eficacia en la predicción, por estas razones se debe resaltar la necesidad de combinar varios de estos factores pronósticos. A continuación vemos algunos de estos factores pronósticos.

3.6.1. Linfocitosis o número de linfocitos circulantes (BLC).

El recuento de linfocitos en sangre periférica es una medida exacta de la masa tumoral. Como se ha indicado en apartados anteriores, es un parámetro usado no sólo para el diagnóstico de la enfermedad sino para la mayoría de los sistemas de clasificación establecidos. Su valor pronóstico está ligado a la relación inversa que existe entre el número de linfocitos en sangre periférica y la supervivencia de los pacientes (Rai KR, 1990).

3.6.2. Tiempo de duplicación linfocitaria (TDL).

Este parámetro indica el tiempo necesario para que se duplique el número de linfocitos circulantes en sangre periférica. Se utiliza para el sistema de clasificación de Montserrat. Este parámetro es una medida del aumento relativo de la masa tumoral y puede ser un tiempo real o ser extrapolado poco tiempo después del diagnóstico. Un TDL menor de doce meses es señal de mal pronóstico y se asocia con un curso agresivo de la enfermedad y menor supervivencia. Por el contrario un TDL mayor a doce meses implica un buen pronóstico y se asocia a un mayor tiempo libre de tratamiento (Montserrat E, 1986; Molica S, 1987). Este análisis es retrospectivo y puede retrasar el tratamiento en algunos pacientes con enfermedad agresiva.

3.6.3. Patrón histológico de médula ósea.

La determinación histológica de la médula ósea puede verse asociada a un diferente pronóstico de la enfermedad. Así un patrón difuso de afectación de la médula que implica una invasión masiva con desaparición de la grasa y sustitución de las células hematopoyéticas por los linfocitos de aspecto maduro se asocia a un peor pronóstico con menor supervivencia de los pacientes. Sin embargo los patrones nodular (donde se respeta la estructura medular que permanece normal), intersticial (que consiste en una infiltración más o menos densa respetando la estructura medular pero sustituyendo las células hematopoyéticas), y mixto están asociados a una mayor supervivencia de los pacientes (Rozman C, 1981; Rozman C, 1984).

3.6.4. Análisis cromosómico.

Como se indicó en el apartado referente a la etiología muchas de las alteraciones cromosómicas que se detectan en los pacientes con LLC-B están asociadas a una peor supervivencia y una mala respuesta a los tratamientos. Los pacientes con un cariotipo normal o con delección única en el cromosoma 13q14 presentan un mejor pronóstico asociada a una mayor supervivencia y mejor respuesta al tratamiento. Algunos estudios (Dohner H, 2000) han demostrado que aquellos pacientes que tenían delecciones del 17p y 11q tuvieron una supervivencia más corta que pacientes con delecciones del 13q, trisomía 12 o cariotipo normal. La delección del 17p está relacionada con el pronóstico más desfavorable y su combinación con la delección 11q indica un peor pronóstico incluso en pacientes ZAP-70 negativos (de mejor pronóstico para este factor) (Kröber A, 2006).

Por último señalar la importancia del análisis cromosómico no sólo en el diagnóstico sino también en la evolución de la enfermedad ya que se pueden adquirir nuevas anomalías cromosómicas durante el curso de la enfermedad (evolución clonal) que puede modificar la agresividad de la enfermedad.

3.6.5. Mutación del gen de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgV_H).

Diversos estudios han demostrado que cerca de la mitad de los pacientes con LLC-B presentan mutación somática de las cadenas de inmunoglobulinas. Esto sugiere que en estos pacientes las células leucémicas se originan a partir de una célula B memoria del centro germinal. Anteriormente se pensaba que las células de la LLC-B representaban la transformación de linfocitos naïve del centro germinal que no habían sufrido exposición antigénica previa a su transformación. Posteriormente el estado mutacional de las IgV_H mostró tener un claro significado pronóstico pudiendo separar dos tipos de LLC en función de la presencia o ausencia de mutación somática de los genes de las inmunoglobulinas (Damle RN, 1999; Hamblin TJ, 1999, Rosenwald A, 2001):

- LLC-B de IgV_H no mutado: representa el 30-40% de los casos de LLC-B, y se acompaña de alteraciones cromosómicas, alta expresión de CD38, positividad para ZAP-70, estadios clínicos avanzados, una respuesta desfavorable al tratamiento, un riesgo elevado de recaída post-transplante de células madre (Ritgen M, 2003) y se asocia con una supervivencia media entre 0 y 8 años.
- LLC-B de IgV_H mutado: representa el 60-70% de los pacientes, se acompaña un cariotipo normal o anomalías cromosómicas más favorables, baja expresión de CD38, negatividad para ZAP-70, estadios clínicos iniciales y se asocia a una supervivencia que oscila entre 20 y 25 años.

3.6.6. Expresión de CD38.

La positividad en el inmunofenotipo para CD38 (>30%) se asocia a un peor pronóstico y baja supervivencia. Aunque en principio parecía existir una elevada correlación entre la expresión de CD38 y el estado mutacional de la IgV_H (con similar valor pronóstico en cuanto a supervivencia de los pacientes) (Hamblin TJ, 1999), estudios posteriores demuestran la existencia de una alta tasa de falsos positivos (30%) y falsos negativos (50%) en la expresión de CD38 utilizando el estado mutacional de la IgV_H como método de referencia para el pronóstico, si bien no invalidan la expresión de CD38 como factor pronóstico independiente (Damle RN, 1999; Hamblin TJ, 2002; Ghia P, 2003).

3.6.7. Expresión de ZAP-70.

La proteína ZAP-70 (Zeta-associated protein-70) es una proteína de 70 kDa con actividad tirosina quinasa perteneciente a la familia de las proteínas tirosina quinasas (PTK) citosólicas junto a la proteína de 72 kDa Syk (Spleen tyrosine kinase). Mientras que Syk normalmente se expresa en las células B, la ZAP-70 lo hace en las células T y NK. Ambas proteínas tienen funciones prácticamente equivalentes en los linfocitos T y B, donde son fundamentales para la cascada de señalización intracelular que se requiere para la activación y desarrollo de las funciones efectoras de estas células. Estas funciones las realizan a partir de su asociación con los receptores de membrana de sus

células correspondiente que en el caso de células T es a través del TCR (T cell receptor) y de las células B a través del BCR (B cell receptor).

Normalmente ZAP-70 no se expresa en los linfocitos B, no obstante en los últimos años diversos estudios genéticos realizados en pacientes con LLC-B demostraron un patrón característico en la expresión de algunos genes entre los que se encontraba el de la proteína ZAP-70 (Rosenwald A, 2001). Además se demostró que existía una estrecha correlación entre la expresión de ZAP-70 por parte de las células B y el estado mutacional de los genes de la IgV_H, de manera que aquellos pacientes con mutaciones en IgV_H no expresaban ZAP-70 o lo hacían en niveles muy bajos, mientras que los pacientes que mostraban una IgV_H no mutada presentaban una alta expresión de ZAP-70 (Chen L, 2002; Crespo M, 2003; Wiestner A, 2003, Orchard JA, 2004).

Señalar que los niveles de expresión de ZAP-70 presenta una mejor correlación con el estado mutacional de los genes de la IgV_H que la expresión de CD38, puesto que ambos (tanto ZAP-70 como los genes de la IgV_H) se mantienen sin variación a lo largo de toda la enfermedad.

Por último señalar que se ha comprobado como la estimulación a través del BCR en las células B de pacientes con LLC-B ZAP-70 positivos provoca una fosforilación de las PTK citosólicas mucho mayor que la que se obtiene en células B de pacientes ZAP-70 negativos (Chen L, 2002). Este fenómeno parece indicar que la expresión de ZAP-70 puede verse asociada con un aumento de la transducción de señales estimuladoras de los linfocitos B que podría contribuir a la evolución más agresiva en estos pacientes (Wiestner A, 2003, Orchard JA, 2004).

Esto unido a que la determinación de la expresión de ZAP-70 es sencilla y poco costosa, (pudiéndose realizar por RT-PCR, inmunohistoquímica y/o citometría de flujo) hace que, a diferencia de otros factores aquí mencionados, sea uno de los factores pronósticos más factibles a la hora de utilizar en la práctica clínica diaria.

3.6.8. Otros factores pronósticos.

Además de los factores ya mencionados existen otros de cuya importancia clínica es variable. Entre estos factores tenemos:

- Niveles séricos de timidina-quinasa (TK): aquellos pacientes con niveles de TK mayores de 7 UI/l tienen una mayor progresión de la enfermedad que los pacientes con valores de TK menores al anteriormente indicado (Hallek M, 1999).
- Determinación de CD23 soluble: valores normales de CD23 soluble en sangre están relacionados con un menor riesgo de progresión de la enfermedad, mientras que valores elevados indican un pronóstico adverso (Sarfati M, 1996).
- Niveles séricos de β 2-microglobulina: valores superiores a 4 mg/l de β 2-microglobulina indican un elevado riesgo de progresión agresiva de la enfermedad (Keating MJ, 1995).
- Sexo: se ha observado que existe una menor supervivencia de los hombres frente a las mujeres lo que podría indicar una relación del sexo con el pronóstico de la enfermedad. Por otra parte también se observa una mayor frecuencia de hombres en los estadios más avanzados de la enfermedad (estadio III y IV de Rai) (Juliussen G, 1986).

Otros factores pronósticos que están siendo investigados y cuya validez está aún por determinar en muchos casos serían: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) el cual se encuentra disminuido en los estadios tempranos de la enfermedad y en pacientes cuyas células tienen mutaciones somáticas de las Ig en comparación a lo que ocurre en los estadios más avanzados. También determinadas citocinas parecen estar relacionadas con los estadios clínicos; así se han observado elevados niveles de interferón gamma (IFN- γ) en células CD3+CD8+ en los estadios II-IV de Rai con respecto a estadios 0-I y a su vez los niveles de IFN- γ correlacionan con otros factores como el BLC y el TTM (Podhorecka M, 2004).

Otras citocinas con posible valor pronóstico son la IL-6 cuyos valores están aumentados y correlacionan con estadios avanzados de Rai (estadios III-IV), valores elevados de β -2-microglobulina y menor supervivencia de los pacientes (Lai R, 2002), y las citocinas IL-8 e IL-10 que se encuentran elevadas y correlacionan con otros factores pronósticos y una menor supervivencia de los pacientes (Fayad L, 2001; Wierda WG, 2003). Por último la determinación de los niveles de LDH, el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) y el cociente entre *bcl-2* y *bax* también pueden tener valor pronóstico (Shanafelt TD, 2004).

3.6.9. Combinación de factores pronósticos.

Como se comento con anterioridad muchos de estos factores indicados no guardan relación entre sí, pero su uso combinado junto con los criterios de clasificación de la enfermedad considerados como factores de pronóstico clásicos, sirven para poder establecer una identificación de aquellos pacientes con un peor pronóstico que requieren mayor vigilancia e incluso el inicio del tratamiento.

Por tanto atendiendo a los factores clásicos y recientes podemos establecer 2 tipos de LLC según el riesgo clínico de los pacientes (Tabla 3.6.9.1.) (Shanafelt TD, 2004; Herishanu Y, 2005):

Tabla 3.6.9.1: Tipos de LLC según factores pronósticos y riesgo clínico.

FACTORES PRONÓSTICO	RIESGO CLÍNICO	
	BAJO	ELEVADO
<i>Factores clásicos</i>		
Sexo	Femenino	Masculino
Estadio clínico	Binet A Rai 0, I	Binet B o C Rai II, III, IV
Biopsia de médula ósea	Patrón no difuso	Patrón difuso
Infiltración médula (%linfocitos)	< 80%	> 80%
Morfología linfocitaria	Típica (< 10% linfocitos atípicos)	Atípica (> 10% linfocitos atípicos)
Tiempo de duplicación linfocitaria (TDL)	> 12 meses	< 12 meses
Expresión de CD38	< 20-30%	> 20-30%
Cariotipo	Normal, delección 13q	Trisomía 12, delección 11q, delección 17p
Estado mutacional IgVH	Mutada	No mutada
Expresión de ZAP-70	Baja (< 20%)	Elevada (> 20%)
<i>Otros factores</i>		
Niveles de β 2-microglobulina	Baja (< 4 mg/l)	Elevada (> 4 mg/l)
Niveles de CD23 soluble	Baja (< 574 UI/ml)	Elevada (> 574 UI/ml)

3.7. Tratamiento.

El diagnóstico de la enfermedad no implica en ningún caso el inicio de tratamiento alguno, de hecho buena parte los pacientes en estadios iniciales suelen tener una esperanza de vida similar a la población normal de su mismo sexo y edad. En pacientes de estadios bajos el inicio del tratamiento sólo está indicado en aquellos casos en que se progresa a un estadio más avanzado o el paciente muestre características que permitan predecir su progresión a corto plazo.

Ante estas circunstancias el The National Cancer Institute Working Group (NCI-WG) (Cheson BD, 1996) publicó unas recomendaciones para determinar el inicio del tratamiento, así sólo se comenzara el tratamiento en aquellos pacientes que presenten las siguientes características:

- Desarrollo de síntomas asociados a la enfermedad: pérdida de peso mayor al 10% en 6 meses, fiebre de causa no infecciosa durante 2 semanas, sudoración nocturna y/o fatiga extrema.
- Anemia y/o trombocitopenia de naturaleza no autoinmune.
- Progresión de la enfermedad: marcada por presentar un tiempo de duplicación linfocitaria menor a 6 meses, adenopatías y esplenomegalia de rápido crecimiento.
- Anemia y/o trombocitopenia de naturaleza autoinmune con baja respuesta al tratamiento con corticoides o infecciones repetidas debido a hipogammaglobulinemia grave.

Señalar que la linfocitosis, por muy marcada que sea, no suele en si misma considerarse un criterio suficiente para comenzar el tratamiento a no ser que se vea acompañada de alguno de los criterios antes mencionados.

Por otra parte también es necesario el establecimiento de unos criterios que definan el tipo de respuesta al tratamiento, estos criterios fueron establecidos por los dos principales grupos de trabajo en LLC como son The National Cancer Institute Working Group (NCI-WG) e International Workshop on Chronic Lymphocytic Leucemia (IWCLL). El NCI-WG establece los siguientes términos:

1. Remisión completa de la enfermedad.

Se deben cumplir los siguientes criterios al menos durante 2 meses:

- Ausencia de síntomas asociados a la enfermedad.
- Ausencia de adenopatías y espleno-hepatomegalias.
- Número de linfocitos inferior a 4.000/ μ l.
- Número de neutrófilos superior a 1.500/ μ l.
- Cifra de plaquetas superior a 100.000/ μ l.
- Valores de hemoglobina superior a 11g/dl.
- Porcentaje de infiltración en médula ósea inferior al 30% con ausencia de nódulos linfoides.

2. Respuesta parcial al tratamiento.

Siempre que se cumplan los criterios siguientes durante dos meses como mínimo:

- Disminución de adenopatías y espleno-hepatomegalias en un 50%.
- Presentar alguno de los siguientes criterios o al menos la mejoría de los mismos en un 50% sin necesidad de transfusiones, con respecto a los valores pretratamiento:
 - Número de neutrófilos superior a 1.500/ μ l.
 - Cifra de plaquetas superior a 100.000/ μ l.
 - Valores de hemoglobina superiores a 11g/dl.

3. Enfermedad progresiva.

Se define así aquella situación en la que se presentan uno o más de los siguientes criterios:

- Aparición de adenopatías y espleno-hepatomegalia o incremento de al menos un 50% en el tamaño de ganglios y vísceras.
- Cifra de linfocitos en sangre aumentada en al menos un 50% con respecto a los valores pretratamiento.
- Transformación de la enfermedad a linfoma de células grandes (Síndrome de Richter) o a leucemia prolinfocítica.

4. Enfermedad estable.

Se entiende como tal aquella situación que alcanzan los pacientes que no presentan ninguna de las tres respuestas al tratamiento anteriores.

Por su parte el IWCLL define de igual forma la remisión completa de la enfermedad mientras que la respuesta parcial, enfermedad progresiva y la enfermedad estable son definidas como el cambio en una dirección u otra de los estadios de Binet.

A continuación pasamos a ver las diferentes estrategias terapéuticas llevadas a cabo con los pacientes de LLC-B.

3.7.1. Quimioterapia.

Tradicionalmente el tratamiento de los pacientes con LLC ha consistido principalmente en el uso de agentes alquilantes con o sin corticoides. Los agentes alquilantes usados han sido el clorambucilo o la ciclofosfamida cuya eficacia ha sido demostrada (Huguley CM, 1977) siendo el clorambucilo el fármaco de elección para la quimioterapia inicial, si bien la ciclofosfamida está más indicada en aquellos pacientes con trombocitopenia muy marcada. No obstante, aunque de eficacia contrastada, estos agentes presentan efectos secundarios que contrarrestan su eficacia (Rai KR, 2000; Kipps TJ, 2002) y además el tratamiento con agentes alquilantes lleva asociado un elevado riesgo de desarrollar una leucemia mieloide aguda secundaria. Por otra parte el uso de uno de los agentes como sustituto terapéutico ante la falta de respuesta a alguno de ellos no se ha demostrado eficaz (Rai KR, 2000). Además, el tratamiento con clorambucilo (tasa de respuestas del 40-60%) rara vez produce una respuesta completa y dando lugar siempre a respuestas transitorias siendo en este caso susceptible de un nuevo tratamiento. Por tanto su administración debe mantenerse, solamente, hasta conseguir una máxima respuesta clínica estable, y su uso está sobre todo encaminado a aquellos casos donde lo que se persigue con el tratamiento es paliar los síntomas de la enfermedad.

Una de las estrategias terapéuticas llevadas a cabo para mejorar las respuestas al tratamiento ha sido la combinación de los agentes alquilantes con otros fármacos en lo que se denomina poliquimioterapias. Estas poliquimioterapias se basan en la

combinación de diversos fármacos entre los que encontramos: clorambucilo, ciclofosfamida, prednisona, adriamicina, doxorubicina o vincristina. Las combinaciones más empleadas han sido la poliquimioterapia CAP (ciclofosfamida, adriamicina, prednisona), CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona) y CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona) No obstante el uso de la poliquimioterapia esta sujeta a cierta controversia ya que en la mayoría de los casos aunque aumenta la tasa de respuesta al tratamiento ésta no se acompaña de un aumento de la supervivencia y conlleva una mayor toxicidad.

Otro grupo de fármacos utilizados en quimioterapia son los denominados análogos de purinas los cuales se han mostrado muy eficaces a la hora de combatir los tumores linfoides de crecimiento lento. El fármaco de esta naturaleza más utilizado ha sido la fludarabina, seguido de la cladribina (2-clorodeoxiadenosina, 2-CDA) y la pentostatina (2-deoxicoformicina, DCF).

La fludarabina se ha mostrado como el análogo de nucleótidos más eficaz en su uso solitario puesto que consigue una gran actividad en una gran variedad de enfermedades linfoides indolentes refractarias a otros tratamientos (Redman JR, 1992). En el caso de pacientes con LLC tratados previamente con agentes alquilantes consigue una respuesta global superior al 50% (Keating MJ, 1989), mostrándose muy superior al clorambucilo (Rai KR, 2000b), e incluso produce respuestas superiores frente a las poliquimioterapias CHOP y CVP (Leporrier M, 2001).

La pentostatina también ha demostrado cierta actividad frente a LLC refractaria e inicial bien como agente único (Ho AD, 1990; Johnson SA, 1998) o en combinación con otros agentes (Weiss MA, 2003a).

Por su parte la cladribina también se muestra como un fármaco de cierta eficacia, mostrando resultados similares a la fludarabina, alcanzando respuestas globales muy elevadas en pacientes tratados previamente con agentes alquilantes (Karlsson K, 2002). Algunos trabajos han demostrado que la combinación de este agente con alquilantes como la ciclofosfamida muestra una gran eficacia a la hora de tratar la LLC (Robak T, 2000).

Existe en la actualidad un nuevo análogo de nucleosidos que es la clofarabina que está indicado para el tratamiento de de leucemias infantiles y cuya eficacia contra la LLC puede ser elevada ya que estudios de citotoxicidad *in vitro* han mostrado una eficacia mucho mayor que la cladribina en líneas celulares (Lindemalm S, 2003).

Al igual que ocurría con los agentes alquilantes, los análogos de nucleosidos también presentan una toxicidad que es relativamente frecuente y puede ser grave. Entre los efectos secundarios cabe destacar la mielo e inmunosupresión (particularmente en forma de descenso de linfocitos CD4+) con una gran predisposición a infecciones de tipo bacteriano y fúngico, anemia autoinmune, e incluso enfermedad injerto contra huésped por transfusión.

En los últimos años ha aparecido una estrategia terapéutica que consiste en la combinación de agentes alquilantes y análogos de purina. En este sentido la combinación más utilizada ha sido la de fludarabina y clorambucilo que ha mostrado respuestas similares a la fludarabina sola pero aumentando la toxicidad (Rai KR, 2000b). También se estudió la combinación de fludarabina con ciclofosfamida o ciclofosfamida más mitoxantrona, obteniéndose mayor porcentaje de respuestas globales aunque presentan una mayor incidencia de efectos secundarios hematológicos (O'Brien SM, 2001a, Bosch F, 2002).

3.7.2. Inmunoterapia.

Debido a que la quimioterapia, lleva asociados diversos trastornos hematológicos secundarios, se han buscado estrategias terapéuticas diferentes. En este sentido se desarrolló la terapia con anticuerpos monoclonales frente a antígenos de la superficie de las células neoplásicas, siendo los más experimentados y de momento los que mayor éxito han demostrado, el anti-CD20 (Rituximab) y anti-CD52 (Alemtuzumab, Campath-14).

Rituximab (anti-CD20) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al antígeno de superficie CD20 de las células B. Es de gran eficacia frente a los linfomas foliculares aunque su eficacia desciende en la LLC-B debido a la baja intensidad de expresión de la molécula CD20 por parte de las células B leucémicas (Keating M, 2000; O'Brien SM,

2001b), aunque algunos trabajos han demostrado que Rituximab por si solo como tratamiento inicial produce respuestas parciales en 2/3 de los pacientes y en 1/3 de los pacientes como tratamiento de rescate (Hainsworth JD, 2003).

Alentuzumab (anti-CD52) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al antígeno de superficie CD52 que es expresado por los linfocitos B, T y NK además de los monocitos y algunos granulocitos. Es activo frente a LLC y leucemia prolinfocítica (Moreton P, 2003), estando indicado para los pacientes que no responden a los agentes alquilantes y fludarabina donde se consiguen hasta 1/3 de respuestas globales algunas incluso completas (Keating MJ, 2002; Rai KR 2002).

Existen otras moléculas usadas en inmunoterapia cuya eficacia aún debe ser validada, entre estas moléculas tenemos la Denileukina deftitox que es una interleucina (IL-2) unida a la toxina diftérica, esta molécula se une al receptor de membrana CD25 presente en linfocitos T y B. Un estudio en fase II en pacientes de LLC refractarios al tratamiento con fludarabina demostró que varios de los pacientes tratados con Denileukina tuvieron una reducción de las células tumorales circulantes, llegando incluso a un 95% de reducción en algunos casos (Frankel AE, 2003).

Otras de las moléculas que se están investigando clínicamente para su uso en inmunoterapia son: anti-CD23 (Lumiliximab), anti-CD22 (Epratuzumab), anti-HLA-DR (Apolizumab) y anti-CD80 (anti-B7).

Aunque la inmunoterapia se utilizó con el fin de mejorar la respuesta al tratamiento disminuyendo los efectos secundarios asociados a la quimioterapia, la inmunoterapia también presenta algunos trastornos. Así Rituximab está asociado a la posibilidad de desarrollar síndrome de lisis tumoral (Yang H, 1999) y síndrome de liberación de citocinas (Winkler U, 1999) que provocan hipotensión y muerte. Por su parte, Alentuzumab puede provocar una profunda inmunodepresión con elevado riesgo de infecciones oportunistas así como una reactivación de citomegalovirus, lo que implica el uso de medidas profilácticas en estos pacientes.

3.7.3. Terapia combinada.

Una nueva estrategia terapéutica llevada a cabo en los últimos años es la combinación de inmunoterapia y quimioterapia, principalmente con los análogos de purinas. Rituximab ha sido utilizado en combinación con fludarabina (Byrd JC, 2003), fludarabina y ciclofosfamida (Lamanna N, 2003) así como en combinación con pentostatina y ciclofosfamida (Weiss MA, 2003b). La combinación de Rituximab y fludarabina han dado lugar a elevados porcentajes de respuestas globales e incluso respuestas completas tanto en pacientes sin tratar (Keating MJ, 2005) como recidivantes (Wierda W, 2005).

Alentuzumab también ha sido utilizado en combinación con otros compuestos terapéuticos, así se ha combinado con Rituximab (Faderl S, 2003), ciclofosfamida y fludarabina (Wierda W, 2004) dando lugar a respuestas prometedoras.

Pero, si bien estas nuevas estrategias presentan mejores resultados en las respuestas al tratamiento por parte de los pacientes, las inmunoterapias combinadas sobre todo con fludarabina han demostrado tener riesgos considerables. La utilización de dosis altas y la prolongación en el tratamiento permiten obtener mejores respuestas a la terapia pero están asociados a citopenias severas produciéndose una gran susceptibilidad a infecciones que limitan los beneficios que pueden resultar de las terapias.

3.7.4. Transplante de células hematopoyéticas.

El papel que puede desempeñar el transplante de células hematopoyéticas (allogénico y autólogo) en los pacientes con LLC-B no está claramente definido. La edad avanzada de los pacientes con LLC-B supone una cierta limitación en los trasplantes alogénicos, siendo el transplante alogénico el más indicado en los enfermos jóvenes de LLC-B y que además presenten factores de mal pronóstico. Por otra parte, hasta la aparición de los análogos de purinas no fue posible la obtención de células hematopoyéticas sin contaminación tumoral, factor éste indispensable para poder realizar con éxito los trasplantes autólogos, los cuales son los más susceptibles de aplicar en la mayoría de los pacientes con LLC-B.

Los trasplantes alogénicos han demostrado, en varios estudios, una elevada probabilidad de remisión completa de la enfermedad en pacientes con enfermedad refractaria o recidivante (Michallet M, 1991; Rabinowe SN, 1993). Estudios de larga duración con pacientes de LLC-B trasplantados y sometidos previamente a tratamiento con ciclofosfamida e irradiación mostraron elevados porcentajes de pacientes que no experimentaron progresión de la enfermedad tanto en los grupos de pacientes que no habían recibido tratamiento como en los de pacientes tratados previamente (Khoury IF, 2002). Como indicamos en los apartados anteriores, las terapias con agentes alquilantes y/o análogos de purinas presentan una elevada toxicidad lo que añade dificultad a la hora del uso del trasplante alogénico. Así pues el trasplante no mieloablativo ha sido sugerido para evitar la toxicidad asociada a la quimioterapia intensiva (Slavin S, 1998). Por otra parte, los trasplantes autólogos han mostrado elevados porcentajes de remisiones completas, bajos porcentajes de recidivas y bajos efectos secundarios cuando se utilizan con terapia de intensificación (Rabinowe SN, 1993; Khoury IF, 1994). Sin embargo algunos estudios han demostrado que las estrategias de eliminación de células tumorales bien por anticuerpos o quimioterapia limitan la eficacia del trasplante por la aparición de efectos secundarios (Altes A, 2002; Trneny M, 2002).

3.7.5. Otras estrategias terapéuticas.

Además de las estrategias terapéuticas indicadas hasta ahora existen otras, las cuales son usadas de manera específica en determinados casos. Dichas estrategias son:

- Leucoaféresis: consiste en la separación automática de las células tumorales de la sangre. Está indicada en aquellos casos de hiperviscosidad sanguínea, habitual cuando la cifra de leucocitos es superior a 400.000/ μ l. También puede ser adecuada para pacientes de estadios avanzados y refractarios a otros tratamientos. En cualquier caso, su uso sólo consigue respuestas parciales transitorias y el proceso debe ser repetido (Montserrat E, 1992).

- Radioterapia: consiste en la irradiación total o parcial de órganos y nódulos linfáticos. Está indicado en pacientes con síntomas compresivos por abundante masa tumoral y en pacientes de estadios muy avanzados o resistentes a la quimioterapia. Los resultados al igual que la leucoafairesis son temporales (Johannsson J, 2002).
- Esplenectomía: se trata de una terapia paliativa y no curativa que aporta pocos beneficios al paciente. Está indicado en pacientes con hipersplenismo o con manifestaciones autoinmunes severas (anemia hemolítica y/o trombocitopenia) que no responden a otros tratamientos. Se presenta como mejor opción frente a la irradiación del bazo aunque la mortalidad en los pacientes con mal estado general se puede ver incrementada (Seymour JF, 1997).

En cualquier caso, toda estrategia terapéutica como se ha indicado hasta ahora presenta en mayor o menor medida efectos secundarios que minimizan su éxito. Algunos de estos efectos secundarios adversos están asociados a citopenias severas producidas por el tratamiento induciéndose una gran susceptibilidad a infecciones que limitan los beneficios que pueden resultar de dichas terapias. Para contrarrestar este efecto citopénico y conseguir aumentar la inmunidad frente a las infecciones en el posterior periodo linfopénico a la terapia, en los últimos años se ha experimentado con la selección, expansión y autotransfusión de linfocitos T que no sólo contribuye al aumento de la inmunidad frente a los patógenos sino que además permite obtener respuestas antileucémicas más completas y duraderas al tratamiento (Husebekk A, 2000), además se ha demostrado que las células T autólogas y especialmente las células T CD8+ pueden controlar el crecimiento de las células leucémicas en modelos murinos (Simón A, 1999).

Ante esta situación se plantea la posibilidad de desarrollar una nueva estrategia terapéutica consistente en utilizar las propias células del sistema inmune como elementos puramente terapéuticos en lo que se denomina terapia celular adoptiva (ACT). Ésta consiste en la localización y expansión de clones de células citotóxicas que reconozcan antígenos de las células tumorales para su uso terapéutico. Los avances logrados con este tipo de terapia en otros tumores como el melanoma (Dudley ME, 2002), la propia naturaleza de la LLC-B y los hallazgos antes mencionados hacen de la

leucemia una firme candidata para este tipo de terapias lo cual abre la posibilidad en el futuro de nuevas estrategias terapéuticas en estos pacientes.

Otra de las estrategias estudiadas en los últimos años es el uso de vacunas donde se manipulan vías de señalización de las células B como son la vía del CD40-CD40L y que contribuye a una activación de las células del sistema inmune autólogas que adquieren una capacidad citotóxica frente a las células leucémicas (Biagi E, 2005).

En cualquier caso estas últimas estrategias todavía deben ser ampliamente investigadas para su posible uso terapéutico.

4. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LAS CÉLULAS B EN LA LLC-B.

4.1. Clonalidad.

La clonalidad de las células B leucémicas ha sido confirmada con estudios ideotípicos donde se demuestra la expresión de una sola cadena ligera de las inmunoglobulinas, kappa (κ) o lambda (λ), pero nunca de ambas. Pero este no es el único fenómeno que determina el origen clonal de estas células, así se ha demostrado que los linfocitos B leucémicos en cada paciente expresan inmunoglobulinas de superficie con similar especificidad idiotípica (Hamblin TJ, 1980), un único patrón de actividad en la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) (Solanki DL, 1982), reordenamiento de los genes de las cadenas ligeras y pesadas idéntico en todas las células (Johnstone AP, 1982) y anomalías cromosómicas similares (Montserrat E, 1991).

4.2. Inmunofenotipo.

Las células B de los pacientes con LLC-B son muy similares morfológicamente a las células B maduras de individuos sanos, a excepción de aquellos casos de LLC-B atípica o mixta donde hay ciertas variaciones morfológicas de las células (tal y como se indicó en el apartado de clasificación de la enfermedad). Así pues la principal forma de diferenciación de las células B leucémicas con respecto de las normales es la de atender sus características fenotípicas, dentro de las cuales las más destacables son aquellas utilizadas para el diagnóstico de la LLC:

- Expresión del antígeno de superficie CD5.
- Expresión de uno o más antígenos asociados a células B: CD19, CD20 (baja expresión), CD21, CD23, CD24.
- Niveles bajos de inmunoglobulinas de superficie (IgM e IgD) con presencia de una sola de las cadenas ligeras kappa (κ) o lambda (λ).

Hay que destacar la existencia de un pequeño porcentaje de células B maduras en individuos sanos que se caracteriza por expresar CD5 además de algunas de las características de las células B leucémicas incluida su monoclonalidad (Rawstron AC, 2002), aunque las células B leucémicas presentan unas diferencias destacables que las distinguen de las células B normales como son entre otras:

- a) Sobreexpresión de *bcl-2* (Scheda M, 1992).
- b) Alteración en el transporte de Na^+ y H^+ a través de la membrana celular (Ghigo D, 1991).
- c) Respuesta proliferativa anormal a señales mitógenas (Carlsson M, 1988).
- d) Resistencia a la transformación por el virus del Epstein-Barr (Rickinson AB, 1982).
- e) Disociación entre fenotipo y ciclo celular, expresando antígenos de activación en fases tempranas del ciclo celular (Sadamori N, 1984).

Una de las principales características del fenotipo de las células B leucémicas es la de representar un estado un estado de transición entre células B inmaduras y células B maduras, puesto que se encuentran expresados tanto antígenos de células inmaduras como antígenos que están asociados a la activación celular.

Además de las diferencias anteriormente expuestas en la expresión de los antígenos de superficie entre células B leucémicas y normales, existen otras de importancia variable. Así la expresión de CD19 presenta, en algunos casos, en las células leucémicas una intensidad media de fluorescencia (MFI) menor que la de las células normales (Gagro A, 1997). Entre los antígenos cuya expresión se encuentra aumentada en las células B leucémicas con respecto de las células B normales tenemos: CD6, CD11b, CD21, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD32, CD36, CD39, CD49c, CD69, CD71, HLA-

DR. Por otra parte los antígenos cuya expresión está disminuida en las células B leucémicas frente a las normales son: CD1, CD11a, CD11c, CD14, CD15, CD20, CD22, CD35, CD40, CD49d, CD62L, CD72, CD79, CD80, CD86, CD95.

Un aspecto importante a destacar en cuanto al inmunofenotipo de las células B leucémicas es la relación que se puede establecer entre la expresión de algunos marcadores de superficie con el estado pronóstico, supervivencia o posible respuesta a tratamiento. En este sentido lo más estudiado es la expresión de CD38 que tal como se indicó en el apartado correspondiente a los factores pronósticos desempeña un papel importante a la hora de predecir el curso de la enfermedad en los pacientes con LLC-B y cuya expresión por parte de las células B leucémicas es bastante heterogénea.

Otros marcadores también muestran diferente expresión asociados a algunos aspectos de la enfermedad. Este es el caso de CD21 cuyos altos niveles de expresión han sido asociados a una morfología atípica (Tooze JA, 1992; Newman RA, 1993). Por su parte CD36 aumenta su expresión según avanza el estadio clínico del paciente, siendo claramente mayor en los pacientes con un patrón de infiltración de médula ósea difusa (Rutilla S, 1999). En el caso de CD32 la expresión elevada ha sido relacionada con una menor supervivencia de los enfermos (Schranz V, 1992).

Los marcadores CD18 y CD54 también presentan una expresión muy heterogénea entre los pacientes con LLC. La baja expresión de CD18 ha sido asociada con enfermedad avanzada, un menor tiempo de duplicación linfocitaria (TDL) y un patrón difuso de infiltración en médula ósea. Los niveles elevados de CD54 están relacionados con los estadios más avanzados de la enfermedad y un menor TDL (Domingo A, 1997).

Por último en relación con el inmunofenotipo, señalar que existen evidencias de diferencias en la expresión de marcadores de activación en células B leucémicas dependiendo del tipo de LLC-B según los factores pronósticos que lo define. De esta manera se ha observado que aquellos pacientes con las inmunoglobulinas mutadas tienen aumentada la expresión de los antígenos CD39, CD62L y CD71 frente a los pacientes que no tienen mutación mientras que éstos se caracterizan por tener a su vez aumentada la expresión de CD40, CD38 y CD69. Al establecerse la diferenciación de los pacientes a través de la expresión de CD38 (límite de positividad >30%) se observó que pacientes CD38+ tenían una mayor MFI en la expresión de HLA-DR y una mayor expresión de los marcadores CD40, CD69 y CD79. Estos hallazgos sugieren la

existencia de diferentes fenotipos de activación según el tipo de LLC que indican diferencias en los patrones de activación de las células B en los pacientes (Damle RN, 2002).

4.3. Viabilidad celular.

Como se indicó al comienzo de este trabajo, la LLC-B se caracteriza por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B monoclonales y funcionalmente incompetentes. Puesto que estas células se encuentran detenidas en su ciclo celular en la fase G₀/G₁, y no se dividen, su acumulación sólo puede deberse a un aumento anormal de la supervivencia como consecuencia de una resistencia al proceso de apoptosis (Rozman C, 1995).

Las razones por las cuales las células B leucémicas tienen aumentada la resistencia a la apoptosis han sido ampliamente estudiadas. Una de las causas principales parece ser el aumento de *bcl-2* o un ratio elevado de *bcl-2/bax* en las células leucémicas (Hanada M, 1993, Osorio LM, 1997), el cual confiere una protección frente a diversos mecanismos de la vía de la apoptosis bajo control mitocondrial.

También parece desempeñar un papel significativo la proteína p53, la cual tiene mutaciones en el 10-15% de los pacientes de LLC-B, que se relacionan con un peor pronóstico. En estos casos donde existe una p53 anómala el peor pronóstico se relaciona con un defecto en la inducción de la apoptosis de las células B leucémicas, con su consiguiente acumulación en la sangre. Sin embargo los defectos de *bcl-2* como p53, por si solos, no parecen aumentar la resistencia a la apoptosis de las células B, ya que a diferencia de lo que ocurre *in vivo*, cuando las células B leucémicas se disponen en cultivo rápidamente entran en apoptosis (Collins RJ, 1989). Esto indica la existencia *in vivo* de un microambiente donde desempeñan un papel importante tanto factores humorales y celulares que son realmente los que promueven la supervivencia de las células B leucémicas *in vivo* a través de complejos circuitos de citocinas y otras moléculas que actúan de forma autocrina o paracrina, incrementando en algunos casos los niveles de *bcl-2*. En este sentido se ha demostrado el incremento de la resistencia a la apoptosis de las células leucémicas por factores solubles presentes en el microambiente tales como la interleucina 4 (IL-4) e interleucina 8 (IL-8)(Dancescu M, 1992; Celle PF, 1996), el interferón α y γ (IFN- α e IFN- γ) (Buschle M, 1993; Jewell

AP 1994), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (Köning A, 1997) y el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) (Cordingley FT, 1988).

Por otra parte, también existen diversos tipos celulares que intervienen en el aumento de la supervivencia, la estimulación a través del antígeno de superficie CD40 de las células B por su ligando CD40L presente en células T CD4⁺ desencadena por parte de las primeras la producción de survivina (Granziero L, 2001) y activación de NF- κ B (Furman RR, 2000) que promueven en las células B un aumento en la resistencia a la apoptosis.

Si bien las células T CD4⁺ parecen desempeñar un papel importante en el aumento de la resistencia a la apoptosis a través de la producción de IL-4 y de la interacción CD40L-CD40 con las células B, el aumento de la supervivencia de las células B a través de otros tipos celulares debe al contacto directo con estas células. Así el contacto directo con las células dendríticas (Pedersen IM, 2002), las células estromales de la médula ósea (Lagneaux L, 1998) y una célula tipo asistente (nurse like cell) presente en la sangre de los pacientes con LLC-B (Burger JA, 2000) parece ser la causa del aumento de la supervivencia. El papel que pueden desempeñar otras células como monocitos o linfocitos NK está siendo estudiado, en este caso el aumento de la supervivencia parece deberse a la estimulación de estas células a través de su receptor para las IgG produciendo un retraso en la apoptosis espontánea e inducida por fludarabina en las células B (Gamberale R, 1999).

5.- ALTERACIONES DEL SISTEMA INMUNE EN PACIENTES CON LLC-B.

La patogenia de la LLC-B no está ocasionada solamente por las alteraciones existentes en los linfocitos B descritas en los apartados anteriores. Por su parte existen alteraciones de otros compartimentos del sistema inmune que pueden participar en la patogenia de la enfermedad y explicar en algunas ocasiones la situación clínico-patológica de los pacientes. Estas alteraciones no sólo se deben a redistribuciones poblacionales ocasionadas por el incremento en sangre de los linfocitos B, sino también a alteraciones del fenotipo y de la funcionalidad de diferentes poblaciones leucocitarias no malignas que forman parte del sistema inmune y que interaccionan con los linfocitos B leucémicos.

Uno de los principales compartimentos del sistema inmune que se ve afectado es el de los linfocitos T. Estos presentan numerosas alteraciones morfológicas y funcionales que podrían asociarse con una capacidad alterada para reconocer y regular a los linfocitos B leucémicos.

La alteración más marcada en el compartimiento T es la disminución notable del porcentaje de linfocitos T debida fundamentalmente a la expansión de las células tumorales, no obstante algunos trabajos han demostrado como a medida que progresa la enfermedad, se produce un incremento en el número absoluto de linfocitos T en sangre periférica tanto de subpoblaciones CD4+ y CD8+ (Kay NE, 1982; Platsoucas CD, 1982; Vullier F, 1988; Bartik MM, 1998).

Por otra parte existen redistribuciones subpoblacionales como consecuencia de los linfocitos B leucémicos (Kay NE, 1979; Lauria F, 1980), observándose un incremento de linfocitos T CD4+ en médula ósea y nódulos linfáticos (Pizzolo G, 1983; Caligaris-Cappo F, 1999). A su vez, en los pacientes con LLC-B, se observa una expansión de linfocitos T CD8+ con respecto a los linfocitos T CD4+ que se atribuye fundamentalmente a cambios en la distribución de las poblaciones T, que como se indicó anteriormente es debido a la mayor presencia de linfocitos CD4+ en médula ósea y en ganglios linfáticos (Busmanis I, 1993).

Otras alteraciones en las proporciones de linfocitos T a destacar son: la disminución de linfocitos T CD4+CD45RA+ con respecto a los linfocitos T CD4+CD45RO+ (Briggs PG, 1990; Frolova EA, 1995). Expansión de linfocitos T CD57+ efectores, presentando las subpoblaciones expandidas un fenotipo CD57+CD28- característico de poseer una mayor capacidad citotóxica (Van den Hove LE, 1998). También se ha descrito la expansión de la subpoblación de linfocitos T con fenotipo CD3+CD8+CD28- capaces de producir y liberar IL-4, citocina esta implicada en la supervivencia de los linfocitos B leucémicos. Por último destacar la existencia de expansiones oligo- y monoclonales de subpoblaciones de linfocitos T TCR-BV CD4+ y CD8+ en sangre periférica que reflejan la existencia de linfocitos T capaces de reconocer los linfocitos B leucémicos (Serrano D, 1997; Rezvany MR, 1999, Goolsby CL, 2000).

Como se indicó anteriormente, no sólo existen alteraciones en los linfocitos T en cuanto a su distribución y proporciones, también se producen alteraciones fenotípicas, algunas de las cuales pasamos a describir a continuación:

- Niveles elevados de antígenos de activación como CD25, HLA-DR y CD71 (Totterman TH, 1989; García-Suárez J, 1991), los cuales indican un estado de activación *in vivo* que puede interpretarse como reactivo a la expansión leucémica. La presencia del antígeno de activación HLA-DR proporciona a los linfocitos T de la capacidad para actuar como APCs permitiendo la activación de linfocitos T CD4+ productores de citocinas y factores de crecimiento para las células B tumorales.
- Expresión reducida de la cadena zeta del TCR en los linfocitos CD3+ (Rossi E, 1996). Las alteraciones de esta cadena del TCR juegan un papel importante en los defectos funcionales del sistema inmune del enfermo ya que han sido encontradas en linfocitos T infiltrantes de tumores en diversos pacientes con tumores sólidos (Nakagomi H, 1993).
- Disminución de la expresión del antígeno de superficie CD40L (Cantwell MJ, 1997).
- Elevados niveles de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan CTLA-4 (CD152) en los pacientes de LLC-B en comparación con los controles sanos (Motta M, 2005). Si bien es cierto que se observa una pérdida total de la expresión de CTLA-4 (CD152) en la superficie de linfocitos T tras activación e incremento de su expresión intracelular en células no estimuladas (Scrivener S, 2001). También se ha comprobado un retorno de los niveles de expresión basales de CTLA-4 (CD152) por parte de los linfocitos T CD4+ y CD8+ tras varias horas después de estimulación (Frydecka I, 2004). Estos hechos pueden demostrar que los linfocitos T están en un estado parcial de activación por lo que se produce un fallo en la señal negativa para regular la respuesta inmune, lo que podría permitir la supervivencia de clones de linfocitos T en este estado de activación capaces de originar respuestas débiles. Por tanto la pérdida de expresión de CTLA-4

podría dar como resultado un fallo en la eliminación de linfocitos T autorreactivos o prevenir la apoptosis Ag-específica de linfocitos T activados tras cumplir su función (Scrivener S, 2001; Rossi E, 1996).

- Disminución de la expresión de CD28 tanto a nivel de superficie como intracelular tras su activación, fundamentalmente en linfocitos T CD8+. Este fenómeno sugiere una relativa incapacidad para interactuar de manera eficaz con células APCs que expresan CD80 y CD86, y por consiguiente, poseen una capacidad mermada para promover la presentación antigénica y el procesamiento del antígeno (Scrivener S, 2001), siendo la pérdida de coestimulación a través del CD28 uno de los factores más importantes en la inducción de la anergia en células T.

Algunos autores sugieren que este defecto unido a la disminución de la expresión de cadena zeta del TCR antes descrita es el resultado de un estado crónico de activación *in vivo* en los pacientes con LLC-B.

- Niveles reducidos de expresión del antígeno de superficie CD11a, lo que indica una afectación de la adhesión célula-célula (Scrivener S, 2001).
- Expresión reducida de CD25 en la superficie de linfocitos T tras activación (contrario a lo observado en células no activadas en cultivo) lo que sugiere una relativa incapacidad para responder a la estimulación por IL-2, y por tanto una capacidad alterada para controlar la activación T. Sin embargo se ha observado un incremento de su expresión intracelular en células no estimuladas, lo cual correlaciona con el incremento de expresión de CTLA-4 (estado de activación parcial) (Scrivener S, 2001).

En cuanto a las alteraciones funcionales de los linfocitos T en los pacientes con LLC-B caben destacar por un lado el aumento de la capacidad de secreción de citocinas TNF- α , IL-4 e IFN- γ (Reyes E, 1997), con un predominio de un patrón de citocinas Th2 predominando la producción de IL-4 modulado por las células leucémicas y que como se indicó en el apartado de supervivencia de los linfocitos B tiene un papel muy importante en el aumento de supervivencia de estos últimos (de Totero D, 1999).

Los linfocitos T en la LLC-B también se caracterizan por poseer una respuesta proliferativa con estímulos policlonales anormal (Kay NE, 1986; Prieto A, 1993) lo que unido al fenotipo activado sugiere que los linfocitos T se encuentran en esta patología en un estado anérgico (Dianzani U, 1994).

Por último destacar la disminución de los linfocitos T para cooperar en la síntesis de Igs (Kunicka JE, 1988) y una alteración de su capacidad supresora si bien hay trabajos donde ésta está aumentada (Kunicka JE, 1988) o disminuida (Fernández LA, 1981).

Otro de los compartimentos del sistema inmune que presenta alteraciones importantes son las células NK, las cuales presentan porcentajes disminuidos en sangre periférica (Bulliré F, 1988) debido (al igual que ocurría con los linfocitos T) al aumento en sangre de los linfocitos B leucémicos. Por otro lado se ha demostrado incrementos de células NK CD56+CD16- así como de células NK que expresan HLA-DR en algunos pacientes con LLC-B (Frolova EA, 1995).

En cuanto a la funcionalidad de las células NK también se ve afectada, concretamente las células NK en la LLC-B poseen su capacidad citotóxica disminuida afectándose tanto su capacidad para ser activadas como para lisar dianas apropiadas (Ziegler-Heitbrock HW, 1981; Álvarez-Mon M, 1987). No obstante este defecto parece revertir con la administración *in vitro* de moléculas inmunomoduladoras como son el IFN- α y/o la IL-2 produciendo un aumento de su actividad lítica (Foa R, 1984).

Señalar que la aparición en los pacientes de LLC-B de infecciones, hipogammaglobulinemia y de una incidencia incrementada de tumores secundarios se ha relacionado con la afectación de la actividad citotóxica descrita para las células NK en estos pacientes (Kay NE, 1989). Las células NK CD16+ de los pacientes con hipogammaglobulinemia son capaces de inhibir la secreción de Ig inducida por mitógenos por linfocitos B normales. Las células dianas asesinadas por citotoxicidad celular debido a activación podrían ser eliminadas debido a la pérdida de expresión de CD16 en las células NK CD56+ en estos pacientes. Esta pérdida de señalización a través del CD16 podría contribuir, junto con la hipogammaglobulinemia, a las respuestas disminuidas de citotoxicidad celular debido a activación de las células NK y así impedir la actividad lítica y secreción de citocinas como TNF- α (Lee RK, 1996).

Señalar que también los monocitos y células dendríticas presentan algunas alteraciones. En el caso de los monocitos los pacientes con LLC-B presentan un aumento de la expresión de antígenos de activación como HLA-DR, receptores del complemento (CR3) y receptores para la porción Fc de las IgG (Flieger D, 1988). Las células dendríticas en los pacientes de LLC-B en principio poseen una capacidad normal, pero se ha comprobado que la producción de citocinas es anormal, encontrándose aumentada la expresión de los genes de las citocinas IL-10, IL-1 β e IL-12p35 y disminuida la del IFN- γ , pudiendo indicar un estado de preactivación *in vivo* que podría desempeñar un papel regulador en la patología de la enfermedad. Además se ha demostrado que la MFI de las moléculas CD80 y MHC-I son superiores en los pacientes respecto de los controles (Rezvan MR, 2001). No obstante hay autores que indican una profunda alteración de las células dendríticas mostrándose una población celular inmadura al carecer del antígeno de maduración CD83 y de la molécula CD80 por lo que constituyen una población incapaz de estimular correctamente a los linfocitos T (Orsini E, 2003).

Por último indicar que las alteraciones de otros compartimentos celulares no sólo se limitan a la propia enfermedad en sí, sino que muchas de estas alteraciones correlacionan con los diferentes estadios y/o variantes de la enfermedad y por tanto se puede hablar de alteraciones progresivas relacionadas con el peor pronóstico de la enfermedad.

Así se ha demostrado una asociación entre el fenotipo de linfocitos T y la masa tumoral, observándose una alteración en la relación de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺, existiendo aumentos de porcentajes de linfocitos T CD8⁺ y CD8⁺CD45RO⁺ en pacientes con BLC bajo y aumentos de linfocitos T CD4⁺ y CD4⁺CD45RO⁺ en pacientes con BLC alto afectándose el ratio CD4/CD8, el cual está alterado notablemente, correlacionando con la masa tumoral (Prieto A, 1997). También existe una expansión de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CD45RO⁺ en los enfermos con LLC-B que es mucho mayor en los estadios II-IV de Rai (Peller S, 1991). Además se observan alteraciones en los fenotipos de los linfocitos T asociados a la clasificación morfológica de la LLC-B, dándose en aquellos pacientes de morfología atípica disminuciones del ratio CD4/CD8 e incrementos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan CD45RO⁺ y disminuciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan CD45RA⁺ (Reyes E. 1997).

Por otro lado también se ha observado un incremento progresivo del porcentaje de linfocitos T reguladores con fenotipo CD4+CD25+ con respecto a los estadios de Binet (Beyer M, 2005).

En el caso del grado de activación de los linfocitos T según la expresión de HLA-DR, ya comentada con anterioridad, también se muestra una correlación positiva con el grado de progresión de la enfermedad (Totterman TH, 1989) y con el valor de BLC (Prieto A, 1997). Para el caso del marcador de activación CD25 se observan en pacientes de LLC-B de morfología atípica porcentaje de linfocitos T CD25+ superiores a los pacientes de LLC-B típica. En el caso de la expresión reducida de la cadena zeta del TCR (también anteriormente indicada) muestra una correlación con el estadio clínico de los pacientes, pudiendo incluso normalizarse tras el tratamiento adecuado (Rossi E, 1996).

Por último recordar que en el apartado dedicado a los factores pronósticos, como ya se indicó, los niveles de muchas citocinas correlacionaban con diferentes estadios de la enfermedad lo cual es indicativo de un estado alterado de todo el sistema inmune.

OBJETIVOS

Los pacientes con LLC-B tienen una media de supervivencia de 10 años, si bien de manera individual presentan un pronóstico muy variable. Así mientras en algunos pacientes la enfermedad es indolente y su esperanza de vida no se ve modificada por la LLC-B, en otros la progresión es rápida y la supervivencia después del diagnóstico se encuentra por debajo de los dos años (Rai KR, 1975; Binet JL, 1981). Esta heterogeneidad hace necesario que los pacientes se encuentren clasificados por grupos de diferente pronóstico que permitan no sólo predecir la evolución de la enfermedad sino también tomar las decisiones terapéuticas adecuadas.

Los sistemas de clasificación en estadios de Rai y Binet tienen ciertas limitaciones a la hora de pronosticar el curso de la enfermedad en algunos pacientes. Hay que tener en cuenta que la evolución de los pacientes depende en gran medida de una compleja relación entre las características del paciente (edad, sexo, morbilidad), la enfermedad (características moleculares y biología del propio tumor) así como la respuesta de la enfermedad al tratamiento. Siendo los estadios clínicos sólo uno de los componentes de esta compleja relación (Montserrat E, 2008). Por su parte los factores con valor pronóstico (infiltración de médula ósea, número y morfología de linfocitos en sangre, tiempo de duplicación linfocitaria y los diversos parámetros moleculares estudiados) reflejan de manera muy concisa la diversidad biológica de la enfermedad y permiten separar de forma más adecuada a los pacientes según el curso de la enfermedad.

Dentro de los diferentes parámetros moleculares estudiados para predecir la evolución de la enfermedad, la expresión de ZAP-70 por parte de las células B leucémicas se presenta como uno de los mejores factores pronósticos dada la alta correlación existente con el estado mutacional de la IgVH (Chen L, 2002; Crespo M, 2003; Wiestner A, 2003, Orchard JA, 2004) y su sencilla determinación en el laboratorio por diferentes técnicas (Crespo M, 2003; Wiestner A, 2003; Carreras J, 2005; Catherwood MA, 2006).

Los mecanismos patogénicos de la LLC-B se conocen de forma parcial. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de alteraciones en los compartimentos linfocitarios y de células accesorias que no han sufrido la transformación leucémica. Estos hallazgos han sugerido la existencia de alteraciones en la distribución de las grandes poblaciones linfocitarias T y NK además de anomalías en su capacidad funcional.

Sin embargo no se ha establecido el carácter universal de la afectación linfocitaria T y NK y de células dendríticas o de forma preferencial de algunas de sus subpoblaciones. Tampoco se conoce la posible relación entre el patrón de afectación de estos compartimentos de células del sistema inmunes sin transformación leucémica con la evolución de la enfermedad y consiguientemente con factores pronósticos biológicos.

Es factible plantear que existan afectaciones preferenciales de subpoblaciones linfocitarias T y NK, y de células dendríticas, siendo diferentes en pacientes con distintas anomalías moleculares relacionadas con el pronóstico de la enfermedad. La existencia de diferentes patrones de anomalías biológicas en el sistema inmune de los pacientes con LLC-B podría contribuir a comprender la variabilidad de la enfermedad y su potencial relevancia en la patogenia de la expansión clonal leucémica.

Con estos fundamentos nos planteamos investigar en sangre periférica de pacientes con LLC-B clasificados por la expresión en las células leucémicas de ZAP-70 y de controles sanos:

1. Distribución de las poblaciones monocitarias, de células dendríticas, de linfocitos B, linfocitos T y de células NK.
2. Supervivencia y apoptosis de los linfocitos T.
3. Capacidad de producción de citocinas de los linfocitos T.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO.

El estudio de esta tesis se realizó con muestras de sangre periférica obtenidas de un total de 34 pacientes diagnosticados de LLC-B en base a los criterios clínicos, morfológicos e inmunológicos del IWCLL (International Workshop on Chronic Lymphatic Leucemia). Los pacientes provenían del Servicio de Hematología del Hospital Universitario “La Paz” (Madrid) y del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Guadalajara (Guadalajara). Todos los pacientes incluidos en este trabajo se encontraban en los estadios A de Binet y 0 de Rai en el momento del estudio. Se excluyeron de este trabajo los pacientes diagnosticados de LLC-B que pudiesen presentar una patología asociada que alterase al sistema inmune. En concreto no se incluyeron pacientes que presentasen otras enfermedades inmunológicas sistémicas u órgano-específicas, que hubieran sufrido un cáncer o tuviesen un proceso maligno concurrente, infecciones virales, bacterianas o parasitarias crónicas, insuficiencia renal, hepática, cardíaca o respiratoria moderada-grave, diabetes mellitus, inmunodeficiencias primarias o malnutrición. También se excluyeron pacientes con LLC-B que estuvieran recibiendo tratamiento con potencial actividad sobre el sistema inmune en los tres últimos meses. A su vez se estudiaron paralelamente un total de 18 controles sanos de edad y sexo similar a los pacientes incluidos en el estudio. Las características de edad y sexo tanto de pacientes como de controles se detallan a continuación en la tabla 1.1.

Tabla 1.1: Características de edad y sexo de pacientes con LLC-B y controles sanos.

Pacientes con LLC-B n=34	ZAP-70			
	ZAP-70 negativo n=18		ZAP-70 positivo n=16	
	sexo	edad	sexo	edad
	hombre n= 7	67 (44 – 84)	hombre n= 7	65 (47 – 83)
	mujer n= 11	80 (61 – 92)	mujer n= 9	71 (61 – 80)
Controles n=18	sexo		edad	
	hombre n= 6	69 (43 – 85)		
	mujer n= 12	77 (65 – 94)		

Se representa la mediana y el rango de la edad de los diferentes grupos estudiados.

La categorización de los pacientes según la expresión de ZAP-70 fue realizada en nuestro laboratorio a través del estudio de la expresión de ZAP-70 por citometría de flujo de 4 colores según se detalla más adelante.

2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Tras el consentimiento informado de los pacientes, se procedió a la extracción de 20-30 ml de sangre periférica en tubos de heparina-Li (BD Vacutainer®, tubos vacutainer 16x100mm, LH 170 IU, 10 ml, Becton Dickinson. Vacutainer Systems N.J., USA) por punción venosa antecubital. Dichas muestras se procesaron en condiciones de esterilidad el mismo día de su extracción en las 2 horas posteriores a su extracción manteniéndose las muestras durante este tiempo a 4°C para su transporte desde el hospital.

3. SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.

Para la separación de células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) se procedió en primer lugar a la dilución de la sangre heparinizada en proporción 1:1 (volumen/volumen) con suero salino fisiológico 0.9% (Fresenius-Kabi, Barcelona, España) en tubos de propileno de 50 ml con fondo cónico (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ, EEUU). Indicar que todo el proceso de separación de PBMCs se llevo a cabo en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar vertical (Gelaire TC 48, Flows labs, Alemania).

A continuación se procede a la separación de las células mononucleares por gradiente de densidad en Ficoll. Esta técnica se basa en las diferencias de densidad de los distintos componentes de la sangre (eritrocitos, PBMCs y suero) (Boyum A. 1968). Para ello, en tubos de 50ml, se depositó la sangre anticoagulada y diluida 1:3 (vol/vol) en Ficoll-Hypaque (Lymphoprep Axis-Shield Poc AS., Oslo, Noruega) mediante una bomba de aire para pipeteo “pipetus” (Flow Lab, Alemania) y pipetas de plástico de 10 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). A continuación se procedió a una centrifugación gradual (protocolo modificado de Boyum A. 1968 por el laboratorio) en una centrífuga refrigerada (GS-GR, Beckman, Reino Unido). Tras la separación se obtienen tres fases y en la interfase Ficoll-suero se sitúa una banda blanca correspondiente a las CMSPs, que se extrajo y se depositó en un tubo limpio de 50 ml.

Una vez obtenida la banda, se procedió al lavado de las CMSPs con el objeto de eliminar restos de Ficoll, que resultan tóxicos para las células. Para ello, se añadió suero salino fisiológico (Fresenius Kabi, Barcelona, España) hasta completar el volumen del tubo, se centrifugó a 450 x g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante por decantación (proceso de lavado). Se resuspendió el precipitado y se repitió el proceso de nuevo. Finalmente, las células se diluyeron en medio de cultivo completo RPMI 1640 (Whitaker Bioproducts, Verviers, Bélgica) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY, USA), HEPES 25mM (Whitaker Bioproducts, Verviers, Bélgica) y 1% de penicilina-estreptomina (Whitaker Bioproducts, Verviers, Bélgica) para su posterior recuento y estudio de la viabilidad (Current Protocols in Immunology, 1992).

4. RECuento Y ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR.

En todas las suspensiones celulares se determinó la concentración celular y la viabilidad mediante la dilución con Azul Tripán al 0.1% (Sigma) y recuento con microscopio óptico a 40x aumentos (Olympus CHS-2, Tokio, Japón) en cámara de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania). La concentración celular fue determinada aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Células/ml} = \text{media de 4 cuadrantes cámara} \times \text{inversa de la dilución} \times 10.000^* \\ *(profundidad \times \text{área}: 0.1\text{mm} \times 1\text{mm}^2 = 0.1\text{mm}^3 = 10^{-3} \text{ ml})$$

El porcentaje de células vivas se estableció por la capacidad de exclusión del colorante ya que las células muertas permeabilizan su membrana y captan el colorante adquiriendo un color azul. Sólo se prosiguió el experimento en aquellos casos en los que la viabilidad celular fue superior a un 90%.

Después de la determinación de la concentración celular, las células se diluyeron a una concentración de 10^6 células/ml en medio completo y se almacenaron en refrigeración (4°C) para su uso inmediato en los distintos protocolos experimentales.

5. ESTUDIO INMUNOFENOTÍPICO.

5.1. Marcaje de superficie.

El estudio inmunofenotípico por marcaje de superficie se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia directa de 4 colores, para la que se utilizaron anticuerpos monoclonales (AcMo) de ratón conjugados con diferentes fluorocromos. Todos los AcMo fueron titulados con anterioridad para asegurar la concentración óptima de marcaje. En cada muestra realizada se incluyeron dos controles de experimento: un control de autofluorescencia de células sin marcar; y un control de unión inespecífica consistente en la incubación de las células con AcMo marcados con fluorocromos de igual isotipo a los empleados en el marcaje específico, pero con regiones Fc no homólogas o irrelevantes, lo que nos permite evaluar la unión inespecífica de los anticuerpos monoclonales empleados en el marcaje (Otten, 1994). El protocolo de marcaje así como los AcMo utilizados y su designación CD, clon, isotipo, fabricante y fluorocromo asociado se exponen a continuación según las diferentes poblaciones celulares estudiadas.

5.1.1. Linfocitos T, B, células NK y TK.

Para el proceso de marcaje, se pipeteó un volumen de 100 μ l de una suspensión celular de 10⁶ células/ml (100.000 células) en tubos de poliestireno de 5ml con fondo redondo “tubos facs” (Becton-Dickinson Labware, NJ, EEUU). A continuación se dispensaron 100 μ l de tampón de lavado compuesto por tampón fosfato salino (phosphate-buffered saline, PBS) suplementado con suero bobino fetal al 1%. Se realizó un lavado con objeto de eliminar restos celulares y medio de cultivo, para esto se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación. Las células, una vez resuspendidas, fueron marcadas con 5 μ l de los AcMo descritos (Tabla 5.1.1.1) según el panel de marcaje (Tabla 5.1.1.2). Posteriormente se incubaron en oscuridad a 4°C durante 20 minutos. Tras el tiempo de incubación se procedió a realizar 1 lavado con 200 μ l de tampón de lavado. Tras éste lavado se añadieron 200 μ l de PBS para su adquisición en el citómetro de flujo de 4 colores FACScaliburTM (Becton-Dickinson, Mountain View, EEUU) mediante el software CellQuestPro 3.7 (Becton-Dickinson) para Macintosh[®].

Tabla 5.1.1.1: AcMo utilizados para la caracterización de linfocitos T, B, células NK y TK.

AcMo	CLON	ISOTIPO	CASA COMERCIAL	FLUOROCROMO
CD3	SK 7	IgG1	BD	Peridin clorofila proteína (PerCP)
CD4	SK 3	IgG1	BD	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD5	CD5-5D7	IgG1	Caltag	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD8	3B5	IgG2a	Caltag	Alofocianina (APC) Ficoeritrina (PE)
CD16	3G8	IgG1,k	Pharmingen	Alexa Fluor 647 (Alexa F 647)
CD19	SJ25-C1	IgG1	Caltag	Alofocianina (APC)
CD21	B-ly4	IgG1	Cytognos	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD23	EBVC5-5	IgG1	BD	Ficoeritrina (PE)
CD25	CD25-3610	IgG1	Caltag	Ficoeritrina (PE)
CD28	CD28.2	IgG1,k	Pharmingen	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD38	HB-7	IgG1	BD	Ficoeritrina (PE)
CD40	LOB7/6	IgG1	Serotec	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD45RA	MEM56	IgG2b	Caltag	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD45RO	UCHL-1	IgG2a	BD Caltag	Alofocianina (APC) Ficoeritrina (PE)
CD56	MY31	IgG1	BD	Ficoeritrina (PE)
CD57	HNK-1	IgM	BD	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD62L	SK11	IgG2a	BD	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD69	L78	IgG1	BD	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD80	L307.4	IgG1	BD	Ficoeritrina (PE)
CD86	BU63	IgG1	Serotec	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD95	DX2	IgG1	BD	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CD154(40L)	89-76	IgG1	BD	Ficoeritrina (PE)
CCR7	150503	IgG2a	R&D Systems	Ficoeritrina (PE)
HLA-DR	L243	IgG2a	BD	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)

CD: cluster de diferenciación definidos en el "7th Workshops on Human Leucocyte Differentiation Antigens.

Tabla 5.1.1.2: Combinación de AcMo utilizados para la caracterización de linfocitos T, B y células NK y TK.

POBLACIÓN	TUBO	FL1	FL2	FL3	FL4
POBLACIONES GENERALES	1	CD4 FITC	CD8 PE	CD3 PerCP	CD19 APC
LINFOCITOS T	2	CD28 FITC	CD40L PE	CD3 PerCP	CD8 APC
	3	CD45RA FITC	CD45RO PE	CD3 PerCP	CD8 APC
	4	CD45RA FITC	CCR7 PE	CD3 PerCP	CD8 APC
	5	CD95 FITC	CD45RO PE	CD3 PerCP	CD8 APC
	6	CD62L FITC	CD25 PE	CD3 PerCP	CD8 APC
CÉLULAS NK Y TK	7	CD57 FITC	CD56 PE	CD3 PerCP	CD8 APC
	8	CD57 FITC	CD56 PE	CD3 PerCP	CD16 Alexa F 647
	9	CD69 FITC	CD56 PE	CD3 PerCP	CD16 Alexa F 647
CÉLULAS B	10	CD21 FITC	CD38 PE	CD3 PerCP	CD19 APC
	11	CD5 FITC	CD23 PE	CD3 PerCP	CD19 APC
	12	HLA-DR FITC	CD40 PE	CD3 PerCP	CD19 APC
	13	CD86 FITC	CD80 PE	CD3 PerCP	CD19 APC

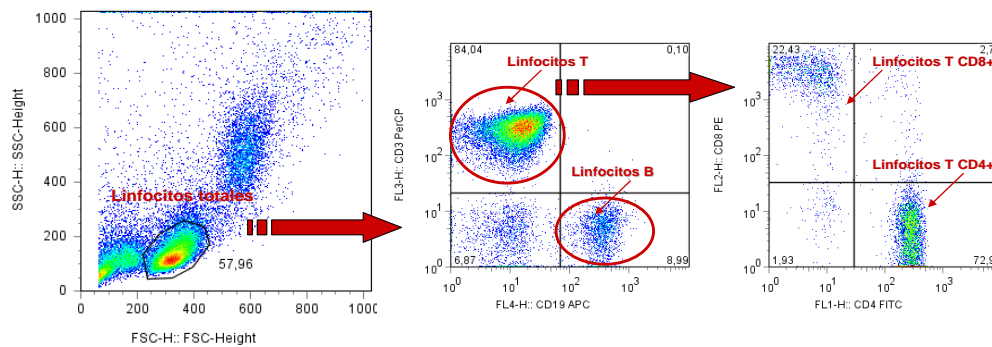
CD: cluster de diferenciación definidos en el “7th Workshops on Human Leucocyte Differentiation Antigens.

Tras su adquisición se procedió al análisis de los datos obtenidos en el citómetro de flujo siguiendo una estrategia de análisis jerárquico mediante los software CellQuestPro 3.7[®] (Becton-Dickinson) para Macintosh[®] y FlowJo 7.2.2 (Tree Star[®]) para Windows[®]. Dicho análisis jerárquico consiste en una selección inicial de la población celular mayoritaria por FSC-SSC (linfocitos) seguida de una selección positiva según los diferentes marcadores poblacionales. Una vez seleccionadas cada una de las poblaciones linfocitarias se procede al estudio de la expresión de los distintos marcadores dentro de cada una de las poblaciones. A continuación se detallan los diferentes análisis jerárquicos realizados para cada una de las poblaciones celulares estudiadas.

- Poblaciones de linfocitos generales:

Se procedió en un primer momento a la selección de la población general de linfocitos por FSC y SSC. Posteriormente se identificaron y seleccionaron los linfocitos T por la expresión de CD3, y dentro de los linfocitos T según la expresión de CD4 y CD8 se identificaron los linfocitos T CD4+ y CD8+ (Figura 5.1.1.1).

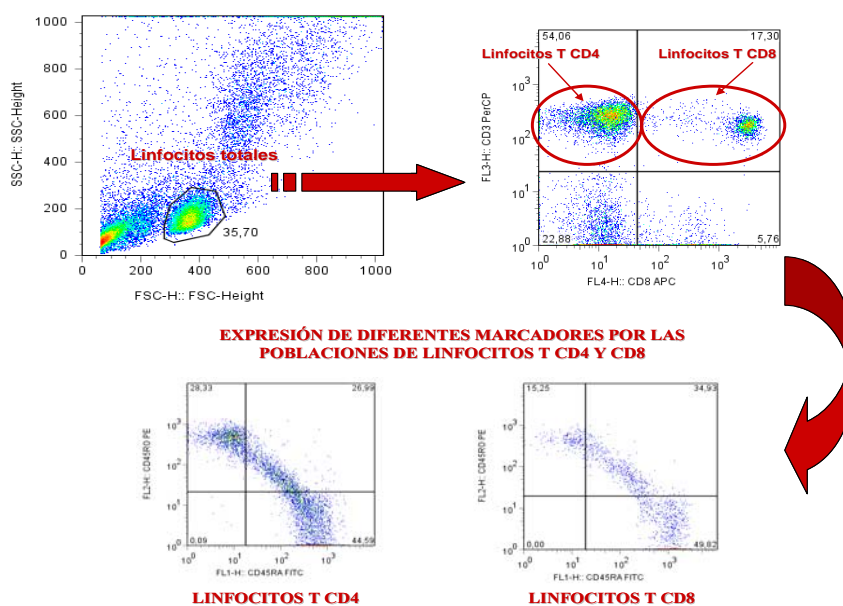
Figura 5.1.1.1: Estudio de poblaciones linfocitarias generales.



- Poblaciones de linfocitos T:

Se procedió en un primer momento a la selección de la población general de linfocitos por FSC y SSC. Posteriormente se realizó la identificación y selección de linfocitos T por la expresión de CD3, y dentro de los linfocitos T según la expresión de CD8 se identificaron y seleccionaron los linfocitos T CD8 y los linfocitos T CD4 (identificados por ser CD3+CD8-). En último lugar se estudió la expresión de diferentes marcadores en las poblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8 (Figura 5.1.1.2).

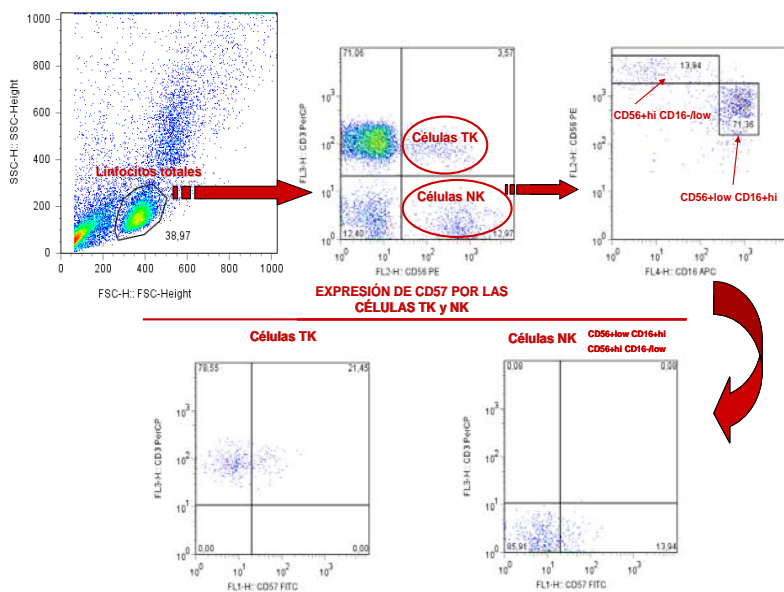
Figura 5.1.1.2: Estudio de linfocitos T.



- Poblaciones de células NK y TK:

Se procedió en un primer momento a la selección de la población general de linfocitos por FSC y SSC. Posteriormente se realizó la identificación y selección de células NK y TK por la expresión de los marcadores CD3 y CD56. Dentro de las células NK (CD3-CD56+) se estudiaron las subpoblaciones de células NK según la diferente intensidad de expresión de los marcadores CD16 y CD56. Por último se analizaron diferentes marcadores de activación en las poblaciones de células TK y NK así como en las subpoblaciones de células NK (Figura 5.1.1.3).

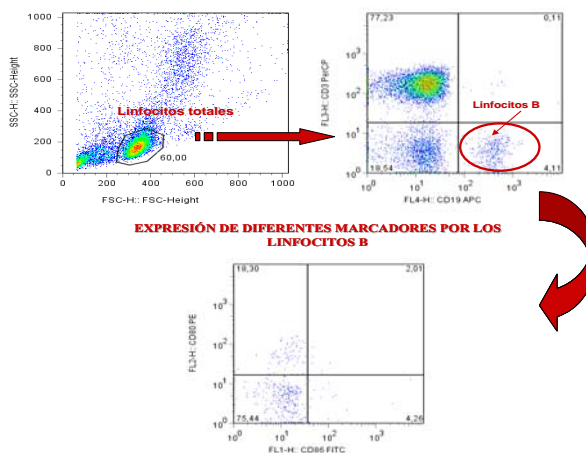
Figura 5.1.1.3: Estudio de células NK y TK.



- Poblaciones de linfocitos B:

Se procedió en un primer momento a la selección de la población general de linfocitos por FSC y SSC. Posteriormente se realizó la identificación y selección de linfocitos B por la expresión de CD19, y dentro de los linfocitos B se estudió la expresión de diferentes marcadores (Figura 5.1.1.4).

Figura 5.1.1.4: Estudio de linfocitos B.



5.1.2. Monocitos.

Para el proceso de marcaje, se pipeteó un volumen de 500µl de una suspensión celular de 10⁶ células/ml (500.000 células) en tubos de poliestireno de 5ml con fondo redondo “tubos facs” (becton-dickinson Labware, NJ, EEUU). A continuación se dispensaron 500µl de tampón de lavado compuesto por tampón fosfato salino (phosphate-buffered saline, PBS) suplementado con suero bobino fetal al 1%. Se realizó un lavado con objeto de eliminar restos celulares y medio de cultivo, para esto se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante por aspiración. Las células, una vez resuspendidas, fueron marcadas con 5µl de los AcMo descritos (Tabla 5.1.2.1) según el panel de marcaje (Tabla 5.1.2.2). Posteriormente se incubaron en oscuridad a 4°C durante 20 minutos. Tras el tiempo de incubación se procedió a realizar 1 lavado con 200µl de tampón de lavado. Tras éste lavado se añadieron 200µl de PBS para su adquisición en el citómetro de flujo de 4 colores FACScaliburTM (Becton-Dickinson, Mountain View, EEUU) mediante el software CellQuestPro 3.7 (Becton-Dickinson) para Macintosh[®].

Tabla 5.1.2.1: AcMo utilizados para la caracterización de monocitos.

AcMo	CLON	ISOTIPO	CASA COMERCIAL	FLUOROCROMO
CD14	MΦP9	IgG2b,k	BD	Peridin clorofila proteína (PerCP)
CD16	3G8	IgG1,k	Pharmingen	Alexa Fluor 647 (Alexa F 647)
CD62L	SK11	IgG2a	BD	Ficoeritrina (PE)
CD80	L307.4	IgG1	BD	Ficoeritrina (PE)
CD86	BU63	IgG1	Serotec	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
CX3CR1	2A9-1	IgG2b,k	MBL	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)

CD: cluster de diferenciación definidos en el “7th Workshops on Human Leucocyte Differentiation Antigens.

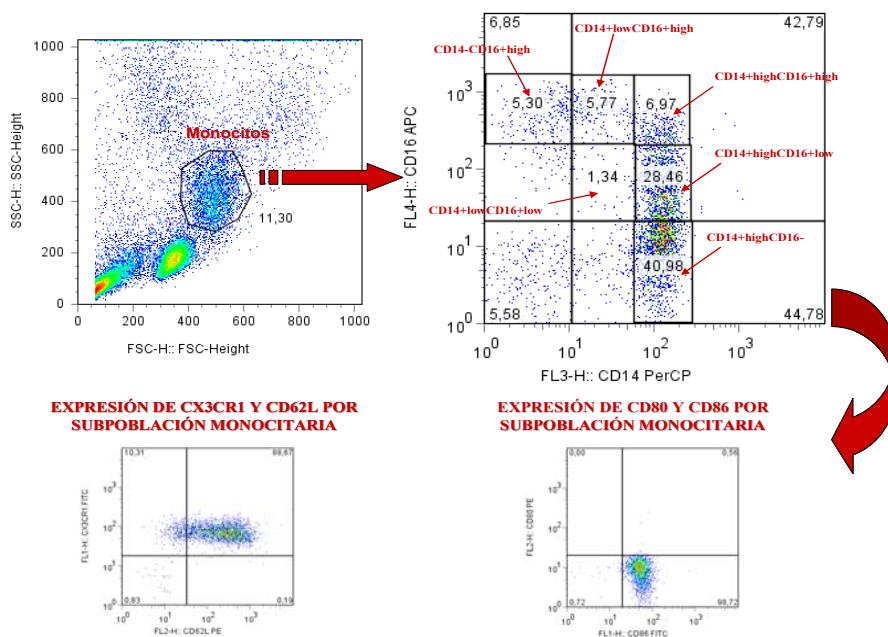
Tabla 5.1.2.2: Combinación de AcMo utilizados para la caracterización de monocitos.

Tubo	FL1	FL2	FL3	FL4
1	CX3CR1 FITC	CD62L PE	CD14 PerCP	CD16 Alexa F 647
2	CD86 FITC	CD80 PE	CD14 PerCP	CD16 Alexa F 647

CD: cluster de diferenciación definidos en el “7th Workshops on Human Leucocyte Differentiation Antigens.

Tras su adquisición se procedió al análisis de los datos obtenidos en el citómetro de flujo siguiendo una estrategia de análisis jerárquico mediante los software CellQuestPro 3.7[®] (Becton-Dickinson) para Macintosh[®] y FlowJo 7.2.2 (Tree Star[®]) para Windows[®]. Dicho análisis jerárquico consistió en una selección inicial de la población celular mayoritaria por FSC-SSC (monocitos) seguida de la identificación y selección de las distintas poblaciones monocitarias según la diferente expresión de los marcadores CD14 y CD16. Una vez seleccionadas cada una de las poblaciones monocitarias se procedió al estudio de la expresión de los marcadores CX3CR1 y CD62L así como CD80 y CD86 dentro de cada una las poblaciones seleccionadas (Figura 5.1.2.1).

Figura 5.1.2.1: Estudio de monocitos.



5.1.3. Células dendríticas.

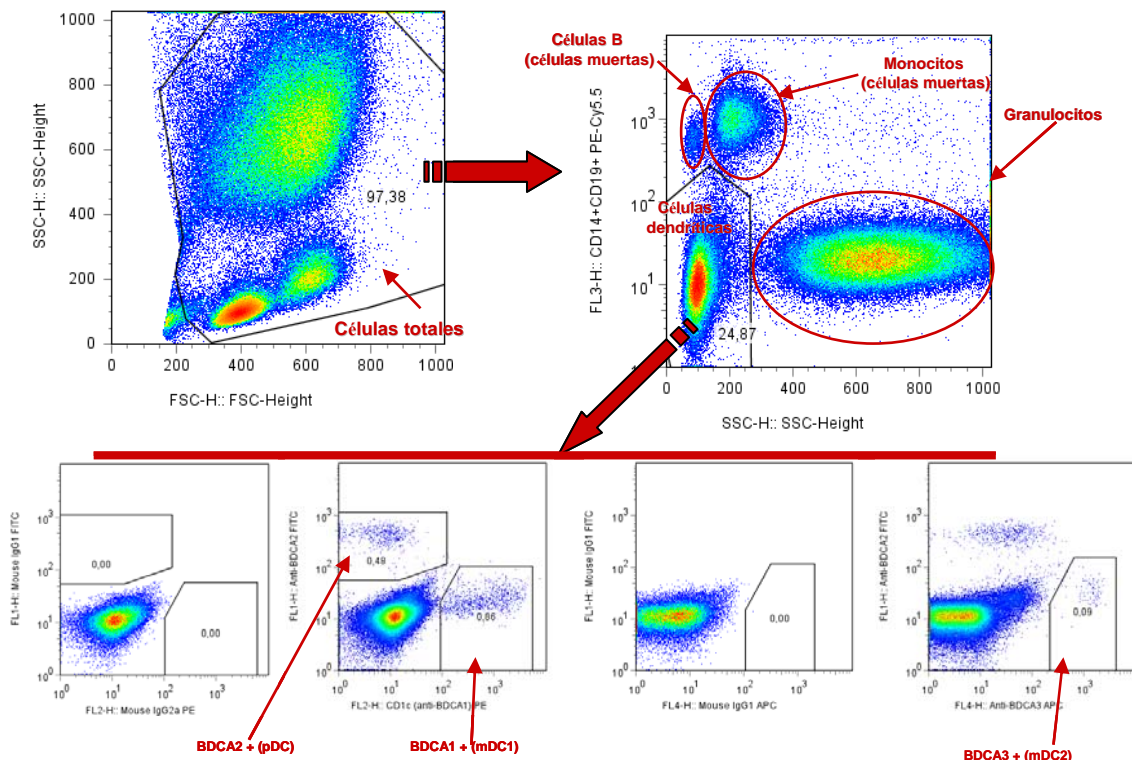
Para la determinación de las células dendríticas de sangre periférica se utilizó un kit de enumeración de células dendríticas sanguíneas (Blood dendritic cell enumeration Kit Miltenyi Biotec-MACS[®], Miltenyi Biotec GmbH, Alemania).

En primer lugar se añadieron 300µl de sangre completa anticoagulada a 2 “tubos facs”, a continuación se añadieron 20µl de Anti-BDCA Cocktail (CD1c: anti-BDCA-1 PE, clon AD5-8E7, isotipo mouse IgG2a; anti-BDCA-2 FITC, clon AC144, isotipo mouse IgG1; anti-BDCA-3 APC, clon AD5-14H12, isotipo mouse IgG1; CD14 PE-Cy5, isotipo mouse IgG2a; CD19 PE-Cy5, isotipo mouse IgG1) en uno de los tubos y 20µl de Control Cocktail (mouse IgG2a PE; mouse IgG1 FITC; mouse IgG1 APC; CD14 PE-Cy5, isotipo mouse IgG2a; CD19 PE-Cy5, isotipo mouse IgG1) al otro tubo.

Posteriormente se añadieron 10µl de Dead Cell Discriminator a cada uno de los tubos y se incubaron en posición horizontal, sobre hielo y bajo una bombilla de luz de 60W (a una distancia de 3-5cm) durante 10 minutos, de esta manera se pueden excluir las células muertas ya que el discriminador de células muertas se compone de una sonda que después de la fotólisis se fija covalentemente a los ácidos nucleicos en células con membranas comprometidas. Tras este tiempo de incubación se añadieron 2ml de Red Blood Cell Lysis Solution a cada uno de los tubos, dejando incubar durante 12 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad agitando los tubos a los 6 minutos de incubación. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 300 x g durante 5 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante por aspiración. A continuación se añadieron a los dos tubos 0.5ml de Red Blood Cell Lysis Solution, incubándose 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente se añadió a cada tubo 2 ml de tampón de lavado (PBS suplementado con suero bovino fetal al 1%) y se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron las células añadiendo 300µl de tampón de lavado, 150µl de Fix Solution y 5µl de Discriminator Stop Reagent a cada tubo, adquiriéndose a continuación los tubos en el citómetro de flujo de 4 colores FACScalibur™ (Becton-Dickinson, Mountain View, EEUU) mediante el software CellQuestPro 3.7 (Becton-Dickinson) para Macintosh®. Tras su adquisición se realizó el análisis de los datos mediante una estrategia de análisis jerárquico con los software CellQuestPro 3.7® (Becton-Dickinson) para Macintosh® y FlowJo 7.2.2 (Tree Star®) para Windows®.

En el análisis jerárquico se procedió a una selección inicial de la población celular por FSC-SSC (linfocitos, monocitos...) seguida de una selección negativa de los marcadores CD19, CD14 y con exclusión de células muertas, y una posterior selección e identificación de las diferentes poblaciones de células dendríticas según sus marcadores específicos (Figura 5.1.3.1).

Figura 5.1.3.1: Estudio de células dendríticas.



5.2. Marcaje intracelular.

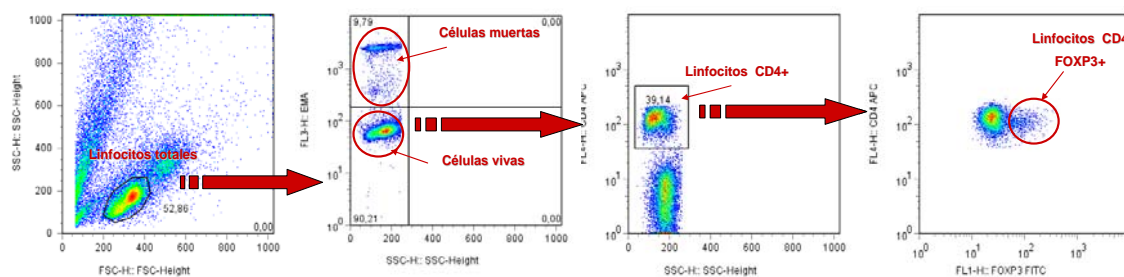
5.2.1. Determinación de células FOXP-3.

Para la determinación de células reguladoras se utilizó un kit de marcaje para células FOXP-3 (FITC-Anti-human-FOXP-3 Staining Set, eBioscience, San Diego, EEUU). En primer lugar se pipeteó un volumen de 500µl de una suspensión células de 10^6 células/ml (500.000 células) en un “tubo facs” procediéndose a centrifugar a 300 x g durante 5 minutos a 4°C, por aspiración se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en tampón de lavado (PBS suplementado con suero bobino fetal al 1%). Posteriormente se realizó un marcaje con 5µl de anti-CD25 PE (clon CD25-3610, isotipo IgG1, Caltag), 5µl de anti-CD4 APC (clon S3.5, isotipo IgG2a, Caltag) y 10µl de la sonda EMA (“Ethidium bromide monoazide”) (Sigma Chemical Co., San Luis, EEUU) para discriminar células muertas. El tubo se incubó en posición horizontal, sobre hielo y bajo una bombilla de luz de 60W (a una distancia de 3-5cm) durante 10 minutos, y luego se incubó otros 10 minutos en oscuridad y a 4°C. A continuación se procedió a realizar un lavado con 1 ml de tampón de lavado (PBS suplementado con suero bobino fetal al 1%) y se centrifugo a 300 x g durante 5 minutos a 4°C, se aspiró el

sobrenadante y se resuspendieron las células con 500µl de solución de fijación del kit (Fix/Perm) incubando durante 35 minutos en oscuridad a 4°C. Después se procedió a un lavado, tras el cual se añadieron 500µl de solución de permeabilización del kit e inmediatamente, tras agitación del tubo, se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos a 4°C. Tras aspirar el sobrenadante se repitió este paso de permeabilización. Seguidamente tras retirar el sobrenadante por aspiración se añadieron 100µl de tampón de permeabilización con suero de rata al 2% incubándose en oscuridad a 4°C durante 15 minutos. Por último se añadieron 20µl de una dilución 1/8 de anti-Human Foxp-3 FITC (clon PCH101, isotipo IgG2a,k) e incubando durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Tras el periodo de incubación se realizaron dos lavados con tampón de lavado y se resuspendieron las células en 300µl de PBS para su adquisición en el citómetro de flujo de 4 colores FACScalibur™ (Becton-Dickinson, Mountain View, EEUU) mediante el software CellQuestPro 3.7 (Becton-Dickinson) para Macintosh®.

Tras su adquisición se realizó el análisis de los datos mediante una estrategia de análisis jerárquico con los software CellQuestPro 3.7® (Becton-Dickinson) para Macintosh® y FlowJo 7.2.2 (Tree Star®) para Windows®. En este caso se realizó una selección por FSC y SSC de la población mayoritaria de linfocitos totales, posteriormente se realizó una selección de células vivas por exclusión de células muertas marcadas con EMA y por último se identificó la población de linfocitos CD4+ y dentro de estos se estudió la expresión de FOXP-3 (Figura 5.2.1.1).

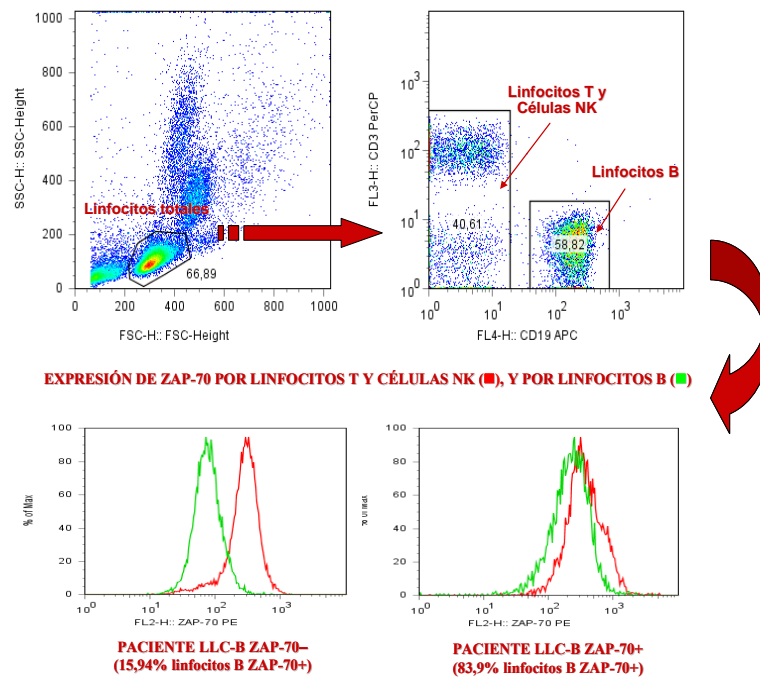
Figura 5.2.1.1: Estudio de expresión de FOXP-3 en linfocitos CD4+.



5.2.2. Determinación de ZAP-70.

La determinación de células ZAP-70 positivas se realizó mediante el marcaje intracelular usando un kit comercial de fijación y permeabilización (kit Fix&Perm, Caltag Laboratories) según protocolo estándar. En primer lugar se dispensaron 500µl de una suspensión celular de 10^6 células/ml (500.000 células) en un tubo de “tubo facs” y se añadieron 500µl de tampón de lavado (PBS suplementado con suero bobino fetal al 1%) y se centrifugó a $300 \times g$ durante 5 minutos a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se procedió a realizar el marcaje superficial con 5µl de anti-CD5 FITC (clon CD5-5D7, isotipo IgG1, Caltag), 5µl de anti-CD3 PerCP (clon SK7, isotipo IgG1, BD) y 5µl de anti-CD19 APC (clon SJ25-C1, isotipo IgG1, Caltag). El tubo se incubó durante 20 minutos en oscuridad a 4°C. Tras la incubación se realizó un lavado con 500µl de tampón de lavado, después de aspirar el sobrenadante se añadieron 50µl de la solución A (fijación) del mencionado kit y se incubó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se procedió después a un lavado con 500µl de tampón de lavado, aspiración del sobrenadante y después se añadieron 50µl de la solución B (permeabilización) del kit y se añadieron 5µl de anti-ZAP-70 (clon 1E7.2, isotipo IgG1,k, de eBioscience, San Diego, EEUU) incubándose 20 minutos en oscuridad a 4°C. Por último se realizó un lavado con 500µl de tampón de lavado y tras aspirar sobrenadante las células se resuspendieron en 200µl de PBS para su adquisición en el citómetro de flujo de 4 colores FACScalibur™ (Becton-Dickinson, Mountain View, EEUU) mediante el software CellQuestPro 3.7® (Becton-Dickinson) para Macintosh®. Tras su adquisición se procedió al análisis de los datos mediante la estrategia de análisis jerárquico con los software CellQuestPro 3.7® (Becton-Dickinson) para Macintosh® y FlowJo 7.2.2 (Tree Star®) para Windows®. En primer lugar se seleccionaron los linfocitos totales por FSC y SSC, a continuación se seleccionaron linfocitos T, B y células NK según la expresión de CD3 y CD19. Posteriormente se estudió la expresión de ZAP-70 en la población conjunta de linfocitos T y células NK, y por otro lado en los linfocitos B. Siguiendo el modelo propuesto por Crespo y cols (Crespo M, 2003), se consideró como paciente con LLC-B ZAP-70+ aquel que presentara más del 20% de linfocitos B positivos para ZAP-70 con respecto al conjunto de linfocitos T y células NK (Figura 5.2.2.1).

Figura 5.2.2.1: Estudio de la expresión de ZAP-70.



6. ESTUDIOS FUNCIONALES.

6.1. Estudio de la apoptosis en células T.

Cuando una célula entra en apoptosis uno de los primeros cambios que se producen en su membrana es el intercambio de lípidos entre las dos capas lipídicas que la forman, la fosfatidil-serina pasa de la cara interna a la cara externa de la membrana. La Anexina-V es una proteína presente en la superficie de células fagocíticas capaz de unirse con una alta especificidad a la fosfatidilserina, esto permite a dichas células reconocer a las células que han entrado en apoptosis y eliminarlas por fagocitosis. De esta manera el uso de Anexina-V conjugada con un fluorocromo nos permite visualizar en un citómetro células en fase de apoptosis. Para el estudio de la apoptosis se cultivaron (por duplicado) 0.5×10^6 de células en presencia de medio completo (determinación apoptosis espontánea) en placas de 96 pocillos fondo en “U” (Sero-Wel, Viví Sterilin Ltd, Stone, Staffs, UK) y se mantuvieron durante 21 horas en un incubador a 37°C y 5% CO₂ (Incubador de CO₂ Hera Cell, Kendro Labs. Products, Hanau, Alemania). A su vez se dispusieron 0.5×10^6 células en 2 tubos “facs” (tubos basales). Tanto los tubos basales así como las células cultivadas durante 21 horas (tras resuspensión y paso a “tubos facs”) se marcaron con 5µl de los AcMo descritos (Tabla

6.1.1) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad. Posteriormente retiramos el medio el cultivo mediante centrifugación a 380 x g durante 10 minutos a 4°C y posterior decantación e incubamos con 5µl de Anexina-V FITC (Bender Medsystem Diagnostic, Viena, Austria) en un volumen añadido de 100 µl de “Hepes buffer” un tampón rico en calcio (Hepes 10mM, NaCl 150nM, MgCl 1mM, CaCl 1.8mM, and KCl 5mM (Sigma Chemical Co., San Luis, EEUU)) a un pH = 7.4 ya que la unión de la anexina V a la fosfatidil-serina es dependiente de calcio. Momentos antes de su adquisición en el citómetro de flujo añadimos 100µl de microbeads (Calibrate beads, Becton&Dickinson Immunocytometry System, San José, EEUU) de una dilución 1/100 en “Hepes buffer” como estándar externo de recuento celular. Señalar la importancia de resuspender muy bien la solución de microbeads antes de añadirla a los tubos y previamente a la adquisición para evitar que se depositen en el fondo de los tubos. Mediante las técnicas disponibles en el software del citómetro detenemos la adquisición de eventos en un número determinado de microbeads (21.000), de esta manera obtenemos un estándar externo constante al que referir los eventos adquiridos y así poder comparar diferentes tiempos y condiciones dentro de un mismo experimento (Prieto A, 2002). La adquisición se realizó en un citómetro de flujo de 8 colores FacsAria™ (Becton-Dickinson, Mountain View, EEUU) mediante el software FacsDiva 5.0.3 (Becton-Dickinson) para Windows®.

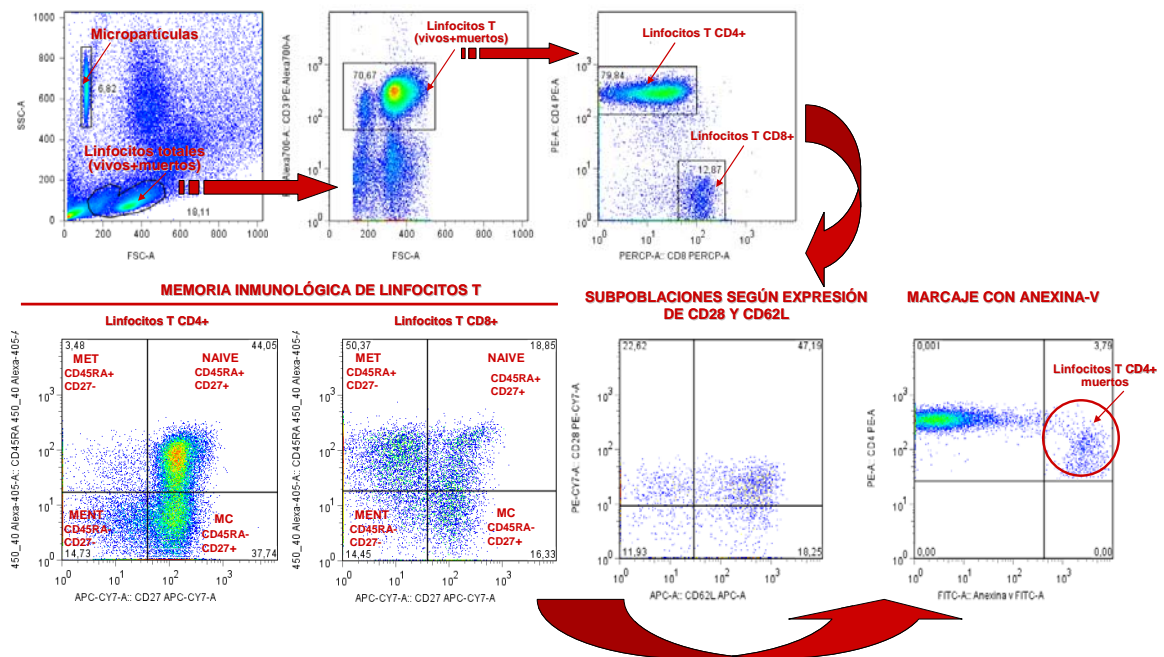
Tabla 6.1.1: Combinación AcMo utilizados para la caracterización de poblaciones linfocitarias en ensayo de apoptosis.

AcMo	CLON	ISOTIPO	CASA COMERCIAL	FLUOROCROMO
CD3	UCHT1	IgG1,k	BD	Alexa 700
CD4	S3.5	IgG2a	Caltag	Ficoeritrina (PE)
CD8	SK1	IgG1	BD	Peridin clorofila proteína (PerCP)
CD27	0323	IgG1,k	eBioscience	Alofocianina-Cyanina 7 (APC-Cy7)
CD28	CD28.2	IgG1,k	eBioscience	Ficoeritrina-Cyanina 7 (PE- Cy7)
CD45RA	MEM-56	IgG2b	Caltag	Pacific Blue (PB)
CD62L	DREG-56	IgG1,k	BD	Alofocianina (APC)

CD: cluster de diferenciación definidos en el “7th Workshops on Human Leucocyte Differentiation Antigens.

Tras la adquisición se procedió al análisis de los datos mediante la estrategia de análisis jerárquico con el software FlowJo 7.2.2 (Tree Star[®]) para Windows[®]. En primer lugar se seleccionaron por FSC y SSC el total de linfocitos (tanto vivos como muertos) y posteriormente de idéntica manera a lo indicado en el estudio inmunofenotípico se procedió a identificar y seleccionar las diferentes poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T, procediendo al estudio del marcaje en dichas poblaciones por Anexina-V (Figura 6.1.1).

Figura 6.1.1: Estudio de expresión de Anexina-V.



Tras su análisis mediante el software adecuado obtenemos el parámetro indicador de apoptosis denominado como *índice de apoptosis (AI)*, que muestra el porcentaje de células apoptóticas respecto a las células totales:

$$AI = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células apoptóticas}}{\text{n}^\circ \text{ de células apoptóticas} + \text{n}^\circ \text{ de células no apoptóticas}}$$

6.2. Estudio del porcentaje de linfocitos T productores de citocinas.

Para determinar la producción de citocinas intracelulares por los linfocitos T incubamos a 37°C y 5% CO₂ un total de 10⁶ células en medio completo (control negativo) con monensina (2µM) (Sigma Chemical Co., San Luis, EEUU), un inhibidor de la síntesis de microtúbulos para bloquear la exocitosis y 10⁶ células en medio completo con monensina (2µM), acetato de 12-forbol 13-miristato PMA (50 ng/ml) (Sigma Chemical Co., San Luis, EEUU) que actúa como estímulo policlonal de células T, e ionomicina (1µg/ml) (Calbiochem-Novabiochem, California, EEUU) que es un ionóforo de calcio para potenciar el efecto del PMA, en tubos de polipropileno de 15ml durante 6h (Falcon, Becton Dickinson Labware, NJ, EEUU). Tras el tiempo de incubación disponemos 500µl (500.000 células) de las células incubadas de cada una de las condiciones indicadas anteriormente en 2 “tubos facs”, añadimos 3ml de tampón de lavado (PBS suplementado con suero bobino fetal al 1%) y se centrifugo a 300 x g durante 5 minutos a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se marcaron las células con 5µl de los AcMo descritos (Tabla 6.2.1) según el panel de marcaje (Tabla 6.2.2) añadiéndose además 1µl de sonda AQUA QDOT560 (Invitrogen) que tiene la propiedad de unirse a los ácidos nucleicos y discriminar células muertas de células vivas fijadas. Posteriormente se incubaron en oscuridad a 4°C durante 20 minutos. Tras el tiempo de incubación se procedió a realizar 1 lavado con 3ml de tampón de lavado y después de aspirar el sobrenadante se añadieron 50µl de la solución A (fijación) del kit comercial de fijación y permeabilización de Caltag y se incubó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se procedió después a un nuevo lavado con 3ml de tampón de lavado, aspiración del sobrenadante y después se añadieron 50µl de la solución B (permeabilización) del kit y se añadieron 5µl de las citocinas correspondientes según el panel indicado incubándose 20 minutos en oscuridad a 4°C. Por último se realizó un lavado con 3ml de tampón de lavado y tras aspirar el sobrenadante las células se resuspendieron en 200µl de PBS para su adquisición en un citómetro de flujo de 8 colores FacsAria™ (Becton-Dickinson, Mountain View, EEUU) mediante el software FacsDiva (Becton-Dickinson) para Windows®.

Tabla 6.2.1: AcMo utilizados para la caracterización de poblaciones linfocitarias y determinación de citocinas intracelulares.

AcMo	CLON	ISOTIPO	CASA COMERCIAL	FLUOROCROMO
CD3	Sk 7	IgG1	BD	Peridin clorofila proteína (PerCP)
CD8	3B5	IgG2a	Caltag	Alexa 405
CD27	0323	IgG1,k	e-Bioscience	Alofocianina-Alexa 750 (APC-Alexa 750)
CD28	CD28.2	IgG1,k	e-Bioscience	Ficoeritrina-Cyanina 7 (PE- Cy7)
CD45RA	MEM-56	IgG2b	Caltag	Alofocianina (APC)
rhIL-2	5344.111	IgG1	BD	Isocianato de fluoresceína (FITC)
rhIL-4	8D4-8	IgG1	BD	Ficoeritrina (PE)
rhIL-10	JES3-9D7	Rat IgG1	Caltag	Ficoeritrina (PE)
rhTNF- α	MAb11	IgG1	BD	Alexa 488
rhINF- γ	B27	IgG1	BD	Alexa 700

CD: cluster de diferenciación definidos en el “7th Workshops on Human Leucocyte Differentiation Antigens.
rh: recombinat human.

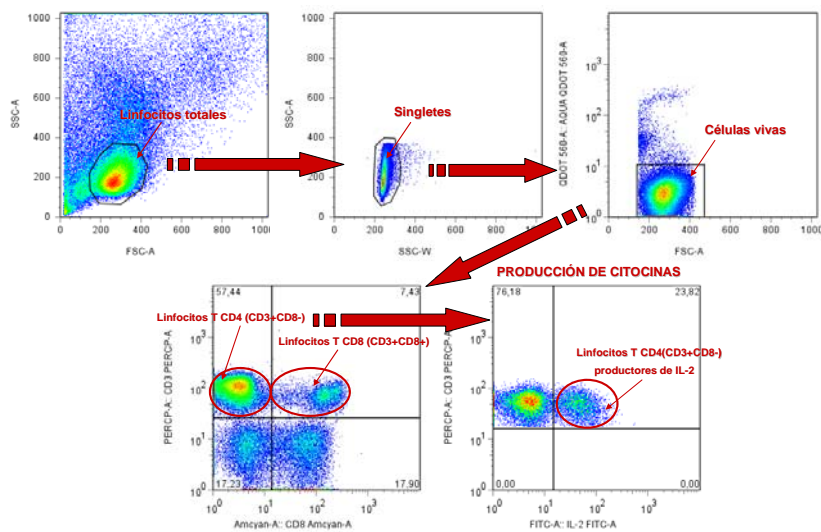
Tabla 6.2.2: Combinación de AcMo utilizados para la caracterización de poblaciones linfocitarias y determinación de citocinas intracelulares.

Tubo	Estímulo	FITC / Alex 488	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	Alex 700	APC-Alex 750	Alex 405
1	Medio	IL-2	IL-4	CD3	CD28	CD45RA	INF- γ	CD27	CD8
2	Medio	TNF- α	IL-10	CD3	CD28	CD45RA	INF- γ	CD27	CD8
3	PMA	IL-2	IL-4	CD3	CD28	CD45RA	INF- γ	CD27	CD8
4	PMA	TNF- α	IL-10	CD3	CD28	CD45RA	INF- γ	CD27	CD8

CD: cluster de diferenciación definidos en el “7th Workshops on Human Leucocyte Differentiation Antigens.

Tras la adquisición se procedió al análisis de los datos mediante la estrategia de análisis jerárquico con el software FacsDiva 5.0.3 (Becton-Dickinson) para Windows®. En primer lugar se seleccionaron por FSC y SSC la población mayoritaria de linfocitos, a continuación se descartaron los dobletes, posteriormente se identificaron y seleccionaron las células vivas según el marcaje de la sonda AQUA. Después se procedió a la identificación y selección de linfocitos T CD4 y T CD8 según el marcaje por CD3 y CD8 identificando a los linfocitos T CD4 por el marcaje (CD3+CD8-). Dentro de los linfocitos T CD4 y CD8 se identificaron las diferentes subpoblaciones según la expresión de CD45RA y CD27 y por último se estudió el porcentaje de células productoras para las distintas citocinas en cada población y subpoblación celular (Figura 6.2.1).

Figura 6.2.1: Estudio del porcentaje de linfocitos T productores de citocinas.



7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

En primer lugar se procedió a analizar la naturaleza de la distribución de nuestros datos empleando el contraste de normalidad de *Kolmogorov-Smirnov*. Los datos obtenidos no mostraron distribuciones normales, razón por la cual las comparaciones estadísticas entre los grupos de pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺, así como con controles sanos se realizaron empleando el Test no-paramétrico de *U de Mann-Whitney*. En todos los casos, se tuvo en consideración el nivel de significación por debajo del 5% ($p < 0.05$). Los resultados mostrados tanto en tablas como en figuras de este trabajo se expresan como *mediana* y rango intercuartílico (*percentiles 25 y 75*) de los datos. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 11.0 (Chicago, IL) para Windows[®]. Las gráficas se realizaron mediante el programa de gestión de gráficos SigmaPlot 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) para Windows[®].

8. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.

La principal fuente de información empleada en este trabajo ha sido la base de datos electrónica “*Medline*”, accesible en la siguiente dirección:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.Pubmed>.

La búsqueda se realizó mediante la introducción de palabras clave en inglés relacionadas con el tema a estudiar. Algunas de estas palabras clave utilizadas fueron: B-cell chronic lymphocytic leukaemia, ZAP-70, immunotherapy, T-cell function, T-regulatory lymphocytes, prognosis, apoptosis.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs) DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON LLC-B AGRUPADOS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.

Las células dendríticas (DCs) son un tipo celular que realiza una función importante en la activación de los linfocitos T, siendo fundamentales en la respuesta inmune. El análisis inmunofenotípico de la expresión de los marcadores BDCA en las células dendríticas nos permitió determinar las subpoblaciones de DCs mieloides tipo I (mDC1), tipo II (mDC2) y plasmacitoides (pDC), tal como describimos en el apartado de materiales y métodos. Este análisis detectó diferencias significativas en el número absoluto (número de células/ml de sangre) en todas las subpoblaciones de DCs entre los diferentes grupos de pacientes con LLC-B estudiados y los controles sanos (Figura 1.1). En el caso de las células mDC1 se observa una disminución significativa en su número absoluto en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los ZAP-70- y a los controles sanos (Figura 1.1, panel A). Sin embargo, el número absoluto de células mDC2 está significativamente elevado en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (Figura 1.1, panel B).

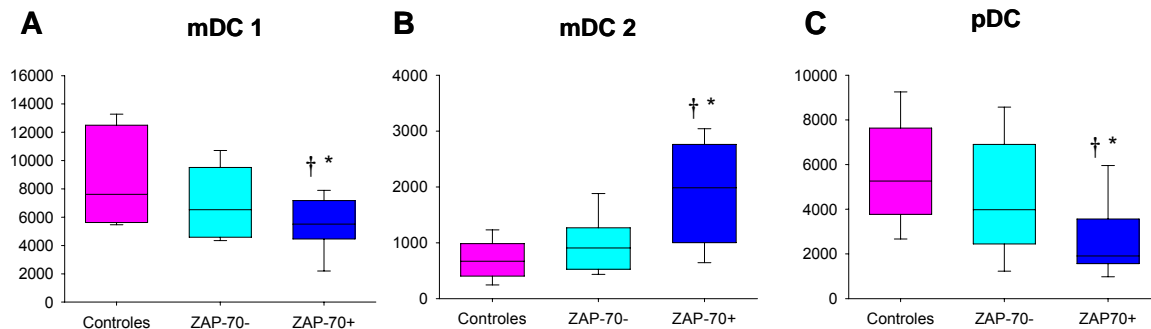


Figura 1.1: Número absoluto (n° de células/ml) de células dendríticas (DCs) en sangre periférica.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (células/ml) en sangre periférica de las subpoblaciones de células dendríticas mieloides tipo I mDC1 (panel A), mieloides tipo II mDC2 (panel B) y plasmacitoides pDC (panel C) en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

En el caso de las células pDC se detectó una disminución significativa de su número absoluto en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto al grupo de controles sanos y de los pacientes ZAP-70- (Figura 1.1, panel C).

➤ Los pacientes con LLC-B ZAP-70+ tienen un incremento significativo del número de células dendríticas mieloides tipo II (mDC2) y una disminución significativa del número de células dendríticas mieloides tipo I (mDC1) y del número de células dendríticas plasmacitoides (pDC) respecto a los pacientes con LLC-B ZAP-70- y los controles sanos.

2. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON LLC-B AGRUPADOS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.

Los monocitos comprenden un tipo celular importante en la protección frente a los agentes infecciosos, además de poder desempeñar cierta actividad antitumoral. Un primer análisis del compartimento monocitario (Tabla 2.1) nos muestra un descenso significativo del número de monocitos circulantes en los pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos independientemente de la expresión de ZAP-70. Señalar que dicho descenso es más marcado en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ los cuales a su vez muestran valores significativamente menores respecto a los pacientes ZAP-70-.

Tabla 2.1: Número absoluto (n° de células/ μ l) de monocitos en sangre periférica.

		Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
Monocitos	Número absoluto	568,76 (395,25 – 640,26)	399,28 (267,61 – 494,13)	354,29 (236,41 – 424,16)
			*	†*

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/ μ l) en sangre periférica de monocitos en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

A continuación se estudiarán el número absoluto y el porcentaje de las diferentes subpoblaciones monocitarias dependiendo de la expresión de los marcadores CD14 y CD16 en sus diferentes intensidades. A su vez se estudiarán en las distintas subpoblaciones monocitarias la expresión de las moléculas CX3CR1 y CD62L, así como de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, para evaluar tanto la capacidad de migración-extravasación como su capacidad coestimuladora y actividad presentadora de antígenos.

2.1. Estudio fenotípico de los monocitos CD14–CD16^{hi} de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.

Los monocitos que expresan CD14–CD16^{hi} se corresponden con una subpoblación monocitaria con peculiaridades fenotípicas y funcionales que les asemejan a células dendríticas. Al realizar el estudio de esta subpoblación monocitaria observamos que los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ muestran aumentos significativos tanto en el número absoluto como en el porcentaje de esta subpoblación respecto a los pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y los controles sanos (Figura 2.1.1).

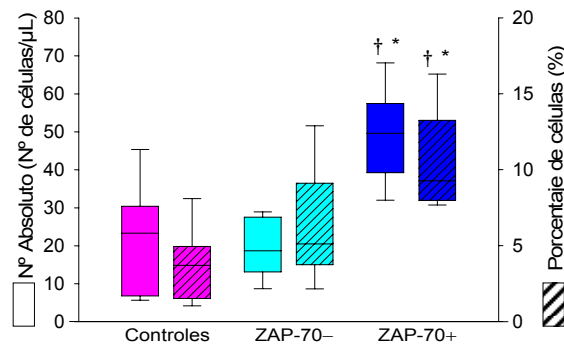


Figura 2.1.1: Número absoluto (nº de células/µL) y porcentaje de la subpoblación monocitaria CD14–CD16^{hi}.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ – P₇₅) del número absoluto (nº de células/µL) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14–CD16^{hi} en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y pacientes con LLC-B ZAP-70⁺. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo pacientes ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

En esta subpoblación monocitaria se estudio su potencial de migración a través de la expresión del receptor para fractalkina CX3CR1 y la L-selectina CD62L que nos permiten evaluar la capacidad migratoria de los monocitos. Respecto a la expresión de CX3CR1/CD62L (Tabla 2.1.1), indicar que no hay diferencias significativas en los valores de su número absoluto y porcentaje entre los controles sanos y pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ a excepción del número absoluto de monocitos CD14–CD16^{hi} CX3CR1⁺CD62L⁻ donde los pacientes ZAP-70⁻ duplican de forma significativa el número de células con respecto a los controles sanos.

Las mayores diferencias existentes entre controles sanos y pacientes radican en los valores comparados entre los primeros y los pacientes con LLC-B ZAP-70+, donde se aprecia en los pacientes un incremento significativo (que llega a duplicar los valores del control) del número absoluto de monocitos CD14-CD16^{hi} que expresan CX3CR1 de forma independiente a la coexpresión de CD62L. Por otro lado, en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ el número absoluto de monocitos que no expresan el marcador CX3CR1 está disminuido respecto a los controles sanos, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas existiendo éstas en sus porcentajes los cuales también disminuyen respecto a los controles sanos.

Al comparar los pacientes de LLC-B ZAP-70- con los ZAP-70+ constatamos un aumento significativo tanto en número absoluto como en porcentaje de la subpoblación CD14-CD16^{hi}CX3CR1+CD62L+. Por el contrario la subpoblación CD14-CD16^{hi}CX3CR1-CD62L- y la subpoblación CD14-CD16^{hi}CX3CR1-CD62L+ se encuentran disminuidas significativamente en sus porcentajes en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto de los otros grupos objeto de estudio.

Tabla 2.1.1: Número absoluto (n° de células/ μ l) y porcentaje de monocitos CD14-CD16^{hi} que expresan CX3CR1 y/o CD62L.

		Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CX3CR1+CD62L-	Número absoluto	8,83 (3,86 - 16,03)	16,70 (5,66 - 23,63)	17,63 (9,63 - 25,54)
	%	54,85 (35,07 - 65,02)	66,86 (46,16 - 75,50)	60,30 (45,33 - 79,14)
			*	*
CX3CR1+CD62L+	Número absoluto	4,48 (1,90 - 10,17)	4,33 (1,05 - 9,04)	9,95 (7,28 - 11,33)
	%	27,93 (11,78 - 56,79)	17,33 (7,62 - 21,50)	34,18 (11,95 - 43,01)
				†*
CX3CR1-CD62L-	Número absoluto	1,53 (0,28 - 8,33)	2,15 (0,42 - 4,08)	0,68 (0,47 - 4,24)
	%	9,53 (3,58 - 17,63)	8,60 (1,62 - 21,65)	2,33 (0,72 - 9,70)
				†*
CX3CR1-CD62L+	Número absoluto	1,20 (0,29 - 2,82)	1,80 (0,59 - 3,86)	0,85 (0,28 - 3,89)
	%	7,48 (2,36 - 10,74)	7,20 (1,93 - 12,55)	2,94 (1,33 - 5,76)
				†*

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/ μ l) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14-CD16^{hi} según la expresión de los marcadores CX3CR1 y CD62L en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos CD14-CD16^{hi}.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

Respecto a la expresión de CD86/CD80 (Tabla 2.1.2), las diferencias existentes más notables se dan en el número absoluto y en el porcentaje de la subpoblación de monocitos CD14-CD16^{hi}CD86+CD80- y CD14-CD16^{hi}CD86-CD80-. En el caso de la subpoblación que expresa CD86, ambos grupos de pacientes muestran con respecto a los controles sanos un aumento estadísticamente significativo de su número absoluto y de su porcentaje. Siendo los pacientes con LLC-B ZAP-70+ los que presentan el número absoluto significativamente elevado respecto de los pacientes ZAP-70-. Por el contrario, en la subpoblación que no expresa CD86 se observan disminuciones significativas tanto del número absoluto como del porcentaje en los dos grupos de pacientes respecto a los controles sanos.

Tabla 2.1.2: Número absoluto (n° de células/μl) y porcentaje de monocitos CD14-CD16^{hi} que expresan CD86 y/o CD80.

		Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD86+CD80-	Número absoluto	6,62 (3,40 - 10,68)	13,27 (7,27 - 26,26)	21,78 (13,63 - 39,15) † *
	%	34,99 (30,69 - 43,80)	77,14 (51,03 - 86,96)	79,80 (14,54 - 87,29) *
CD86+CD80+	Número absoluto	0,32 (0,05 - 0,77)	0,18 (0,08 - 0,67)	0,22 (0,01 - 0,40)
	%	1,94 (0,77 - 3,43)	0,95 (0,57 - 2,71)	0,87 (0,18 - 2,14)
CD86-CD80-	Número absoluto	13,70 (3,06 - 18,76)	4,75 (2,93 - 7,56)	4,76 (2,76 - 12,90) *
	%	61,45 (54,61 - 65,19)	20,89 (11,72 - 45,69)	19,22 (6,53 - 35,94) *
CD86-CD80+	Número absoluto	0,22 (0,00 - 0,46)	0,02 (0,00 - 0,13)	0,05 (0,01 - 0,41)
	%	1,03 (0,02 - 1,44)	0,11 (0,04 - 0,63)	0,20 (0,01 - 0,51)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ - P₇₅) del número absoluto (n° de células/μl) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14-CD16^{hi} según la expresión de los marcadores CD86 y CD80 en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos CD14-CD16^{hi}.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles y pacientes con LLC-B.

- Los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presentan un aumento significativo tanto del número absoluto como del porcentaje de la subpoblación monocitaria CD14-CD16^{hi} respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos.
- Esta subpoblación se caracteriza por la gran expresión de CX3CR1+CD62L+ y CD86+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos.

2.2. Estudio fenotípico de los monocitos CD14^{hi}CD16⁻ de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.

Una de las subpoblaciones monocitarias más importantes y abundantes en sangre son los denominados “monocitos clásicos” que expresan CD14 en alta intensidad y carecen de la expresión de CD16 (CD14^{hi}CD16⁻). El estudio comparativo del número absoluto y del porcentaje de monocitos de esta subpoblación nos muestra una disminución significativa en ambos valores en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y el grupo de controles sanos, compartiendo estos dos últimos grupos valores similares en el número absoluto y en el porcentaje para dicha subpoblación monocitaria (Figura 2.2.1).

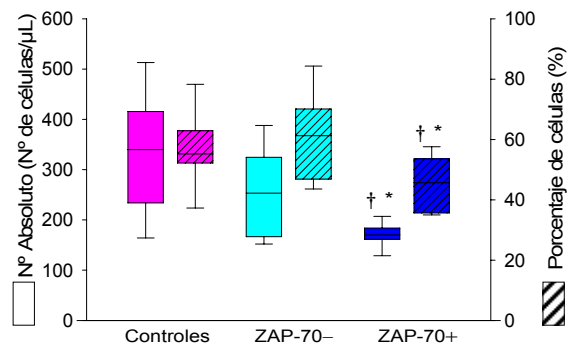


Figura 2.2.1: Número absoluto (nº de células/µl) y porcentaje de la subpoblación monocitaria CD14^{hi}CD16⁻.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ – P₇₅) del número absoluto (nº de células/µl) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16⁻ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y pacientes con LLC-B ZAP-70⁺. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo pacientes ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

En este caso también se procedió al estudio tanto del receptor de la fractalkina como de CD62L por parte de la subpoblación monocitaria CD14^{hi}CD16⁻ (Tabla 2.2.1). En nuestro trabajo podemos observar una disminución significativa en el número absoluto y en el porcentaje de la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16⁻CX3CR1⁺CD62L⁻ en los pacientes con LLC-B tanto ZAP-70⁻ como ZAP-70⁺ respecto a los controles sanos, siendo más marcada esta disminución en los pacientes ZAP-70⁺, si bien, no hay diferencias significativas entre éstos y el grupo de pacientes ZAP-70⁻.

En la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16⁻ que coexpresan el marcador CX3CR1 y el marcador CD62L observamos una disminución significativa del número absoluto en los pacientes con LLC-B tanto ZAP-70⁻ como ZAP-70⁺ respecto a los controles sanos (diferencias éstas que no se observan en el porcentaje), siendo mucho más notable esa disminución en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁻. No obstante, de nuevo y tal como observamos anteriormente, entre los dos grupos de pacientes no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Por otra parte el grupo de pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ muestra alteraciones significativas en el número absoluto y en el porcentaje de las subpoblaciones de monocitos CD14^{hi}CD16⁻CX3CR1⁻CD62L⁻ y CD14^{hi}CD16⁻CX3CR1⁻CD62L⁺ respecto a los controles sanos. Dichas alteraciones se deben a una disminución de estos valores en la subpoblación monocitaria que expresa CX3CR1⁻CD62L⁻ en estos pacientes, mientras que la subpoblación CX3CR1⁻CD62L⁺ está aumentada de manera significativa tanto en número absoluto como en porcentaje respecto al grupo de controles sanos, y aumentada también de forma significativa en su número absoluto respecto al grupo de pacientes con LLC-B ZAP-70⁻.

Tabla 2.2.1: Número absoluto (n° de células/ μ l) y porcentaje de monocitos CD14^{hi}CD16⁻ que expresan CX3CR1 y/o CD62L.

		Controles	ZAP-70 ⁻	ZAP-70 ⁺
CX3CR1+CD62L ⁻	Número absoluto	19,77 (2,51 - 34,78)	5,72 (1,17 - 12,16)	4,40 (2,83 - 6,26)
	%	6,22 (2,40 - 8,19)	3,77 (0,83 - 4,44)	2,58 (1,97 - 3,75)
CX3CR1+CD62L ⁺	Número absoluto	296,20 (170,00 - 430,15)	143,32 (70,09 - 351,30)	162,90 (69,15 - 187,43)
	%	93,55 (89,85 - 96,22)	94,79 (90,35 - 98,16)	95,82 (77,12 - 96,25)
CX3CR1 ⁻ CD62L ⁻	Número absoluto	0,49 (0,00 - 1,27)	0,33 (0,14 - 1,35)	0,02 (0,00 - 0,25)
	%	0,11 (0,05 - 0,31)	0,21 (0,05 - 0,67)	0,01 (0,00 - 0,14)
CX3CR1 ⁻ CD62L ⁺	Número absoluto	1,36 (0,08 - 11,95)	1,81 (0,10 - 7,31)	2,70 (1,87 - 5,69)
	%	0,41 (0,15 - 3,12)	1,19 (0,11 - 2,33)	1,58 (1,04 - 5,52)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ - P₇₅) del número absoluto (n° de células/ μ l) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16⁻ según la expresión de los marcadores CX3CR1 y CD62L en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y pacientes con LLC-B ZAP-70⁺. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos CD14^{hi}CD16⁻.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de pacientes ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

La capacidad para estimular linfocitos por parte de estos monocitos fue evaluada mediante el estudio de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD80 por parte de los monocitos CD14^{hi}CD16⁻ (Tabla 2.2.2). En este caso no se observan diferencias en el número absoluto y en el porcentaje según la expresión de dichos marcadores, presentando valores similares entre los tres grupos objetos de estudio. Destacamos la disminución significativa existente en el número absoluto de los monocitos CD14^{hi}CD16⁻CD86⁺CD80⁻ en los dos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles sin mostrar diferencias entre los pacientes según la expresión de ZAP-70.

Tabla 2.2.2: Número absoluto (n° de células/ μ l) y porcentaje de monocitos CD14^{hi}CD16⁻ que expresan CD86 y/o CD80.

		Controles	ZAP-70 ⁻	ZAP-70 ⁺
CD86 ⁺ CD80 ⁻	Número absoluto	339,59 (205,81 - 545,42)	191,05 (86,33 - 355,01)	196,57 (144,58 - 248,76)
	%	97,98 (95,74 - 98,41)	97,43 (95,87 - 98,67)	96,49 (94,69 - 97,20)
			*	*
CD86 ⁺ CD80 ⁺	Número absoluto	3,94 (1,65 - 6,93)	2,72 (1,64 - 10,87)	2,84 (0,78 - 4,79)
	%	1,44 (0,40 - 2,66)	1,75 (0,79 - 2,00)	1,40 (0,46 - 2,68)
CD86 ⁻ CD80 ⁻	Número absoluto	1,52 (0,42 - 5,72)	1,74 (0,27 - 4,88)	2,90 (0,55 - 11,25)
	%	0,52 (0,16 - 1,57)	0,48 (0,15 - 1,81)	1,43 (0,24 - 3,86)
CD86 ⁻ CD80 ⁺	Número absoluto	0,00 (0,00 - 0,35)	0,00 (0,00 - 0,06)	0,00 (0,00 - 0,36)
	%	0,00 (0,00 - 0,11)	0,00 (0,00 - 0,14)	0,00 (0,00 - 0,12)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ - P₇₅) del número absoluto (n° de células/ μ l) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16⁻ según la expresión de los marcadores CD86 y CD80 en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y pacientes con LLC-B ZAP-70⁺. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos CD14^{hi}CD16⁻.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

- Los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ presentan una disminución significativa tanto del número absoluto como del porcentaje de la subpoblación monocitaria CD14^{hi}CD16⁻ respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y los controles sanos.
- Esta subpoblación se caracteriza por la baja expresión de CX3CR1+CD62L⁺ y CD86⁺ respecto los pacientes ZAP-70⁻ y los controles sanos.

2.3. Estudio fenotípico de los monocitos $CD14^{+low}CD16^{+hi}$ de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.

Como ya describimos en materiales y métodos dentro de los monocitos $CD14^{+}CD16^{+}$ denominados “proinflamatorios” podíamos identificar diferentes subpoblaciones dependiendo de la intensidad en la expresión de estos marcadores. Así una de las subpoblaciones que podemos describir son los monocitos $CD14^{+low}CD16^{+hi}$, que se caracterizan por tener una gran capacidad de migración y de producir citocinas. Al estudiar esta subpoblación de monocitos se observa como en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ tanto el número absoluto como el porcentaje están aumentados significativamente respecto al grupo de pacientes con LLC-B ZAP-70- y al grupo de controles sanos (Figura 2.3.1).

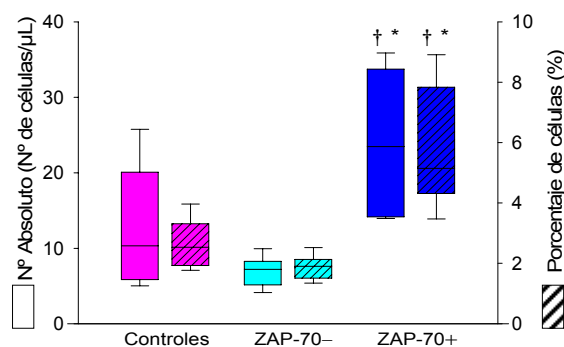


Figura 2.3.1: Número absoluto (nº de células/µl) y porcentaje de la subpoblación monocitaria $CD14^{+low}CD16^{+hi}$.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (nº de células/µl) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos $CD14^{+low}CD16^{+hi}$ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

Al igual que las subpoblaciones monocitarias anteriores se procedió a estudiar el estado de los monocitos $CD14^{+low}CD16^{+hi}$ que expresaban CX3CR1 y CD62L (Tabla 2.3.1). En nuestros resultados destacamos como los monocitos $CD14^{+low}CD16^{+hi}CX3CR1^{+}CD62L^{-}$ se encuentran aumentados significativamente en el grupo de pacientes con LLC-B ZAP-70+ tanto en su número absoluto como en su porcentaje respecto al grupo de pacientes ZAP-70- y al grupo de controles sanos, si bien entre estos dos últimos grupos no se observan diferencias significativas.

En cuanto a la subpoblación de monocitos CD14^{low}CD16^{hi}CX3CR1+CD62L+ se observó en los dos grupos de pacientes con LLC-B una disminución respecto a los controles sanos tanto de su número absoluto como de su porcentaje (estadísticamente significativa en los valores de porcentaje) que es más acentuada en los pacientes con LLC-B ZAP-70+.

Tabla 2.3.1: Número absoluto (n° de células/μl) y porcentaje de monocitos CD14^{low}CD16^{hi} que expresan CX3CR1 y/o CD62L.

		Controles	ZAP-70-	ZAP-70+	
CX3CR1+CD62L-	Número absoluto	3,90 (3,00 - 13,09)	3,82 (2,66 - 6,23)	10,08 (2,12 - 20,23)	†*
	%	39,51 (29,41 - 65,50)	34,10 (39,88 - 74,37)	71,79 (55,56 - 92,24)	†*
CX3CR1+CD62L+	Número absoluto	5,74 (1,60 - 7,24)	3,71 (0,69 - 4,59)	3,90 (3,74 - 10,23)	
	%	58,15 (24,36 - 70,59)	33,01 (12,98 - 59,39)	27,77 (17,38 - 42,33)	* *
CX3CR1-CD62L-	Número absoluto	0,12 (0,00 - 1,68)	0,00 (0,00 - 0,10)	0,00 (0,00 - 0,28)	
	%	1,21 (0,00 - 4,92)	0,00 (0,00 - 2,33)	0,00 (0,00 - 2,00)	
CX3CR1-CD62L+	Número absoluto	0,11 (0,00 - 0,61)	0,00 (0,00 - 0,34)	0,06 (0,00 - 1,14)	
	%	1,11 (0,00 - 5,04)	0,00 (0,00 - 2,69)	0,42 (0,00 - 4,76)	

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ - P₇₅) del número absoluto (n° de células/μl) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14^{low}CD16^{hi} según la expresión de los marcadores CX3CR1 y CD62L en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos CD14^{low}CD16^{hi}.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

En lo que se refiere a la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD80 (Tabla 2.3.2) por parte de los monocitos CD14^{low}CD16^{hi}, observamos que los monocitos CD14^{low}CD16^{hi}CD86+CD80- tiene aumentado significativamente su número absoluto en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70-, si bien en porcentajes presentan valores similares, no existiendo diferencias respecto al grupo de controles sanos.

Por otra parte los monocitos CD14^{low}CD16^{hi} que coexpresan CD86 y CD80 presentan valores de porcentaje significativamente disminuidos en los dos grupos de pacientes con LLC-B respecto al grupo de controles sanos, sin mostrar diferencias significativas en sus números absolutos.

Tabla 2.3.2: Número absoluto (n° de células/ μ l) y porcentaje de monocitos CD14⁺CD16^{hi} que expresan CD86 y/o CD80.

		Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD86+CD80-	Número absoluto	7,61 (3,90 - 13,45)	5,92 (3,78 - 9,93)	10,14 † (4,71 - 22,99)
	%	86,97 (70,30 - 97,84)	93,00 (82,58 - 98,39)	94,50 (85,11 - 98,69)
CD86+CD80+	Número absoluto	0,77 (0,20 - 1,60)	0,28 (0,22 - 0,86)	0,59 (0,36 - 1,21)
	%	8,80 (1,36 - 15,11)	4,40 * (2,62 - 10,21)	5,49 * (1,75 - 11,80)
CD86-CD80-	Número absoluto	0,37 (0,15 - 2,13)	0,16 (0,03 - 0,32)	0,20 (0,14 - 1,31)
	%	4,22 (1,70 - 12,81)	2,51 (0,58 - 7,67)	1,86 (1,42 - 5,97)
CD86-CD80+	Número absoluto	0,00 (0,00 - 0,23)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,04)
	%	0,00 (0,00 - 1,33)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 1,25)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/ μ l) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14⁺CD16^{hi} según la expresión de los marcadores CD86 y CD80 en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos CD14⁺CD16^{hi}.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

- Los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se caracterizan por presentar un incremento significativo en el número absoluto y en el porcentaje de la subpoblación monocitaria CD14⁺CD16^{hi}.
- Esta subpoblación monocitaria en los pacientes ZAP-70+ se caracteriza por presentar altos niveles de expresión de CX3CR1+ y CD86+.

2.4. Estudio fenotípico de los monocitos CD14^{hi}CD16^{low} de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.

Siguiendo con el análisis de los monocitos CD14⁺CD16⁺, mostramos a continuación los resultados relacionados con la subpoblación CD14^{hi}CD16^{low} (Figura 2.4.1). En nuestro trabajo observamos una disminución significativa del número absoluto de estas células en ambos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos sin que se muestren diferencias entre los dos grupos de pacientes con LLC-B definidos en función de la expresión de ZAP-70.

De igual manera se aprecia una disminución del porcentaje de monocitos que compone esta subpoblación en los dos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos, si bien aquí sólo los pacientes con LLC-B ZAP-70+ muestran diferencias significativas respecto al grupo de controles sanos y sin mostrar diferencia alguna entre los dos grupos de pacientes con LLC-B.

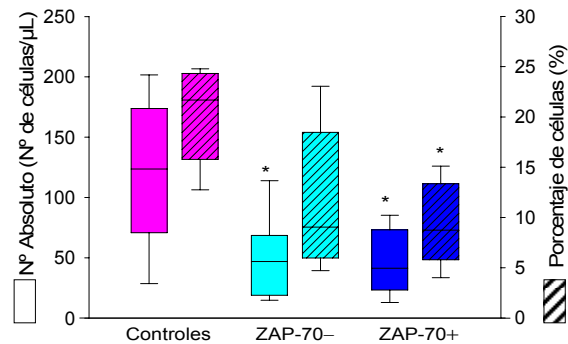


Figura 2.4.1: Número absoluto (nº de células/µl) y porcentaje de la subpoblación monocitaria CD14^{hi}CD16^{low}.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ – P₇₅) del número absoluto (nº de células/µl) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16^{low} en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

En los monocitos CD14^{hi}CD16^{low}, el estudio de la expresión de los marcadores CX3CR1 y CD62L nos muestra como en los dos grupos de pacientes con LLC-B se produce una disminución significativa en el número absoluto de monocitos que expresan CX3CR1 respecto al grupo de controles sanos, independientemente de la expresión o no de CD62L, si bien no hay diferencias entre los grupos de pacientes en función de la expresión de ZAP-70 (Tabla 2.4.1). Señalar que estas diferencias en el número absoluto existentes entre pacientes y controles no se ven reflejadas en el porcentaje de estas células cuyos valores son similares entre los tres grupos comparados.

Este mismo fenómeno se observa en el estudio de la expresión de las moléculas CD86 y CD80 donde de nuevo los dos grupos de pacientes con LLC-B presentan disminuciones significativas en el número absoluto de monocitos CD14^{hi}CD16^{low} que expresan CD86 independientemente de la expresión o no de CD80 (Tabla 2.4.2). De nuevo las diferencias existentes en estos datos entre pacientes y controles no se ven reflejadas en

los valores de porcentaje para esa subpoblación de monocitos presentando valores similares entre los distintos grupos objeto de estudio, y sin observarse diferencias entre los dos grupos de pacientes según expresión de ZAP-70.

Tabla 2.4.1: Número absoluto (n° de células/ μ l) y porcentaje de monocitos CD14^{hi}CD16^{low} que expresan CX3CR1 y/o CD62L.

		Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CX3CR1+CD62L-	Número absoluto	16,79 (2,49 - 22,83)	4,47 * (0,70 - 7,92)	3,90 * (1,42 - 4,61)
	%	13,32 (6,25 - 21,10)	9,43 (3,76 - 11,71)	8,69 (5,10 - 10,16)
CX3CR1+CD62L+	Número absoluto	109,00 (42,82 - 139,06)	42,50 * (16,05 - 86,51)	40,44 * (16,10 - 69,64)
	%	86,50 (78,17 - 93,31)	89,70 (84,23 - 95,75)	90,20 (83,89 - 94,34)
CX3CR1-CD62L-	Número absoluto	0,08 (0,00 - 0,23)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
	%	0,06 (0,00 - 0,18)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
CX3CR1-CD62L+	Número absoluto	0,14 (0,06 - 1,60)	0,41 (0,00 - 1,44)	0,49 (0,00 - 1,71)
	%	0,11 (0,07 - 0,95)	0,86 (0,00 - 1,62)	1,09 (0,00 - 5,00)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/ μ l) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16^{low} según la expresión de los marcadores CX3CR1 y CD62L en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos CD14^{hi}CD16^{low}.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

Tabla 2.4.2: Número absoluto (n° de células/ μ l) y porcentaje de monocitos CD14^{hi}CD16^{low} que expresan CD86 y/o CD80.

		Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD86+CD80-	Número absoluto	75,37 (23,77 - 182,94)	48,95 * (19,35 - 77,87)	41,39 * (23,72 - 72,49)
	%	94,65 (92,65 - 97,55)	96,49 (94,32 - 98,32)	95,83 (90,28 - 97,99)
CD86+CD80+	Número absoluto	4,17 (3,07 - 4,68)	1,57 * (0,67 - 2,18)	1,40 * (0,96 - 2,17)
	%	5,20 (1,91 - 8,74)	3,09 (2,41 - 4,50)	3,24 (2,45 - 4,95)
CD86-CD80-	Número absoluto	0,52 (0,29 - 2,43)	0,21 (0,05 - 1,04)	0,40 (0,25 - 1,43)
	%	0,65 (0,39 - 1,11)	0,41 (0,19 - 1,89)	0,92 (0,23 - 2,16)
CD86-CD80+	Número absoluto	0,02 (0,00 - 0,17)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
	%	0,02 (0,00 - 0,09)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/ μ l) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16^{low} según la expresión de los marcadores CD86 y CD80 en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos CD14^{hi}CD16^{low}.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

- Los pacientes con LLC-B se caracterizan por presentar una disminución significativa en el número absoluto y en el porcentaje de la subpoblación monocitaria $CD14^{hi}CD16^{low}$.
- Esta subpoblación monocitaria en los pacientes con LLC-B presenta disminuciones significativas en la expresión de $CX3CR1+CD62L^{-}$, $CX3CR1+CD62L^{+}$, $CD86+CD80^{-}$ y $CD86+CD80^{+}$ respecto a los controles sanos.

2.5. Estudio fenotípico de los monocitos $CD14^{hi}CD16^{hi}$ de sangre periférica en pacientes con LLC-B agrupados en función de la expresión de ZAP-70.

La última subpoblación a estudiar son los monocitos $CD14^{hi}CD16^{hi}$ (Figura 2.5.1), donde nuestros resultados muestran una disminución significativa respecto a los controles sanos del número absoluto y del porcentaje de dicha subpoblación en los pacientes con LLC-B independientemente de la expresión de ZAP-70. Al comparar entre los dos grupos de pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70 no observamos la existencia de diferencias significativas, presentando valores similares entre ambos.

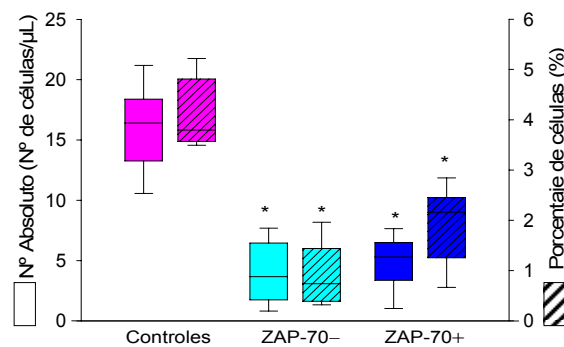


Figura 2.5.1: Número absoluto (nº de células/µl) y porcentaje de la subpoblación monocitaria $CD14^{hi}CD16^{hi}$.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (nº de células/µl) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos $CD14^{hi}CD16^{hi}$ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

Dentro de esta subpoblación monocitaria el estudio de su capacidad migratoria según la expresión de las moléculas CX3CR1 y CD62L nos mostró que en los dos grupos de pacientes con LLC-B se produce una disminución significativa del número absoluto de monocitos $CD14^{hi}CD16^{hi}CX3CR1+CD62L^{-}$ y $CD14^{hi}CD16^{hi}CX3CR1+CD62L^{+}$

respecto al grupo de controles sanos, si bien no hay diferencias entre los grupos de pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70 (Tabla 2.5.1). Además las diferencias en el número absoluto existentes entre pacientes y controles no se ven reflejadas en los porcentajes de estas células, cuyos valores son similares entre los tres grupos comparados. Por otra parte, en el caso de los monocitos que no expresan CX3CR1 no observamos ningún tipo de alteración en los valores de su número absoluto y de su porcentaje entre los diferentes grupos objeto de estudio.

El estudio de su capacidad funcional según la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD80 nos muestra como en los pacientes con LLC-B tanto ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺ se produce una disminución significativa del número absoluto de los monocitos que expresan CD86 independientemente de la coexpresión o no de CD80, si bien de nuevo no existen diferencias entre los dos grupos de pacientes según la expresión de ZAP-70 (Tabla 2.5.2). Señalar que las diferencias existentes en los números absolutos no se ven reflejadas en los porcentajes de estas células manteniéndose en todo momento valores similares entre los grupos de pacientes y el grupo de controles sanos. Por último indicar que entre los pacientes con LLC-B y el grupo de controles sanos no existen diferencias en número absoluto y porcentaje de los monocitos que no expresan CD86.

Tabla 2.5.1: Número absoluto (n° de células/ μ l) y porcentaje de monocitos CD14^{hi}CD16^{hi} que expresan CX3CR1 y/o CD62L.

		Controles	ZAP-70 ⁻	ZAP-70 ⁺
CX3CR1+CD62L ⁻	Número absoluto	5,78 (3,87 – 10,02)	1,38 (0,92 – 3,01)	1,77 (1,02 – 5,40)
	%	29,17 (23,01 – 45,80)	31,29 (21,60 – 38,21)	29,79 (21,33 – 35,72)
			*	*
CX3CR1+CD62L ⁺	Número absoluto	13,97 (9,21 – 22,43)	3,03 (1,75 – 8,62)	4,09 (2,55 – 9,01)
	%	70,51 (58,02 – 81,22)	68,70 (55,03 – 73,12)	68,85 (57,00 – 75,43)
			*	*
CX3CR1–CD62L ⁻	Número absoluto	0,02 (0,00 – 0,12)	0,00 (0,00 – 0,06)	0,03 (0,00 – 1,07)
	%	0,10 (0,03 – 1,70)	0,00 (0,01 – 0,97)	0,50 (0,17 – 2,91)
CX3CR1–CD62L ⁺	Número absoluto	0,04 (0,00 – 1,03)	0,00 (0,01 – 0,11)	0,05 (0,01 – 1,86)
	%	0,20 (0,07 – 1,23)	0,00 (0,00 – 0,02)	0,84 (0,22 – 1,73)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/ μ l) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16^{hi} según la expresión de los marcadores CX3CR1 y CD62L en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y pacientes con LLC-B ZAP-70⁺. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos CD14^{hi}CD16^{hi}.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

Tabla 2.5.2: Número absoluto (n° de células/ μ l) y porcentaje de monocitos CD14^{hi}CD16^{hi} que expresan CD86 y/o CD80.

		Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD86+CD80-	Número absoluto	15,73 (12,72 – 28,09)	4,92 * (2,77 – 10,01)	4,15 * (2,86 – 9,12)
	%	85,12 (69,27 – 91,75)	86,01 (73,55 – 92,08)	86,09 (71,09 – 95,82)
CD86+CD80+	Número absoluto	2,54 (1,90 – 5,63)	0,79 * (0,24 – 2,86)	0,64 * (0,45 – 2,00)
	%	13,74 (7,02 – 19,51)	13,81 (5,90 – 21,04)	13,27 (7,27 – 19,09)
CD86-CD80-	Número absoluto	0,21 (0,11 – 2,00)	0,01 (0,00 – 0,32)	0,03 (0,00 – 1,40)
	%	1,14 (0,95 – 3,16)	0,17 (0,00 – 1,05)	0,62 (0,00 – 2,00)
CD86-CD80+	Número absoluto	0,00 (0,00 – 0,20)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,02)
	%	0,00 (0,00 – 0,04)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,07)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/ μ l) y del porcentaje en sangre periférica de la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16^{hi} según la expresión de los marcadores CD86 y CD80 en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de monocitos CD14^{hi}CD16^{hi}.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

- Los pacientes con LLC-B se caracterizan por presentar una disminución significativa en el número absoluto y en el porcentaje de la subpoblación monocitaria CD14^{hi}CD16^{hi}.
- Esta subpoblación monocitaria en los pacientes con LLC-B presentan disminuciones significativas en la expresión de CX3CR1+CD62L-, CX3CR1+CD62L+, CD86+CD80- y CD86+CD80+ respecto a los controles sanos.

3. ALTERACIONES DE LAS PRINCIPALES POBLACIONES LINFOCITARIAS, DE CÉLULAS NK Y TK DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON LLC-B AGRUPADOS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.

Tras el estudio del estado de dos compartimentos celulares muy relacionados como son las células dendríticas y monocitos, se procedió al análisis del compartimento linfocitario, estudiando en primer lugar el estado de las grandes poblaciones celulares (linfocitos B, T, así como células NK y TK) en los dos grupos de pacientes y los controles sanos. En este caso podemos observar que los pacientes con LLC-B independientemente de la expresión de ZAP-70 muestran incrementos significativos por encima de 10 veces del número de linfocitos totales en sangre periférica respecto a los controles sanos (Tabla 3.1). Cuando estudiamos los pacientes con LLC-B en función de la expresión de ZAP-70 observamos que este incremento del número de linfocitos en sangre periférica es mucho mayor en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ hasta el punto de mostrar diferencias significativas respecto al grupo de pacientes con LLC-B ZAP-70- (Tabla 3.1).

En cuanto a las grandes poblaciones de linfocitos, indicar que los incrementos significativos observados en el número absoluto tanto de **linfocitos T** (CD3+) como de **linfocitos B** (CD19+) en los dos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos son mayores en aquellos pacientes con LLC-B ZAP-70+, mostrando este grupo un incremento significativo en ambas poblaciones respecto a los pacientes ZAP-70-.

En cuanto al porcentaje de **linfocitos B**, señalar que éste en los dos grupos de pacientes con LLC-B se encuentra aumentado significativamente respecto a los controles sanos, y de nuevo muestra diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes, siendo mucho mayor el porcentaje de linfocitos B en los pacientes con LLC-B ZAP-70+.

En el caso de los **linfocitos T**, contrariamente a lo observado en el número absoluto, se produce una disminución del porcentaje en ambos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos, no existiendo diferencias significativas entre los porcentajes de los dos grupos de pacientes.

Por otra parte las **células NK** (CD3–CD56+) en los pacientes con LLC-B ZAP-70– están incrementadas de manera significativa en su número absoluto respecto a los controles sanos, si bien el porcentaje de esta población celular con respecto del total de linfocitos se encuentra disminuido significativamente respecto a los controles sanos. Cuando comparamos los valores de porcentaje entre los dos grupos de pacientes y los controles sanos, se observa que los pacientes con LLC-B tienen disminuidos de manera significativa los valores de porcentaje de las células NK respecto a los controles sanos, siendo el grupo de pacientes ZAP-70+ los que presentan los valores significativamente inferiores con respecto de los otros dos grupos estudiados.

Por último el estudio de las **células TK** (CD3+CD56+) muestra un incremento significativo de el número absoluto de estas células en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes con LLC-B ZAP-70– y al grupo de controles sanos. Sin embargo al comparar los valores de porcentaje observamos un descenso significativo de los mismos en los dos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos, si bien en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se observa un incremento significativo del porcentaje de células TK con respecto a los pacientes LLC-B ZAP-70–.

Tabla 3.1: Número absoluto (n° de células/μl) y porcentaje de linfocitos totales y de las principales poblaciones de linfocitos, células NK y TK.

		Controles	ZAP-70–		ZAP-70+	
Linfocitos totales	Número absoluto	1.667,39 (1.279,17 – 2.292,78)	16.736,20 (5.473,5 – 23.946,91)	*	21.973,84 (11.810,99 – 36.452,35)	†*
Linf. T (CD3+)	Número absoluto	920,97 (604,66 – 1.493,94)	1.654,82 (535,81 – 2.129,76)	*	2.195,25 (1.108,61 – 3.740,50)	†*
	%	55,23 (47,30 – 68,16)	9,89 (3,20 – 15,89)	*	9,99 (3,04 – 17,02)	*
Linf. B (CD19+)	Número absoluto	163,20 (102,28 – 224,46)	11.613,38 (3.098,52 – 19.811,71)	*	18.261,61 (8.511,93 – 26.921,30)	†*
	%	9,79 (5,13 – 13,46)	69,39 (18,51 – 82,73)	*	83,11 (48,73 – 91,93)	†*
Cél. NK (CD3–CD56+)	Número absoluto	309,58 (170,84 – 400,88)	559,22 (268,44 – 930,06)	*	408,47 (326,08 – 766,92)	
	%	18,57 (10,25 – 24,06)	3,34 (1,06 – 5,56)	*	1,86 (0,69 – 3,49)	†*
Cél. TK (CD3+CD56+)	Número absoluto	91,14 (53,23 – 145,5)	161,70 (69,74 – 347,24)		396,21 (125,39 – 560,37)	†*
	%	5,47 (2,19 – 8,73)	0,97 (0,19 – 2,07)	*	1,80 (0,57 – 4,55)	†*

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/μl) y del porcentaje en sangre periférica de las principales poblaciones de linfocitos, células NK y TK en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70– y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70– y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

En el caso de las poblaciones de **linfocitos T CD4+ y CD8+** (Tabla 3.2) se observa un incremento significativo en el número absoluto de linfocitos T CD4+ en los dos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos, no existiendo diferencias entre los pacientes según la expresión de ZAP-70.

Por otra parte, la población de **linfocitos T CD8+** tiene incrementado su número absoluto en los dos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles, siendo significativo este aumento en los pacientes de LLC-B ZAP-70+ respecto a los controles y los pacientes con LLC-B ZAP-70-.

Señalar que estas diferencias encontradas en los números absolutos no se ven reflejadas en los valores de porcentaje los cuales son muy similares para ambas poblaciones de linfocitos en los tres grupos comparados. Indicar a su vez que el ratio CD4/CD8 en los pacientes se mantiene invariable y sin diferencias con los controles ya que las variaciones observadas en los pacientes con LLC-B en el número absoluto de linfocitos T CD4+ son compensadas por las variaciones del número absoluto de los linfocitos T CD8+ (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Número absoluto (n° de células/μl) y porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+.

		Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
Linf. T (CD4+)	Número absoluto	537,54 (402,89 – 1.176,19)	1.002,63 (766,52 – 1.416,97)	1.297,45 (885,64 – 1.810,47)
	%	58,37 (43,75 – 75,73)	60,59 (36,10 – 82,73)	59,10 (40,34 – 83,13)
Linf. T (CD8+)	Número absoluto	217,49 (165,61 – 434,15)	404,82 (323,95 – 667,19)	563,67 (486,34 – 785,33)
	%	23,61 (17,98 – 38,19)	24,46 (19,83 – 38,69)	25,68 (22,15 – 45,80)
Ratio CD4/CD8	Número absoluto	2,47 (1,85 – 2,61)	2,47 (1,90 – 2,69)	2,30 (1,73 – 2,58)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/μl) y del porcentaje en sangre periférica de linfocitos T CD4+ y CD8+ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD3+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

- Los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se caracterizan por presentar incrementos significativos de linfocitos totales y linfocitos B así como de linfocitos T CD3+ y células TK (CD3+CD56+) respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos.
- Estos pacientes a su vez presentan disminuciones significativas del porcentaje de células NK (CD3-CD56+) respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos.
- Los pacientes con LLC-B muestran un incremento en el número absoluto tanto de linfocitos T CD4+ como CD8+ respecto a los controles sanos. Estas alteraciones, sin embargo, no se reflejan en alteraciones en los porcentajes de estas poblaciones, ni tampoco alteran el ratio CD4+/CD8+.

4. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LINFOCITOS B DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON LLC-B AGRUPADOS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70

En el caso de los linfocitos B no sólo se estudio el estado de la población linfocitaria a nivel general sino que también se procedió a estudiar el estado de activación de las células B así como su capacidad funcional a través de diferentes marcadores de activación y de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86.

En una primera aproximación al realizar el estudio inmunofenotípico de los linfocitos B (CD19+) encontramos grandes diferencias entre los dos grupos de pacientes con LLC-B en función de la expresión de ZAP-70 en cuanto al número de linfocitos B presentes en sangre periférica y el porcentaje que suponen estas células respecto del total de linfocitos.

Dentro del aumento existente en el número absoluto de linfocitos B en los pacientes con LLC-B respecto a los controles, destacamos el hecho de la existencia del incremento significativo en un 57% del número absoluto de estas células en los pacientes ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- (Tabla 4.1), observándose también en el porcentaje que supone esta población celular respecto del total de linfocitos un incremento significativo en los pacientes ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- (Tabla 3.1).

El estudio de la expresión de diferentes marcadores de los linfocitos B (CD19+) como son CD21, CD38, CD23, CD5, CD40, HLA-DR, CD80 y CD86 reflejó notables diferencias entre los dos grupos de pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70.

Dentro de los aumentos significativos existentes en los pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos, en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se observa un incremento significativo respecto a los pacientes ZAP-70- tanto del número absoluto (Tabla 4.1) como del porcentaje (Tabla 4.2) de los linfocitos CD19+CD38+, CD19+CD5+, CD19+CD40+.

Sin embargo, el número absoluto (Tabla 4.1) y el porcentaje (Tabla 4.2) de los linfocitos B CD19+CD80+ y CD19+CD86+ se encuentran disminuidos significativamente en los pacientes de LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70-.

Tabla 4.1: Número absoluto (n° de células/μl) de linfocitos CD19+ atendiendo a diferentes marcadores inmunofenotípicos.

	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
Linfocitos CD19+	163,20 (102,28 – 224,46)	11.613,38 * (3.098,52 – 19.811,71)	18.261,61 †* (8.511,93 – 26.921,30)
CD19+CD21+	121,07 (47,58 – 155,97)	7.043,71 * (4.653,72 – 11.866,36)	6.084,77 * (2.245,93 – 14.679,01)
CD19+CD38+	110,12 (39,68 – 152,33)	1.843,71 * (949,67 – 3.298,52)	13.619,51 †* (9.200,29 – 21.565,52)
CD19+CD23+	51,10 (19,13 – 91,35)	9.189,04 * (3.364,51 – 18.069,31)	13.778,38 * (6.926,53 – 19.566,06)
CD19+CD5+	4,76 (1,25 – 6,90)	10.497,28 * (8.364,51 – 14.136,31)	17.708,28 †* (12.935,25 – 22.820,75)
CD19+CD40+	100,46 (44,49 – 137,63)	2.694,79 * (1.263,21 – 7.221,52)	12.843,39 †* (6.402,32 – 18.906,54)
CD19+HLADR+	143,93 (62,65 – 200,65)	10.561,90 * (8.525,37 – 16.221,28)	16.915,73 * (6.702,33 – 22.911,67)
CD19+CD80+	47,30 (10,60 – 71,57)	443,06 * (130,48 – 797,16)	188,09 †* (100,14 – 521,21)
CD19+CD86+	13,27 (4,45 – 19,03)	524,52 * (260,69 – 739,87)	399,92 †* (259,38 – 529,79)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ – P₇₅) del número absoluto (n° de células/μl) en sangre periférica de los linfocitos CD19+ según diferentes marcadores inmunofenotípicos en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Tabla 4.2: Porcentaje de linfocitos CD19+ atendiendo a diferentes marcadores inmunofenotípicos.

	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD19+CD21+	74,19 (69,49 – 81,39)	60,65 (49,33 – 65,92)	33,32 (16,93 – 51,03) †*
CD19+38+	67,48 (61,75 – 73,40)	15,87 (5,98 – 18,24) *	74,58 (68,39 – 80,52) †
CD19+CD23+	31,31 (20,19 – 42,55)	79,12 (65,82 – 89,139) *	75,45 (66,03 – 88,62) *
CD19+CD5+	2,92 (0,95 – 3,71)	90,39 (87,30 – 98,53) *	97,97 (91,56 – 99,04) †*
CD19+CD40+	61,56 (52,19 – 76,39)	23,20 (19,00 – 31,08)	70,33 (56,40 – 75,39) †
CD19+HLADR+	88,19 (82,63 – 97,70)	90,94 (83,73 – 98,61)	92,63 (84,05 – 98,88)
CD19+CD80+	28,97 (23,57 – 35,07)	3,81 (2,06 – 7,26) *	1,03 (0,86 – 3,02) †*
CD19+CD86+	8,13 (7,03 – 14,20)	4,52 (2,48 – 6,98)	2,19 (0,93 – 3,75) †*

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P_{25} – P_{75}) del porcentaje en sangre periférica de los linfocitos CD19+ según diferentes marcadores inmunofenotípicos en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD19+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

- Los pacientes ZAP-70+ se caracterizan por presentar disminuciones significativas del porcentaje de células B CD19+CD80+ y CD19+CD86+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos.
- Además los pacientes ZAP-70+ presentan diferencias importantes y significativas con respecto los pacientes ZAP-70-, presentando valores más altos tanto en el número absoluto como en el porcentaje de células B CD19+CD5+, CD38+ y CD40+, y porcentajes significativamente más bajos de CD21+ respecto de los pacientes ZAP-70- y los controles sanos.

5. ESTUDIO FENOTÍPICO DE LINFOCITOS T CD4+ DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON LLC-B AGRUPADOS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.

En el análisis de los linfocitos T CD4+ se procedió a estudiar el estado de activación de esta población celular y la expresión de moléculas relacionadas con la capacidad coestimuladora y migratoria de estas células, así como la población de linfocitos CD4+ reguladores según la expresión de FOXP-3.

En cuanto al grado de activación se realizó el estudio comparativo de las subpoblaciones CD4+ según los criterios de definición de la memoria inmunológica clásica (expresión de CD45RA y CD45RO) observándose un incremento significativo

en el número absoluto y en el porcentaje de los linfocitos T CD4+CD45RO+CD45RA– (linfocitos memoria) en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto al grupo de pacientes ZAP-70– y al grupo de controles sanos (Tabla 5.1).

En el caso de los linfocitos T CD4+CD45RO+CD45RA+ (linfocitos efectores), estos se encuentran incrementados en su número absoluto tanto en pacientes con LLC-B ZAP-70– como ZAP-70+ respecto a los controles sanos sin mostrar ninguna diferencia entre los dos grupos de pacientes. Por otra parte los valores de porcentaje de esta subpoblación linfocitaria son muy similares entre los diferentes grupos del estudio.

Tabla 5.1: Número absoluto (n° de células/ μ l) y porcentaje de linfocitos T CD4+ novatos, efectores y memoria.

		Controles	ZAP-70–	ZAP-70+
CD45RO+CD45RA– (Linfocitos memoria)	Número absoluto	229,21 (203,66 - 474,96)	351,83 (240,06 - 629,24)	745,90 (648,77 - 1.122,00)
	%	42,64 (27,58 - 50,43)	35,09 (30,92 - 42,25)	57,49 (30,85 - 73,43)
CD45RO+CD45RA+ (Linfocitos efectores)	Número absoluto	158,73 (121,77 - 346,37)	339,39 (212,58 - 602,40)	325,79 (102,26 - 728,62)
	%	29,53 (24,84 - 40,86)	33,85 (25,83 - 43,17)	25,11 (15,39 - 41,99)
CD45RO–CD45RA+ (Linfocitos novatos)	Número absoluto	149,38 (132,35 - 258,20)	286,65 (184,22 - 448,29)	214,73 (49,97 - 353,36)
	%	27,79 (17,35 - 38,41)	28,59 (19,16 - 38,04)	16,55 (6,82 - 28,29)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/ μ l) y del porcentaje en sangre periférica de linfocitos T CD4+ novatos, efectores y memoria en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70– y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos T CD4+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70– y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Resultados muy similares a los anteriores se pueden apreciar en la subpoblación de linfocitos T novatos CD4+CD45RO–CD45RA+, donde de nuevo los pacientes con LLC-B independientemente de la expresión de ZAP70 muestran valores incrementados de forma significativa respecto a los controles sanos sin mostrar diferencias entre los dos grupos de pacientes entre si. Sin embargo en el caso de los valores de porcentaje de esta subpoblación linfocitaria observamos valores similares entre el grupo de controles sanos y el grupo de pacientes con LLC-B ZAP-70– si bien el porcentaje en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ muestran valores significativamente más bajos que los pacientes ZAP-70– y el grupo control (Tabla 5.1).

Por otra parte, dentro de la población de linfocitos T CD4+CD45RO+ destacamos el incremento significativo del número absoluto y del porcentaje de la población CD45RO+CD95+ en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (Figura 5.1).

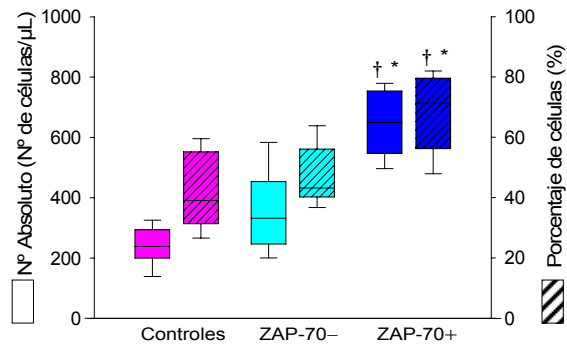


Figura 5.1: Número absoluto (nº de células/µl) y porcentaje de la población linfocitaria CD4+CD45RO+CD95+.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (nº de células/µl) y del porcentaje en sangre periférica de la población de linfocitos T CD4+CD45RO+CD95+ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD4+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

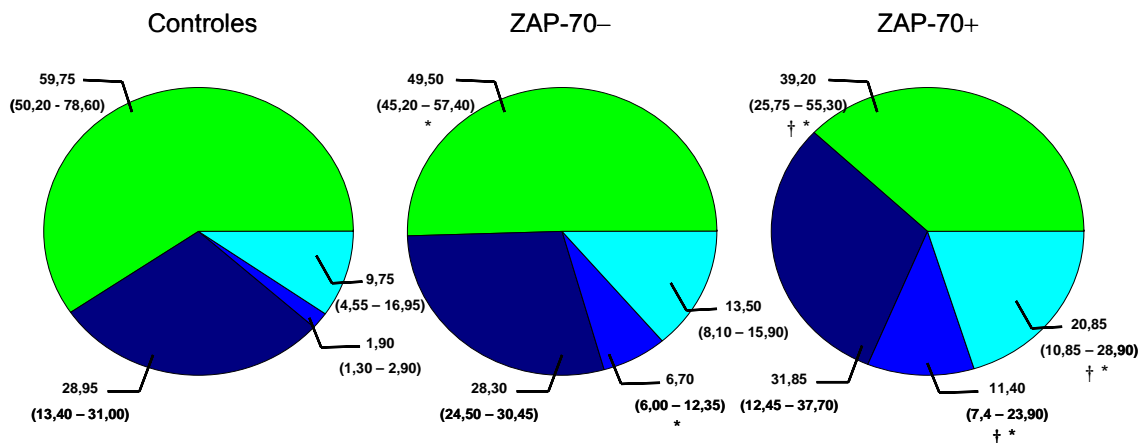
* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

Un análisis más profundo del estado de activación de los linfocitos T CD4+ se realizó mediante el estudio de la co-expresión de los antígenos CD45RA y CD27 que discriminan en células novatas NAIVE (CD45RA+CD27+), células memoria efectora no terminada MENT (CD45RA-CD27-), células memoria efectora terminada MET (CD45RA+CD27-) y células memoria central MC (CD45RA-CD27+) tal como se indicó en el apartado de materiales y métodos.

El análisis de la expresión de estas moléculas mostró una importante redistribución celular en los pacientes con LLC-B que es muy diferente en función de la expresión de ZAP-70. Así en los dos grupos de pacientes con LLC-B existe una disminución significativa del porcentaje de la subpoblación NAIVE respecto a los controles sanos, siendo mucho más marcada en los pacientes de LLC-B ZAP-70+ mostrando estos una reducción significativa respecto a los pacientes de LLC-B ZAP-70-. Esta disminución en el porcentaje de células novatas en ambos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos se debe principalmente al incremento de las subpoblaciones de células memoria efectora (MENT y MET), siendo estos incrementos significativos en la

subpoblación de células MET, mientras que los porcentajes de células MC se mantienen muy similares en los tres grupos estudiados. Por otra parte se observa que los pacientes con LLC-B ZAP-70+ son los que presentan los incrementos significativos más marcados en los porcentajes de células memoria efectora (MENT y MET) respecto a los pacientes con LLC-B ZAP-70-.

Figura 5.2: Distribución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos CD4+ atendiendo a su grado de activación.



Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ - P₇₅) del porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ NAIVE ▼, MENT ▼, MET ▼ y MC ▼ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD4+.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Un estudio más amplio de los linfocitos T CD4+ nos muestra diferencias significativas en la expresión de otros marcadores que tienen que ver con la capacidad de estimulación o migración de estas células. Así observamos que los linfocitos T CD4+ que expresan CD40L se encuentran incrementados tanto en su número absoluto como en su porcentaje en los pacientes con LLC-B (independientemente de la expresión de ZAP-70) respecto a los controles sanos (Figura 5.3).

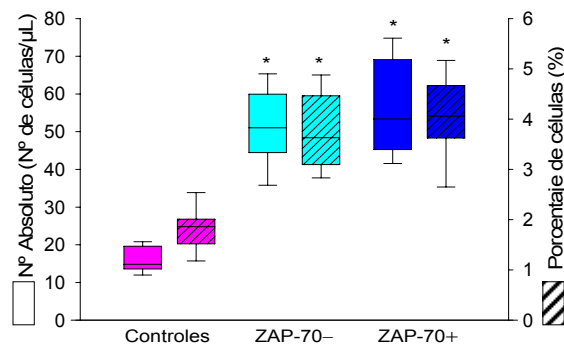


Figura 5.3: Número absoluto (nº de células/µl) y porcentaje de la población linfocitaria CD4+CD40L+.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (nº de células/µl) y del porcentaje en sangre periférica de la población de linfocitos CD4+CD40L+ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD4+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

En el caso de los linfocitos T CD4+ que expresan el marcador CD62L se observa un incremento significativo en el número absoluto de linfocitos T CD4+CD62L+ en los dos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos, siendo mucho más marcado este incremento en los pacientes con LLC-B ZAP-70+. En este grupo de pacientes además se aprecia un incremento significativo del porcentaje de esta población linfocitaria respecto al grupo de pacientes con LLC-B ZAP-70- y al grupo de controles sanos (Figura 5.4).

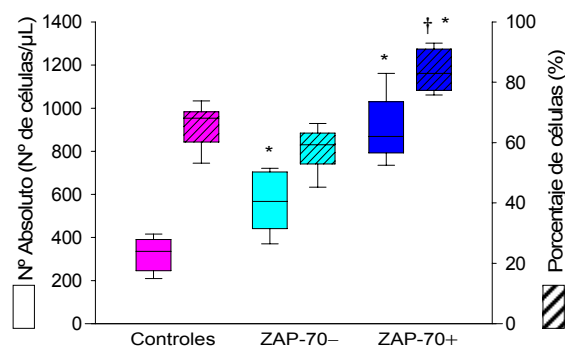


Figura 5.4: Número absoluto (nº de células/µl) y porcentaje de la población linfocitaria CD4+CD62L+.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (nº de células/µl) y del porcentaje en sangre periférica de la población de linfocitos CD4+CD62L+ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD4+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

Por otro lado los linfocitos CD4⁺ que expresan CD28 en los pacientes con LLC-B, independientemente de la expresión de ZAP-70, aún estando aumentados en el número absoluto muestran un descenso en el porcentaje respecto a los controles sanos, siendo significativo dicho descenso en los pacientes de LLC-B ZAP-70⁺ (Figura 5.5).

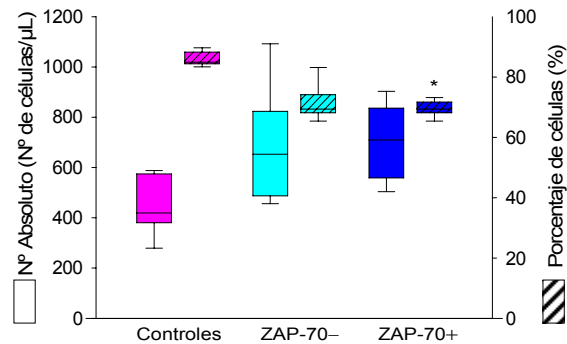


Figura 5.5: Número absoluto (nº de células/µl) y porcentaje de la población linfocitaria CD4⁺CD28⁺.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ - P₇₅) del número absoluto (nº de células/µl) en sangre periférica y del porcentaje de la población de linfocitos CD4⁺CD28⁺ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y pacientes con LLC-B ZAP-70⁺. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD4⁺.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo pacientes ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

Por último destacar los resultados obtenidos del estudio inmunofenotípico de las células reguladoras CD4⁺FOXP-3⁺ (Figura 5.6). En este caso, observamos que los pacientes con LLC-B tanto ZAP-70⁻ como ZAP-70⁺ tienen incrementados los números absolutos de esta población celular respecto a los controles sanos siendo este aumento mucho más marcado y significativo en el grupo de pacientes ZAP-70⁺ con respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y controles sanos. A su vez, los pacientes ZAP-70⁺ muestran un incremento significativo del porcentaje de estas células con respecto a los otros dos grupos de estudio.

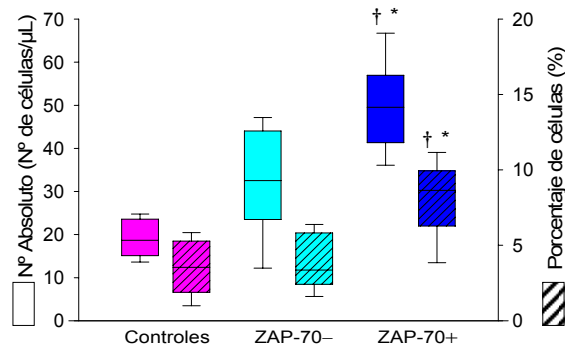


Figura 5.6: Número absoluto (nº de células/µl) y porcentaje de la población linfocitaria CD4+FOXP-3+.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (nº de células/µl) y del porcentaje en sangre periférica de la población de linfocitos CD4+FOXP-3+ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD4+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

- Los pacientes con LLC-B, independientemente de la expresión de ZAP-70, se caracterizan por presentar una importante redistribución de los linfocitos T CD4+ según el grado de activación celular, mostrando respecto a los controles sanos un incremento significativo de células T CD4+ efectoras en contrapartida a un descenso significativo de células T novatas. Esta alteración es mucho más marcada y significativa en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- y a los controles sanos.
- Además los pacientes ZAP-70+ se caracterizan por un incremento significativo de los linfocitos T CD4+ que expresan CD95+ y CD62L+ y una disminución significativa de linfocitos T CD4+ que expresan CD28+.
- Por último los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presentan de forma significativa un número absoluto y un porcentaje más elevado de linfocitos reguladores CD4+FOXP-3+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos.

6. ESTUDIO FENOTÍPICO DE LOS LINFOCITOS T CD8+ DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON LLC-B AGRUPADOS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.

De manera similar a como se procedió con los linfocitos T CD4+ en el análisis de los linfocitos T CD8+ se procedió a estudiar el estado de activación de esta población celular y la expresión de moléculas que tienen que ver con la capacidad coestimuladora y migratoria de estas células.

El estudio inmunofenotípico de los linfocitos CD8⁺ se realizó en primer lugar según los criterios de definición de la memoria inmunológica clásica (expresión de CD45RA y CD45RO) (Tabla 6.1). De igual manera que ocurría con los linfocitos CD4⁺, se observa un incremento significativo del número absoluto y del porcentaje de los linfocitos T CD8⁺ CD45RO⁺CD45RA⁻ (linfocitos memoria) en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y al grupo de controles sanos, existiendo aquí además diferencias significativas en ambos valores entre los pacientes de LLC-B según la expresión de ZAP70 así como entre los pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y los controles sanos. En el caso de los linfocitos efectores T CD8⁺ CD45RO⁺CD45RA⁺ observamos que tienen incrementados significativamente su número absoluto en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y los controles sanos. Sin embargo los valores de porcentajes de esta subpoblación linfocitaria se muestran muy similares entre los diferentes grupos del estudio.

Por otra parte la subpoblación de linfocitos T novatos CD8⁺CD45RO⁻CD45RA⁺ se encuentra disminuida significativamente en los valores de porcentaje en el grupo de pacientes de LLC-B ZAP-70⁺ respecto de los pacientes ZAP-70⁻ y al grupo de controles sanos, si bien no hay diferencias significativas en el número absoluto entre estos dos últimos grupos.

Tabla 6.1: Número absoluto (n° de células/ μ l) y porcentaje de linfocitos T CD8⁺ novatos, efectores y memoria.

		Controles	ZAP-70 ⁻	ZAP-70 ⁺
CD45RO⁺CD45RA⁻ (Linfocitos memoria)	Número absoluto	32,06 (23,36 - 49,35)	81,61 * (43,38 - 105,57)	242,43 †* (127,07 - 477,86)
	%	14,74 (11,61 - 24,57)	20,16 * (10,78 - 30,70)	43,01 †* (25,38 - 60,24)
CD45RO⁺CD45RA⁺ (Linfocitos efectores)	Número absoluto	91,87 (56,64 - 146,98)	178,61 (101,90 - 342,06)	213,80 †* (165,97 - 350,83)
	%	42,24 (34,07 - 55,21)	44,12 (31,49 - 62,01)	37,93 (16,21 - 52,15)
CD45RO⁻CD45RA⁺ (Linfocitos novatos)	Número absoluto	91,95 (48,19 - 129,50)	144,28 (93,55 - 255,90)	101,91 (73,89 - 187,93)
	%	42,28 (25,98 - 61,58)	35,64 (26,84 - 56,84)	18,08 †* (13,57 - 34,87)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del número absoluto (n° de células/ μ l) y del porcentaje en sangre periférica de linfocitos T CD8⁺ novatos, efectores y memoria en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y pacientes con LLC-B ZAP-70⁺. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos T CD8⁺.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Dentro de la población linfocitaria CD8+CD45RO+, al igual que se observaba en los linfocitos CD4+, se produce un incremento significativo tanto en el número absoluto como en el porcentaje de la población CD45RO+CD95+ en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (Figura 6.1).

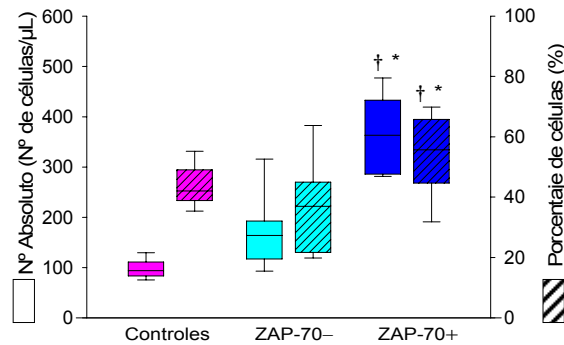


Figura 6.1: N° absoluto (n° de células/µl) y porcentaje de la población linfocitaria CD8+CD45RO+CD95+.

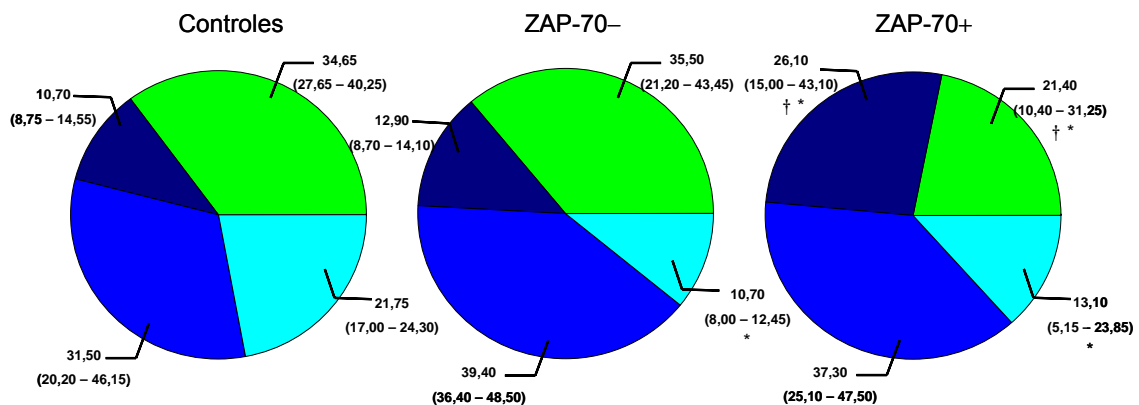
Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ – P₇₅) del número absoluto (n° de células/µl) y del porcentaje en sangre periférica de la población de linfocitos CD8+CD45RO+CD95+ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD8+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

Un análisis más profundo y detallado del estado de activación de los linfocitos T CD8+ a través de la expresión de CD45RA y CD27 (Figura 6.2) muestra una redistribución de las células CD8+ en los pacientes de LLC-B respecto a los controles sanos. Esta redistribución afecta principalmente a las células MENT las cuales se encuentran disminuidas significativamente en los pacientes con LLC-B tanto ZAP-70- como ZAP-70+ respecto a los controles sanos. Por otro lado los pacientes de LLC-B ZAP-70+ muestran una disminución significativa en las células NAIVE respecto a los pacientes ZAP-70- y a los controles sanos. Dicha disminución se debe al incremento significativo del porcentaje de células MC en estos pacientes respecto a los pacientes ZAP-70- y a los controles sanos.

Figura 6.2: Distribución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos CD8+ atendiendo a su grado de activación.



Se representan la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ – P₇₅) del porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos CD8+ NAIVE ▼, MENT ▼, MET ▼ y MC ▼ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD8+.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

En lo que respecta a otros marcadores relacionados con la activación celular de linfocitos T CD8+, observamos como los linfocitos T CD8+ que expresan el marcador CD62L (Figura 6.3) están incrementados en su número absoluto y en su porcentaje en los dos grupos de pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos siendo más marcado y estadísticamente significativos estos incrementos en los pacientes con LLC-B ZAP-70+.

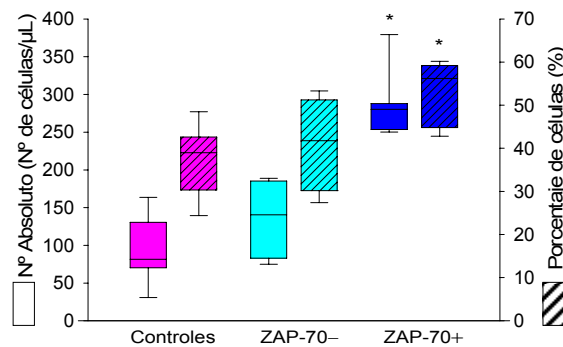


Figura 6.3: Número absoluto (nº de células/μl) y porcentaje de la población linfocitaria CD8+CD62L+.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ – P₇₅) del número absoluto (nº de células/μl) y del porcentaje en sangre periférica de la población de linfocitos CD8+ CD62L+ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD8+.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

En cuanto a la expresión de CD28 por parte de los linfocitos T CD8⁺ (Figura 6.4), sólo los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ presentan algún tipo de alteración respecto a los otros grupos estudiados, mostrando significativamente disminuidos los valores de porcentaje respecto al grupo de controles sanos.

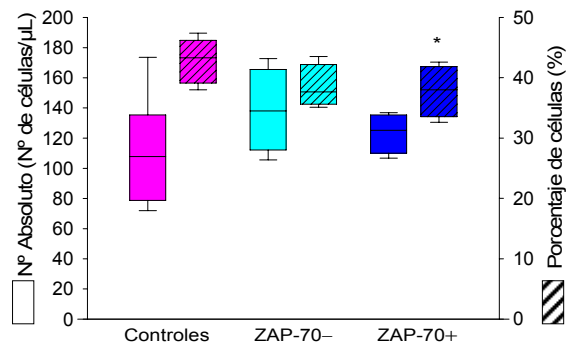


Figura 6.4: Número absoluto (nº de células/µl) y porcentaje de la población linfocitaria CD8⁺CD28⁺.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ – P₇₅) del número absoluto (nº de células/µl) y del porcentaje en sangre periférica de la población de linfocitos CD8⁺CD28⁺ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y pacientes con LLC-B ZAP-70⁺. Los porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD8⁺.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo pacientes ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y pacientes con LLC-B.

- Los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ se caracterizan por presentar una importante redistribución de los linfocitos T CD8⁺ según el grado de activación celular. Esta redistribución consiste en una disminución significativa de linfocitos T CD8⁺ efectores unido a un descenso significativo de linfocitos T CD8⁺ novatos en compensación al incremento significativo de linfocitos memoria central.
- Por su parte los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ presentan un incremento y un descenso significativo de linfocitos T CD8⁺ que expresan CD62L⁺ y CD28⁺ respectivamente.

7. ALTERACIONES DE LAS PRINCIPALES SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS NK (CD3–CD56+) DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENES CON LLC-B AGRUPADOS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.

Dentro del compartimento leucocitario las células NK constituyen una población celular con gran capacidad de reconocer y eliminar células tumorales y células infectadas por virus. Como se indicó anteriormente las células NK (CD3–CD56+) de los pacientes con LLC-B tienen incrementadas su número absoluto con respecto de los controles si bien los valores de porcentaje de esta población celular se encuentran disminuidos.

Dentro de la población de células NK (CD3–CD56+) estudiamos dos subpoblaciones que difieren tanto en funcionalidad como en su fenotipo, (CD56^{low}CD16^{hi} y CD56^{hi}CD16^{low}). Los pacientes con LLC-B ZAP-70[–] se caracterizan por tener disminuidos los porcentajes de ambas subpoblaciones de células NK respecto a los controles sanos (Figura 7.1, panel A y B), siendo esa disminución significativa en la subpoblación CD56^{low}CD16^{hi} (Figura 7.1, panel A).

Sin embargo en el caso de los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺, éstos tienen incrementado significativamente el porcentaje de esta subpoblación respecto a los pacientes ZAP-70[–] (Figura 7.1, panel A), pero por el contrario estos pacientes tienen disminuido significativamente el porcentaje de la subpoblación CD56^{hi}CD16^{low} respecto a los pacientes con LLC-B ZAP-70[–] y los controles sanos (Figura 7.1, panel B).

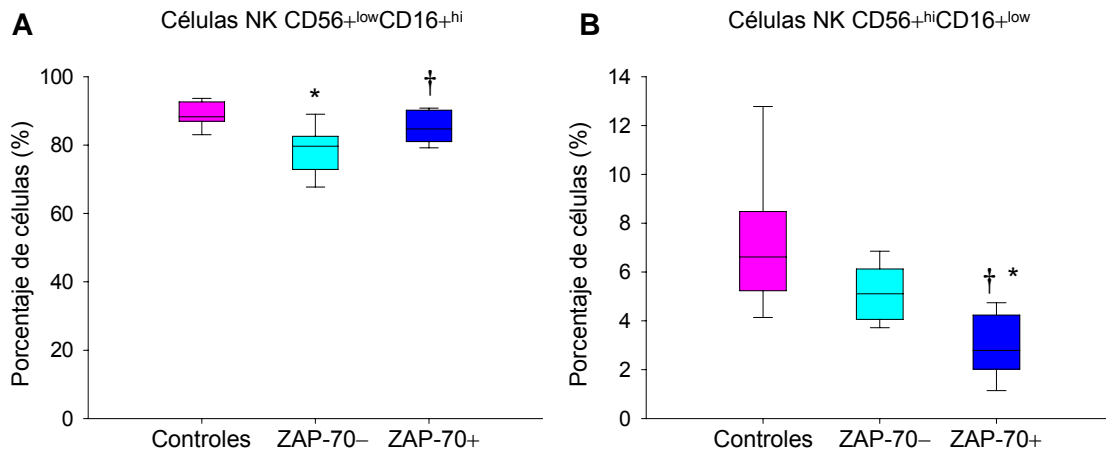


Figura 7.1: Porcentaje de las subpoblaciones de células NK CD56^{low}CD16^{hi} y CD56^{hi}CD16^{low}. Se representa la mediana y el rango intercuartilico (P₂₅ – P₇₅) del porcentaje en sangre periférica de las subpoblaciones de células NK CD56^{low}CD16^{hi} (panel A) y CD56^{hi}CD16^{low} (panel B) en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los valores de porcentajes están referenciados sobre el total de células NK (CD3-CD56+).

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes de LLC-B.

Tanto en la subpoblación CD56^{low}CD16^{hi} como en la CD56^{hi}CD16^{low} se estudió la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD57 (Tabla 7.1). En este caso se observa que el porcentaje de células NK CD56^{low}CD16^{hi} que expresan CD57 se encuentra aumentada significativamente en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto al grupo de pacientes ZAP-70- y al grupo de controles sanos. Señalar que en el caso la expresión de CD69, no se observan variaciones significativas en el porcentaje de células NK CD56^{low}CD16^{hi} que expresan el marcador CD69 entre los grupos de pacientes y controles.

Por su parte los pacientes con LLC-B ZAP-70+ muestran incrementos significativos en el porcentaje de células NK CD56^{hi}CD16^{low}CD69+ y CD56^{hi}CD16^{low}CD57+ respecto a los pacientes con LLC-B ZAP-70- y a los controles sanos.

Tabla 7.1: Porcentaje de células NK CD56^{low}CD16^{hi} y CD56^{hi}CD16^{low} que expresan los marcadores de activación CD69 y CD57.

	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD56 ^{low} CD16 ^{hi} CD69-	84,69 (81,26 - 86,79)	87,43 (75,35 - 96,28)	85,17 (80,16 - 92,58)
CD56 ^{low} CD16 ^{hi} CD69+	15,27 (13,21 - 18,75)	12,57 (3,64 - 24,66)	15,43 (7,33 - 19,84)
CD56 ^{hi} CD16 ^{low} CD69-	92,82 (83,99 - 97,62)	92,82 (57,50 - 99,56)	72,92 †* (55,00 - 92,67)
CD56 ^{hi} CD16 ^{low} CD69+	7,18 (2,39 - 16,01)	6,34 (1,20 - 16,92)	26,09 †* (7,44 - 45,00)
CD56 ^{low} CD16 ^{hi} CD57-	72,81 (60,94 - 84,33)	57,29 (27,18 - 93,46)	42,76 (26,15 - 69,23)
CD56 ^{low} CD16 ^{hi} CD57+	27,19 (15,67 - 39,05)	42,71 * (6,55 - 72,82)	57,24 †* (30,77 - 73,39)
CD56 ^{hi} CD16 ^{low} CD57-	97,49 (93,87 - 100,00)	97,56 (91,08 - 100,00)	92,50 (86,78 - 97,00)
CD56 ^{hi} CD16 ^{low} CD57+	2,51 (0,29 - 5,44)	2,00 (1,44 - 6,01)	6,24 †* (2,03 - 9,50)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ - P₇₅) del porcentaje en sangre periférica de células NK CD56^{low}CD16^{hi} y CD56^{hi}CD16^{low} en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los datos de porcentajes están referenciados sobre el número total de células que componen la subpoblación indicada.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

- En los pacientes con LLC-B ZAP-70+, dentro del descenso significativo observado en las células NK (CD3-CD56+) se destaca la disminución significativa de células NK CD56^{hi}CD16^{low} y el incremento significativo de células NK CD56^{low}CD16^{hi} respecto a los pacientes LLC-B ZAP-70- y los controles sanos.
- Ambas subpoblaciones de células NK se caracterizan en estos pacientes por tener aumentadas las células que se encuentran activadas.

8. ALTERACIONES DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS TK (CD3+CD56+) DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON LLC-B AGRUPADOS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.

Las células TK (CD3+CD56+) son un tipo celular con gran capacidad de lisis celular. En nuestro trabajo no sólo estudiamos el estado de esta población sino también su grado de activación según la expresión de los marcadores CD8 y CD57. Al igual que ocurría con las células NK, en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se observa un incremento significativo del porcentaje de células activadas (según la expresión de CD57) respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos, concretamente de la población CD8+CD57+.

Señalar que en el caso de las poblaciones de células TK no activadas CD8-CD57- y CD8+CD57- se observa una disminución de sus porcentajes en los pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos siendo esta disminución mucho más marcada y significativa de los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (Tabla 8.1).

Tabla 8.1: Porcentaje de células TK (CD3+CD56+) que expresan los marcadores de activación CD8 y CD57.

	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
TK CD8-CD57+	6,28 (4,63 - 12,43)	21,43 (1,02 - 27,37)	8,93 (1,04 - 13,08)
TK CD8+CD57+	21,75 (7,16 - 37,64)	21,50 (3,93 - 40,79)	65,09 †* (51,02 - 78,33)
TK CD8-CD57-	28,50 (9,72 - 33,99)	12,86 (10,32 - 34,05)	5,27 †* (3,15 - 16,48)
TK CD8+CD57-	47,70 (30,69 - 53,39)	23,81 (18,85 - 61,20)	* 16,61 †* (11,24 - 28,00)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje en sangre periférica de células TK CD3+CD56+ en controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los datos de porcentajes están referenciados sobre el número total de células que componen la población indicada.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

➤ **Dentro del incremento significativo observado de las células TK (CD3+CD56+) en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70-, destacamos que dicho incremento en estos pacientes se produce fundamentalmente en células activadas en detrimento de aquellas células TK no activadas.**

9. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS DE LINFOCITOS T EN PACIENTES CON LLC-B AGRUPADOS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.

Los resultados del estudio de la apoptosis de linfocitos T tanto CD4 como CD8 y de sus respectivas subpoblaciones novatas (NAIVE), memoria efectora no terminada (MENT) y memoria efectora terminada (MET) así como memoria central (MC) se obtuvieron como se indicó en el apartado de materiales y métodos, por citometría de flujo de 8 colores y el parámetro utilizado para la medición de la apoptosis fue el índice de apoptosis (*AI*), que muestra la proporción de células apoptóticas respecto a las células totales. Los resultados del porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de cada una de las poblaciones estudiadas se presentan en la condición basal (0 horas) y tras cultivo de 21 horas.

9.1. Estudio de la apoptosis en linfocitos T CD4.

Al estudiar la apoptosis en los linfocitos T CD4⁺ observamos como el porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de los linfocitos T CD4⁺ a tiempo basal son significativamente más bajos en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y los controles sanos, si bien los porcentajes de apoptosis en los tres grupos estudiados no llega a superar el 10% (Figura 9.1.1, panel A). Sin embargo tras 21h de cultivo la situación se revierte siendo en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ donde estas células presentan porcentajes significativamente superiores respecto a los otros dos grupos estudiados, presentando además valores de apoptosis por encima del 50% (Figura 9.1.1, panel B).

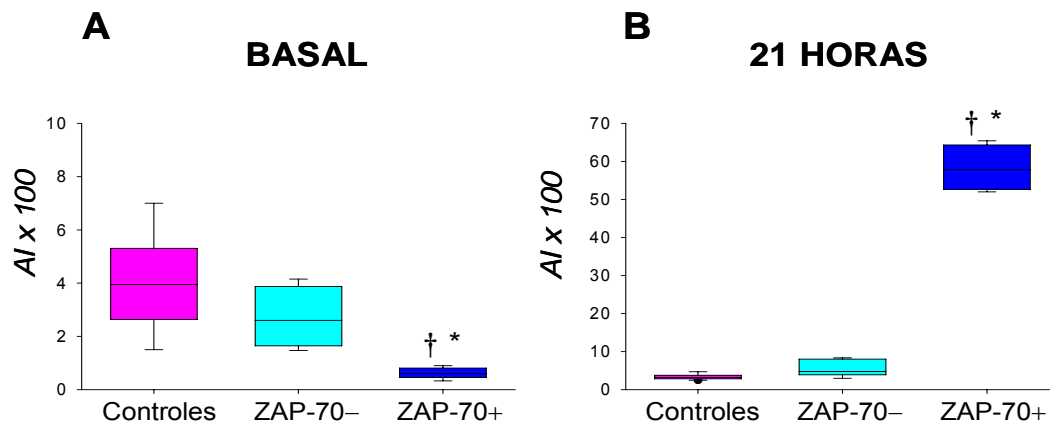


Figura 9.1.1: Porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la población de linfocitos T CD4+.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la población linfocitaria T CD4+ a nivel basal (panel A) y tras cultivo de 21 horas (panel B), de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Dentro de los linfocitos T CD4+ observamos que la subpoblación de linfocitos T CD4+ NAIVE (Figura 9.1.2) presenta un patrón de apoptosis muy similar al indicado anteriormente. Así estas células en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presentan a tiempo basal una apoptosis significativamente menor respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (Figura 9.1.2, panel A), mientras que tras 21h cultivo esta situación revierte dándose en estos pacientes un mayor porcentaje de apoptosis significativamente respecto a los otros 2 grupos estudiados los cuales mantienen los porcentajes de apoptosis muy similares a los que presentaban a tiempo basal (Figura 9.1.2, panel B).

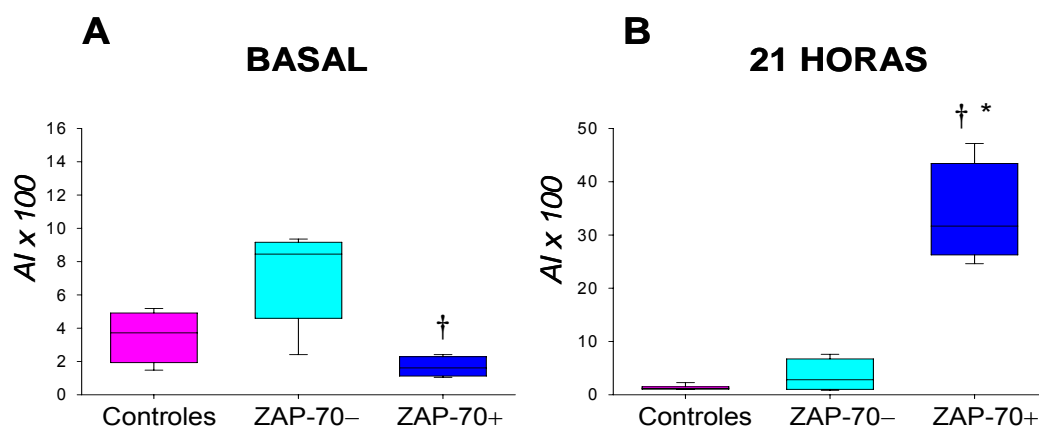


Figura 9.1.2: Porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación de linfocitos T CD4+ NAIVE.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación linfocitaria T CD4+ NAIVE a nivel basal (panel A) y tras cultivo de 21 horas (panel B), de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Dentro de la subpoblación de linfocitos T CD4+ NAIVE, estudiamos la apoptosis de estas células según la ausencia o expresión de los marcadores de activación y adhesión CD28 y CD62L respectivamente. A tiempo basal de forma general en las células de los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se observa una disminución significativa de la apoptosis respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (Tabla 9.1.1). Sin embargo tras 21 horas de cultivo, en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ sólo se mantiene significativamente disminuida la apoptosis respecto a los controles sanos en las células que no expresan CD62L (independientemente de la expresión de CD28). Señalar que a nivel general se puede observar una diferencia en cuanto a la magnitud de la apoptosis según la expresión del marcador CD62L. Así las células que expresan CD62L con independencia de la expresión de CD28 tiene porcentajes de apoptosis que no llegan a superar el 10% mientras que las células que no expresan dicho marcador presentan porcentajes de apoptosis superiores al 40%, fenómeno éste que se observa para todos los grupos y tiempos de cultivo.

Tabla 9.1.1: Porcentaje de apoptosis (AI x 100) en la subpoblación de linfocitos T CD4+ NAIVE según la expresión de CD28 y/o CD62L en pacientes con LLC-B ZAP-70-, ZAP-70+ y controles sanos.

	BASAL			21 HORAS		
	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD62L-CD28+	76,48 (54,06 - 93,86)	79,85 (69,68 - 83,19)	45,84 †* (32,21 - 55,72)	76,55 (55,20 - 82,67)	47,73 * (40,57 - 69,20)	58,42 * (40,00 - 65,03)
CD62L+CD28+	1,56 (1,04 - 2,50)	2,56 (0,44 - 4,81)	0,18 * (0,13 - 1,20)	0,41 (0,29 - 0,59)	0,38 (0,13 - 0,83)	2,74 †* (0,90 - 4,92)
CD62L-CD28-	91,22 (84,51 - 97,08)	94,53 (83,33 - 98,93)	12,50 †* (5,85 - 17,49)	92,00 (82,32 - 94,70)	86,59 (68,75 - 99,55)	62,58 †* (52,38 - 67,05)
CD62L+CD28-	7,93 (4,33 - 22,46)	10,25 (3,61 - 26,86)	0,13 (0,03 - 0,81)	1,07 (0,72 - 1,22)	1,28 (0,20 - 2,18)	1,05 (0,43 - 2,02)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación de linfocitos T CD4+ NAIVE según la expresión de CD28 y CD62L de los diferentes grupos de estudio.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes de LLC-B.

En la subpoblación de linfocitos T CD4+ MENT, de nuevo observamos como en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presentan a tiempo basal un porcentaje significativamente menor de apoptosis respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (Figura 9.1.3, panel A) revertiendo esta situación tras cultivo de 21 horas (Figura 9.1.3, panel B).

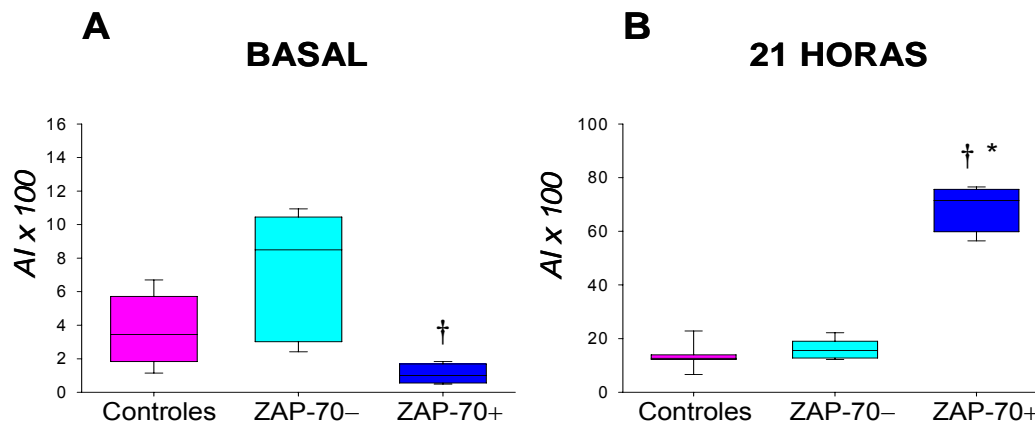


Figura 9.1.3: Porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación de linfocitos T CD4+ MENT.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación linfocitaria T CD4+ MENT a nivel basal (panel A) y tras cultivo de 21 horas (panel B), de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

En cuanto al estudio de la apoptosis según la expresión de los marcadores CD28 y CD62L, observamos que en la subpoblación de linfocitos T CD4+ MENT al igual que ocurría con los linfocitos T CD4+ NAIVE e independientemente de la expresión de CD28 y CD62L, en los pacientes con LLC ZAP-70+ presentan de forma significativa una menor apoptosis a tiempo basal respecto a los pacientes de LLC-B ZAP-70- y los controles sanos, si bien tras el cultivo la apoptosis de estas células en estos pacientes es significativamente mayor a los otros grupos de estudio, los cuales muestran porcentajes de apoptosis muy similares entre ellos (Tabla 9.1.2).

De nuevo se observa una diferencia en cuanto a la magnitud de la apoptosis según la expresión del marcador CD62L. Así las células que expresan CD62L con independencia de la expresión de CD28, en todos los grupos y condiciones estudiadas muestran porcentajes de apoptosis mucho más bajos que aquellas células que no expresan dicho marcador.

Tabla 9.1.2: Porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) en la subpoblación de linfocitos T CD4+ MENT según la expresión de CD28 y/o CD62L en pacientes con LLC-B ZAP-70-, ZAP-70+ y controles sanos.

	BASAL			21 HORAS		
	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD62L-CD28+	5,57 (2,45 - 11,11)	9,00 (6,72 - 11,58)	1,43 †* (1,24 - 3,73)	25,61 (21,01 - 38,03)	28,36 (20,41 - 37,81)	83,69 †* (70,14 - 91,97)
CD62L+CD28+	2,14 (1,16 - 3,17)	2,98 (0,87 - 5,78)	0,51 (0,41 - 0,98)	3,45 (2,44 - 4,84)	3,10 (2,56 - 9,69)	46,05 * (28,20 - 60,00)
CD62L-CD28-	4,20 (2,55 - 10,47)	6,48 (1,85 - 11,81)	0,95 †* (0,47 - 1,22)	17,02 (11,37 - 25,63)	18,85 (15,25 - 19,78)	78,85 (62,17 - 89,74)
CD62L+CD28-	5,94 (1,73 - 12,58)	5,00 (2,22 - 10,33)	0,11 †* (0,03 - 0,34)	7,47 (3,70 - 11,16)	6,71 (4,58 - 8,22)	52,13 †* (42,05 - 70,64)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación de linfocitos T CD4+ MENT según la expresión de CD28 y CD62L de los diferentes grupos de estudio.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes de LLC-B.

En la subpoblación de linfocitos T CD4+ MET, al igual que ocurría con las subpoblaciones NAIIVE y MENT, observamos que en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ estas células presentan a tiempo basal un porcentaje significativamente menor de apoptosis que en los pacientes ZAP-70- (Figura 9.1.4, panel A). Transcurridas 21h de cultivo observamos que en los apacientes ZAP-70+ estas células presentan un incremento significativo del porcentaje de apoptosis respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (Figura 9.1.4, panel B).

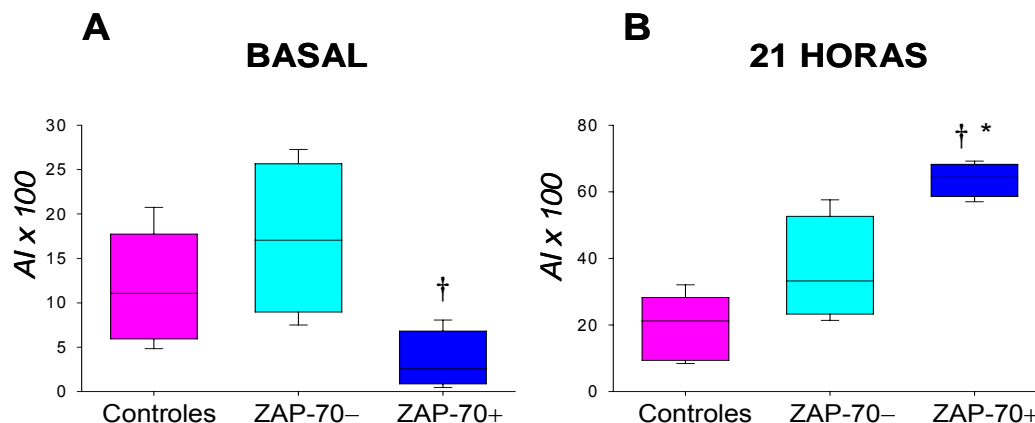


Figura 9.1.4: Porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación de linfocitos T CD4+ MET.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación linfocitaria T CD4+ MET a nivel basal (panel A) y tras cultivo de 21 horas (panel B), de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Por otra parte, los linfocitos T CD4⁺ MET según la expresión de CD28 y CD62L muestran de nuevo a tiempo basal un porcentaje de apoptosis significativamente menor en los pacientes ZAP-70⁺ respecto a los otros dos grupos comparados (Tabla 9.1.3). Tras cultivo esta situación cambia en aquellas células CD62L⁺ (independientemente que expresen o no CD28), las cuales presentan un porcentaje significativamente mayor de apoptosis en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ respecto a los otros grupos comparados, si bien en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ estas células tienen ligeramente disminuida la apoptosis en comparación con los controles sanos.

Por último señalar que al igual que ocurría en las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, NAIVE y MENT existe una diferencia en cuanto a la magnitud de la apoptosis según la expresión del marcador CD62L. Así las células que expresan CD62L con independencia de la expresión de CD28 presentan porcentajes de apoptosis menores a las células que no expresan CD62L.

Tabla 9.1.3: Porcentaje de apoptosis (AI x 100) en la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ MET según la expresión de CD28 y/o CD62L en pacientes con LLC-B ZAP-70⁻, ZAP-70⁺ y controles sanos.

	BASAL			24 HORAS		
	Controles	ZAP-70 ⁻	ZAP-70 ⁺	Controles	ZAP-70 ⁻	ZAP-70 ⁺
CD62L-CD28 ⁺	27,38 (23,65 - 38,73)	17,80 * (8,85 - 27,95)	5,88 * (1,72 - 12,34)	51,23 (47,45 - 63,36)	51,85 (38,21 - 66,52)	54,97 (42,00 - 68,27)
CD62L+CD28 ⁺	8,91 (5,04 - 15,87)	5,94 (2,70 - 11,29)	0,11 †* (0,05 - 0,34)	5,89 (2,57 - 14,29)	2,33 * (0,67 - 8,91)	30,00 †* (25,10 - 39,88)
CD62L-CD28 ⁻	10,81 (3,62 - 24,38)	14,97 (8,06 - 20,88)	1,80 †* (0,64 - 2,91)	32,25 (29,35 - 36,09)	23,37 (17,57 - 31,76)	64,75 (53,70 - 74,50)
CD62L+CD28 ⁻	8,35 (2,20 - 18,11)	7,45 (3,34 - 11,89)	0,93 †* (0,31 - 1,44)	11,37 (4,08 - 15,94)	4,20 (1,66 - 8,94)	21,43 †* (15,39 - 25,07)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ - P₇₅) del porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ MET según la expresión de CD28 y CD62L de los diferentes grupos de estudio.

† Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de pacientes ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺.

* Para valores significativos con p < 0.05 entre grupo de controles sanos y de pacientes de LLC-B.

En relación a la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ MC, éstos muestran el mismo patrón observado hasta ahora. Así a tiempo basal en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ se observa de forma significativa un menor porcentaje de apoptosis de estas células respecto a los otros dos grupos estudiados (Figura 9.1.5, panel A). Sin embargo tras el cultivo en las células de estos pacientes se produce una mayor apoptosis, mientras que tanto en el grupo de pacientes ZAP-70⁻ como en el grupo de controles sanos mantienen

valores de apoptosis muy similares entre si y a los observados a tiempo basal (Figura 9.1.5, panel B).

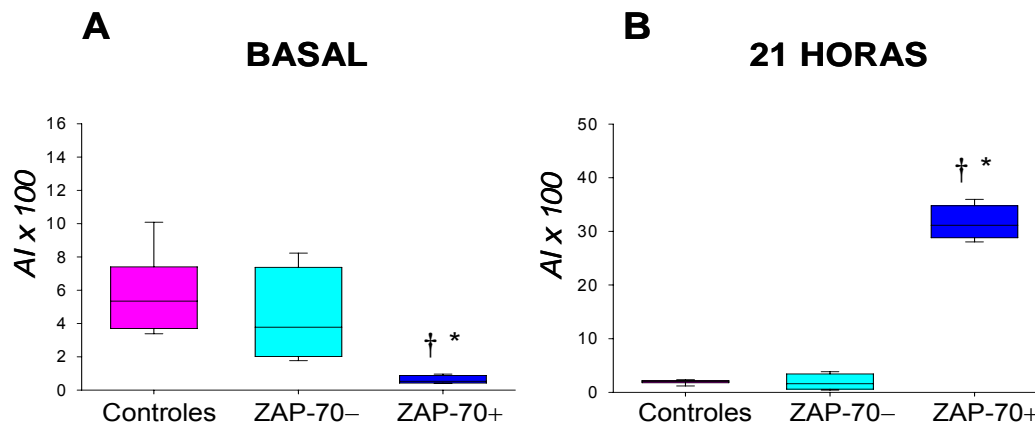


Figura 9.1.5: Porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación de linfocitos T CD4+ MC.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ - P₇₅) del porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación linfocitaria T CD4+ MC a nivel basal (panel A) y tras cultivo de 21 horas (panel B), de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

En cuanto a la apoptosis de los diferentes linfocitos T CD4+ MC según la expresión de los marcadores CD28 y CD62L observamos que en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ casi todos los linfocitos (independientemente de la expresión o no de CD28 y CD62L) presentan significativamente a tiempo basal una menor apoptosis respecto a los otros grupos estudiados. Sin embargo tras el cultivo sólo en los pacientes ZAP-70- muestran valores significativamente menores de apoptosis respecto a los controles sanos, mientras que en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ tienen un grado de apoptosis significativamente mayor que los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (Tabla 9.1.4).

Indicar que al igual que lo observado hasta ahora en las otras subpoblaciones de linfocitos T CD4+, de nuevo se muestra un diferente grado de apoptosis según la expresión de CD62L, ya que son las células CD62L+ las que presentan un menor grado de apoptosis comparadas con las células CD62L-.

Tabla 9.1.4: Porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) en la subpoblación de linfocitos T CD4+ MC según la expresión de CD28 y/o CD62L en pacientes con LLC-B ZAP-70-, ZAP-70+ y controles sanos.

	BASAL			21 HORAS		
	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD62L-CD28+	18,45 (14,92 - 23,41)	8,95 * (5,03 - 15,18)	2,83 †* (1,36 - 4,29)	10,21 (6,57 - 20,22)	6,58 * (2,16 - 14,24)	50,00 †* (37,50 - 59,67)
CD62L+CD28+	2,03 (1,71 - 3,24)	2,90 (1,07 - 4,12)	0,52 †* (0,23 - 0,78)	1,44 (1,11 - 1,78)	0,68 (0,28 - 1,87)	5,32 † (1,41 - 7,33)
CD62L-CD28-	79,58 (71,10 - 91,63)	54,17 * (45,31 - 78,23)	1,49 †* (0,80 - 1,95)	32,63 (19,56 - 46,24)	21,95 (18,06 - 35,21)	53,33 (34,62 - 58,99)
CD62L+CD28-	19,10 (10,16 - 34,39)	5,06 (2,98 - 18,83)	0,75 (0,13 - 1,25)	2,55 (1,07 - 2,99)	2,82 (1,79 - 4,94)	4,68 †* (2,70 - 6,81)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación de linfocitos T CD4+ MC según la expresión de CD28 y CD62L de los diferentes grupos de estudio.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes de LLC-B.

9.2. Estudio de la apoptosis en linfocitos T CD8.

El estudio de la apoptosis en los linfocitos T CD8+ nos muestra como el porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de estos linfocitos a tiempo basal son significativamente más bajos en los dos grupos de pacientes con LLC-B que en los controles sanos (Figura 9.2.1, panel A). Sin embargo tras 21h de cultivo, la situación se revierte en los dos grupos de pacientes con LLC-B donde estas células ven aumentados significativamente sus porcentajes de apoptosis, si bien es en el grupo de pacientes ZAP-70+ donde este incremento es más marcado y significativo con respecto a los otros dos grupos estudiados (Figura 9.2.1, panel B).

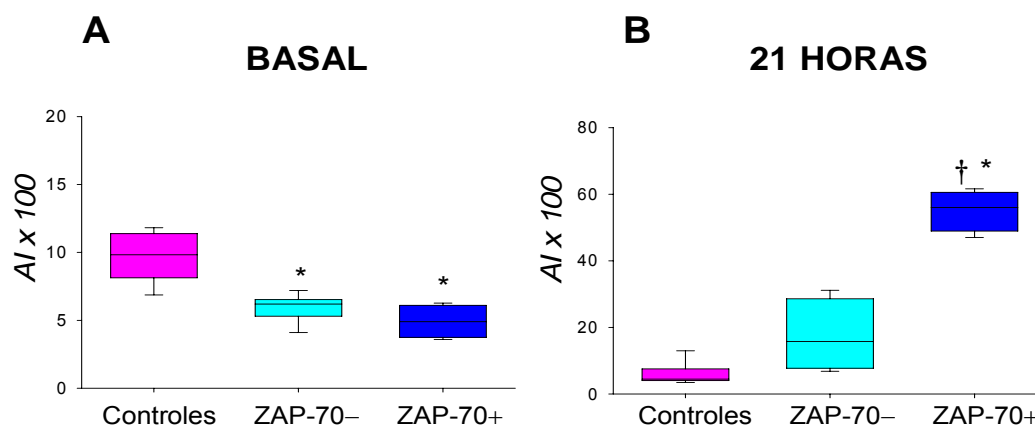


Figura 9.2.1: Porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la población de linfocitos T CD8+.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la población linfocitaria T CD8+ a nivel basal (panel A) y tras cultivo de 21 horas (panel B), de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

En cuanto al grado de activación de los linfocitos T CD8+, observamos que los linfocitos T CD8+ NAIVE, a diferencia de lo mostrado en los CD4+, a tiempo basal se caracterizan por tener en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ un porcentaje de apoptosis significativamente menor que los pacientes ZAP-70- en los cuales se registra el mayor porcentaje de apoptosis entre los tres grupos estudiados (Figura 9.2.2, panel A). No obstante tras cultivo de 21 horas tanto en los pacientes ZAP-70- como en los ZAP-70+ estas células presentan porcentajes de apoptosis similares entre si y significativamente superiores a los registrados en los controles sanos (Figura 9.2.2, panel B).

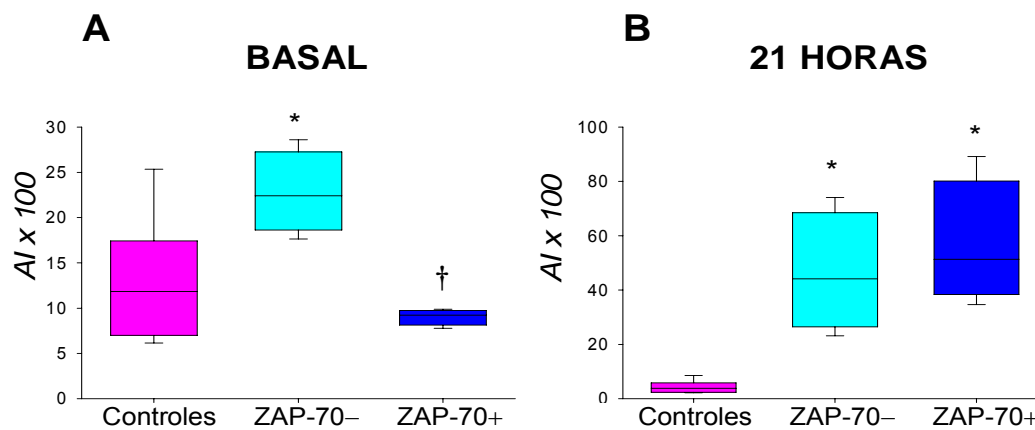


Figura 9.2.2: Porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación de linfocitos T CD8+ NAIVE.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ - P₇₅) del porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación linfocitaria T CD8+ NAIVE a nivel basal (panel A) y tras cultivo de 21 horas (panel B), de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Dentro de los linfocitos T CD8+ NAIVE, observamos que prácticamente todos los linfocitos T CD8+ independientemente de la expresión o no de CD28 y CD62L muestran a tiempo basal valores de apoptosis significativamente menores en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los otros dos grupos estudiados. Sin embargo tras cultivo en estos pacientes están incrementados los porcentajes de apoptosis de todas las células de manera significativa con respecto a los otros dos grupos estudiados (Tabla 9.2.1).

Tabla 9.2.1: Porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) en la subpoblación de linfocitos T CD8+ NAIVE según la expresión de CD28 y/o CD62L en pacientes con LLC-B ZAP-70-, ZAP-70+ y controles sanos.

	BASAL			21 HORAS		
	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD62L-CD28+	31,76 (22,90 - 46,55)	37,03 (20,29 - 53,29)	11,43 †* (9,10 - 15,22)	32,46 (13,16 - 43,85)	72,32 * (62,18 - 84,49)	82,95 * (68,57 - 94,36)
CD62L+CD28+	3,06 (1,48 - 6,25)	9,21 * (1,97 - 14,32)	3,80 (1,25 - 5,37)	0,95 (0,48 - 1,96)	4,81 (0,97 - 9,16)	16,28 (13,33 - 21,17)
CD62L-CD28-	44,63 (38,41 - 59,67)	41,88 (27,75 - 60,35)	17,28 †* (12,28 - 23,09)	31,38 (20,47 - 43,62)	79,75 * (73,51 - 86,30)	80,19 * (71,92 - 88,06)
CD62L+CD28-	13,43 (6,63 - 18,42)	20,29 (14,97 - 37,92)	6,72 † (3,42 - 9,90)	1,93 (1,18 - 2,87)	22,98 * (16,03 - 35,00)	13,70 * (6,98 - 17,23)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación de linfocitos T CD8+ NAIVE según la expresión de CD28 y CD62L de los diferentes grupos de estudio.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes de LLC-B.

Dentro de la subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD8+ observamos que la población de linfocitos T CD8+ MENT si bien a tiempo basal no muestran diferencias significativas del porcentaje de apoptosis entre los diferentes grupos estudiados (Figura 9.2.3, panel A), tras 21 horas de cultivo en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ estas células presentan valores significativamente mayores de apoptosis que en los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (Figura 9.2.3, panel B).

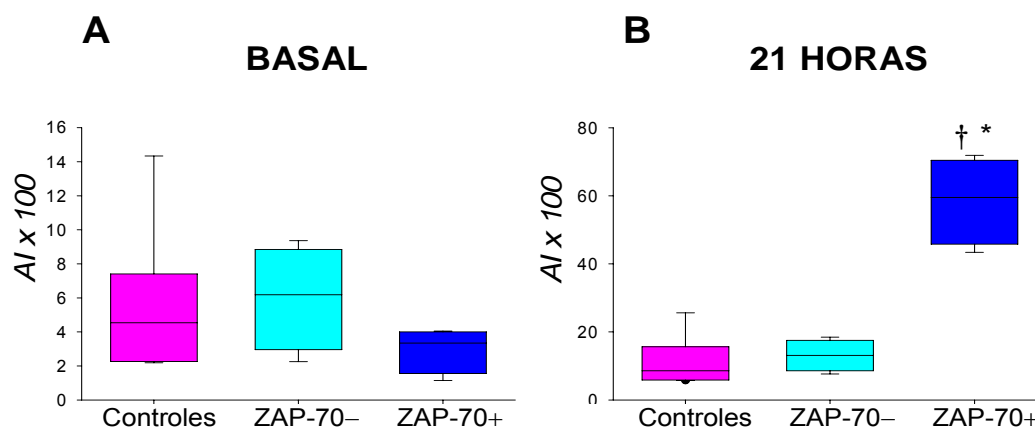


Figura 9.2.3: Porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación de linfocitos T CD8+ MENT.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación linfocitaria T CD8+ MENT a nivel basal (panel A) y tras cultivo de 21 horas (panel B), de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Dentro de la subpoblación de linfocitos T CD8+ MENT observamos que a tiempo basal apenas hay diferencias significativas en cuanto a la apoptosis de las células según la expresión de CD28 y CD62L (Tabla 9.2.2). Por otra parte en aquellas células que no expresan CD62L se observa que tras cultivo tienen incrementado significativamente el porcentaje de apoptosis en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos.

Tabla 9.2.2: Porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) en la subpoblación de linfocitos T CD8+ MENT según la expresión de CD28 y/o CD62L en pacientes con LLC-B ZAP-70-, ZAP-70+ y controles sanos.

	BASAL			21 HORAS		
	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD62L-CD28+	6,69 (2,46 - 11,10)	7,43 (4,72 - 9,72)	8,82 (5,16 - 11,36)	18,61 (10,95 - 29,70)	16,59 (9,48 - 22,35)	28,46 †* (18,71 - 35,98)
CD62L+CD28+	2,03 (0,84 - 4,07)	3,17 (1,66 - 4,71)	3,33 (1,30 - 4,07)	3,40 (2,64 - 6,27)	4,05 (2,49 - 6,18)	4,01 (1,46 - 5,77)
CD62L-CD28-	6,37 (2,22 - 14,07)	11,05 (4,05 - 21,35)	3,50 * (1,94 - 5,22)	11,69 (6,78 - 21,54)	25,40 (19,96 - 35,57)	15,41 †* (8,63 - 26,87)
CD62L+CD28-	2,41 (1,13 - 8,71)	1,01 (0,44 - 4,13)	0,76 †* (0,24 - 0,96)	5,35 (4,04 - 11,51)	3,17 (1,70 - 7,84)	3,17 (1,23 - 6,68)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación de linfocitos T CD8+ MENT según la expresión de CD28 y CD62L de los diferentes grupos de estudio.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes de LLC-B.

En el caso de la subpoblación de linfocitos T CD8+ MET al igual que ocurría con la subpoblación T CD8+ NAIVE, observamos que apenas existen diferencias a tiempo basal en la apoptosis para esa población (Figura 9.2.4, panel A). Sin embargo tras cultivo se aprecia un incremento de la apoptosis de estas células en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ que es significativo respecto a los otros dos grupos objeto de estudio (Figura 9.2.4, panel B).

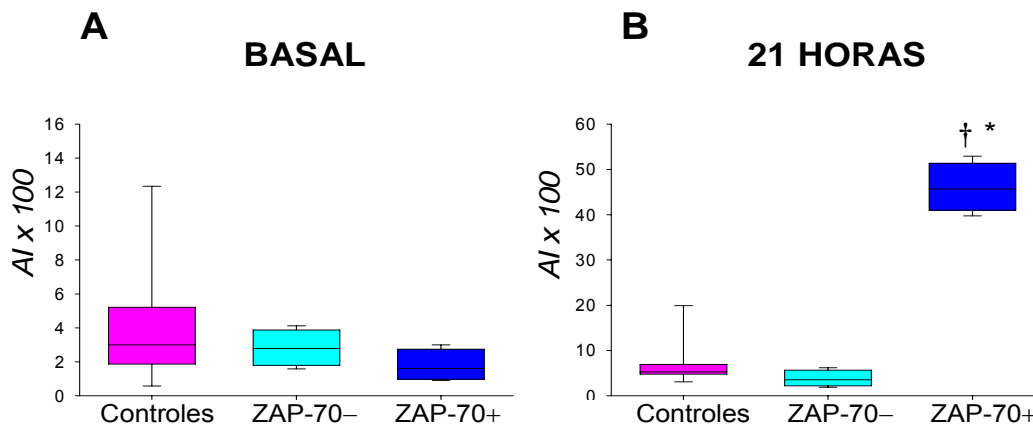


Figura 9.2.4: Porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación de linfocitos T CD8+ MET.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación linfocitaria T CD8+ MET a nivel basal (panel A) y tras cultivo de 21 horas (panel B), de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Este patrón se repite en los linfocitos T CD8+ MET independientemente de la expresión de los marcadores CD28 y CD62L (Tabla 9.2.3). En este caso observamos de nuevo como a tiempo basal no existen diferencias significativas en la apoptosis de estas células entre los dos grupos de pacientes con LLC-B y los controles sanos. Pero tras cultivo, en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se aprecia respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos un incremento importante y significativo de la apoptosis en casi todas las células independientemente de que expresen o no CD28 y CD62L.

Tabla 9.2.3: Porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) en la subpoblación de linfocitos T CD8+ MET según la expresión de CD28 y/o CD62L en pacientes con LLC-B ZAP-70-, ZAP-70+ y controles sanos.

	BASAL			21 HORAS		
	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD62L-CD28+	5,61 (2,62 - 10,14)	5,23 (0,90 - 8,57)	2,80 (2,10 - 3,05)	11,69 (10,84 - 19,87)	6,17 (3,91 - 8,95)	58,82 †*
CD62L+CD28+	4,46 (2,07 - 11,90)	5,10 (1,64 - 7,30)	2,27 (1,80 - 4,33)	5,29 (3,57 - 13,97)	4,10 (1,46 - 7,84)	66,67 †
CD62L-CD28-	4,12 (2,79 - 6,82)	3,01 (1,85 - 10,75)	1,41 (1,10 - 2,57)	6,41 (4,36 - 11,31)	4,98 (3,62 - 6,87)	48,83
CD62L+CD28-	2,14 (1,12 - 8,07)	1,35 (0,07 - 3,66)	0,18 (0,03 - 0,57)	4,07 (2,50 - 9,78)	1,96 *	47,62 †*

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis ($AI \times 100$) de la subpoblación de linfocitos T CD8+ MET según la expresión de CD28 y CD62L de los diferentes grupos de estudio.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes de LLC-B.

Por último, en los linfocitos T CD8⁺ MC observamos que a tiempo basal en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ esta subpoblación celular presenta una disminución significativa de la apoptosis respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y los controles sanos (Figura 9.2.5, panel A). Esta situación tras cultivo se revierte mostrando un fuerte y significativo incremento de la apoptosis de estas células en los dos grupos de pacientes con LLC-B en comparación a los controles sanos, siendo en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ donde la apoptosis de estas células presenta una mayor diferencia significativa respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y los controles sanos (Figura 9.2.5, panel B).

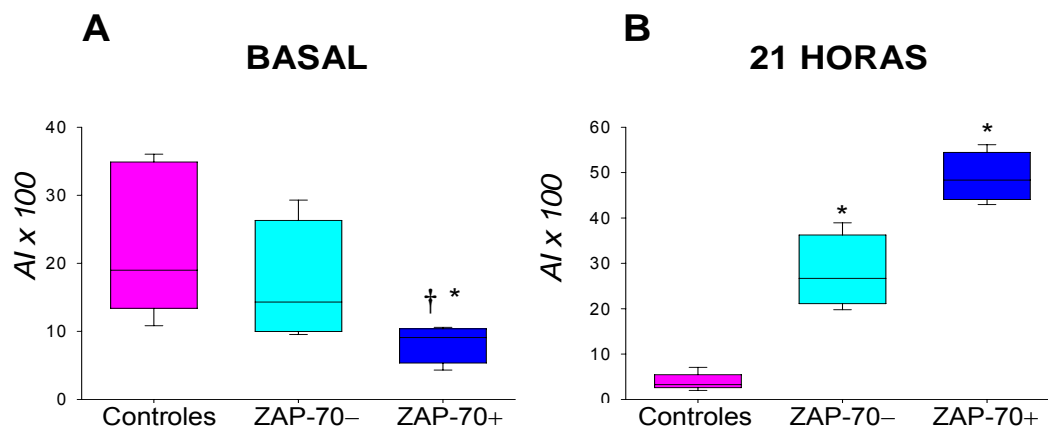


Figura 9.2.5: Porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ MC.

Se representa la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅ – P₇₅) del porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación linfocitaria T CD8⁺ MC a nivel basal (panel A) y tras cultivo de 21 horas (panel B), de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ y pacientes con LLC-B ZAP-70⁺.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70⁻ y ZAP-70⁺.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Dentro de los linfocitos T CD8⁺ MC según la expresión de los marcadores CD28 y CD62L (Tabla 9.2.4), observamos que a tiempo basal no existen diferencias significativas importantes entre la apoptosis de estas células en los pacientes con LLC-B y los controles sanos. Sin embargo tras 21 horas de cultivo se aprecia en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ un incremento significativo de la apoptosis en las células CD28⁺ respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y controles sanos.

Tabla 9.2.4: Porcentaje de apoptosis (AI x 100) en la subpoblación de linfocitos T CD8+ MC según la expresión de CD28 y/o CD62L en pacientes con LLC-B ZAP-70-, ZAP-70+ y controles sanos.

	BASAL			21 HORAS		
	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD62L-CD28+	18,80 (14,45 - 30,12)	18,02 (13,22 - 21,26)	17,21 (12,27 - 19,05)	9,86 (4,79 - 11,50)	4,86 (2,29 - 6,36)	22,67 †* (14,84 - 28,07)
CD62L+CD28+	3,77 (1,95 - 6,38)	2,84 (1,39 - 8,47)	1,47 (1,35 - 4,00)	1,40 (0,59 - 2,74)	1,34 (0,20 - 3,00)	3,39 * (1,09 - 5,39)
CD62L-CD28-	58,67 (50,61 - 75,13)	65,66 * (53,62 - 73,33)	46,92 (23,82 - 54,76)	21,45 (12,54 - 33,09)	10,39 * (7,88 - 20,20)	10,81 * (9,02 - 17,29)
CD62L+CD28-	14,56 (7,79 - 22,76)	8,17 * (3,54 - 17,74)	1,76 (0,91 - 2,81)	2,55 (1,27 - 5,09)	1,25 (0,70 - 5,15)	4,23 (1,63 - 7,22)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de apoptosis (AI x 100) de la subpoblación de linfocitos T CD8+ MC según la expresión de CD28 y CD62L de los diferentes grupos de estudio.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes de LLC-B.

Por último indicar que al igual a lo observado en los linfocitos T CD4+, en el caso de los linfocitos T CD8+ tanto en la subpoblación NAIVE como MENT y MC, se observa una diferencia en el grado de apoptosis de las células dependiendo de la expresión CD62L. De esta manera las células que expresan CD62L, independientemente de la expresión o no de CD28, presentan un grado de apoptosis mucho menor que aquellas células que no expresan CD62L.

9.3. Estudio de correlación entre la apoptosis de linfocitos T y la expresión de CD45RO y CD95.

En los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se procedió a realizar el test de correlación de *Pearson* entre los valores de apoptosis detectados en linfocitos T CD4+ y CD8+ y los valores de porcentaje de linfocitos T CD4+CD45RO+CD95+ y de linfocitos T CD8+CD45RO+CD95+ respectivamente, para determinar la posible relación entre este fenotipo y el grado de apoptosis detectado en las células de estos pacientes.

Los resultados del estudio de correlación nos mostró en el caso los linfocitos T CD4+ una fuerte correlación significativa entre los valores de porcentaje de linfocitos T CD4+CD45RO+CD95+ y el porcentaje de apoptosis de los linfocitos T CD4+ ($r = 0,72$ y $p < 0.01$). Por otra parte en los linfocitos T CD8+ también se observó una fuerte

correlación significativa entre el fenotipo CD45RO+CD95+ de estas células y su grado de apoptosis ($r = 0,80$ y $p < 0.01$).

- Los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se caracterizan por presentar a tiempo basal tanto en linfocitos T CD4+ como en los CD8+ una apoptosis significativamente menor respecto a los pacientes LLC-B ZAP-70- y los controles sanos, revertiendo esta situación tras cultivo *in vitro* de 21 horas.
- Existe un diferente grado de apoptosis de los linfocitos T según la expresión de CD62L, mostrando un grado de apoptosis mucho menor aquellas células T que expresan CD62L+ en todas las poblaciones celulares y condiciones estudiadas.
- En los pacientes con LLC-B ZAP-70+ existe una correlación significativa entre la coexpresión de CD45RO y CD95 y el porcentaje de apoptosis que presentan los linfocitos T CD4+ y CD8+.

10. ESTUDIO DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS PRODUCTORAS DE CITOCINAS EN LOS DIFERENTES ESTADOS DE ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T EN PACIENTES CON LLC-B AGRUPADOS EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70.

10.1 Estudio del porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de citocinas.

En este estudio observamos que en los pacientes con LLC-B, a nivel general se producen aumentos significativos en los porcentajes de células T CD4+ productoras de las citocinas estudiadas (IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-4, IL-10). No obstante, señalar que estos aumentos son significativamente menos elevados en los pacientes de LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- en los porcentajes de células productoras de citocinas proinflamatorias IFN- γ , TNF- α . Sin embargo, en los pacientes ZAP-70+ los porcentajes de células T CD4+ productoras de IL-4 e IL-10 están incrementados significativamente respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos. Estos pacientes además de caracterizan por tener similares los valores de células productoras de IL-2 respecto a los controles sanos (Tabla 10.1.1).

Tabla 10.1.1: Porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de citocinas.

	Controles	ZAP-70-		ZAP-70+	
CD4 IL2+	15,50 (5,40 - 21,70)	22,10 (15,50 - 28,40)	*	14,30 (8,75 - 21,58)	†
CD4 IFN- γ +	5,90 (3,30 - 11,20)	21,50 (15,10 - 24,20)	*	15,35 (8,65 - 26,25)	†*
CD4 TNF- α +	3,70 (0,60 - 4,70)	11,40 (9,30 - 13,90)	*	8,55 (6,58 - 10,83)	†*
CD4 IL4+	0,45 (0,30 - 1,20)	1,00 (0,50 - 1,10)		1,60 (0,60 - 2,60)	*
CD4 IL10+	1,25 (0,60 - 2,90)	1,30 (1,10 - 1,60)		3,70 (2,43 - 4,38)	†*

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de linfocitos T CD4+ productoras de las citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los datos de porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD4+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Al profundizar nuestro análisis sobre estas alteraciones estudiando el estado de activación de los linfocitos T CD4+ encontramos que las alteraciones observadas en el porcentaje de linfocitos T CD4+ productoras de IL2 se deben fundamentalmente a la subpoblación de células NAIVE y MENT (Tabla 10.1.2).

Tabla 10.1.2: Porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de citocinas según su estado de activación.

	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+	
NAIVE	CD4 IL2+	15,90 (5,10 - 22,20)	23,60 * (17,50 - 27,00)	14,00 † (10,00 - 23,25)
	CD4 IFN- γ +	1,85 (0,30 - 2,40)	4,60 * (2,70 - 6,30)	14,55 †* (6,88 - 26,05)
	CD4 TNF- α +	1,00 (0,30 - 1,50)	2,40 * (2,30 - 4,90)	4,15 * (3,38 - 5,23)
	CD4 IL4+	0,15 (0,00 - 0,30)	0,40 (0,10 - 0,80)	0,90 †* (0,33 - 1,55)
	CD4 IL10+	0,25 (0,20 - 3,20)	0,60 (0,50 - 0,70)	2,35 †* (1,83 - 3,03)
MENT	CD4 IL2+	12,85 (5,80 - 15,80)	24,70 * (12,90 - 28,20)	14,75 † (5,05 - 27,38)
	CD4 IFN- γ +	15,55 (11,90 - 24,40)	58,70 * (53,30 - 61,20)	20,25 † (7,35 - 54,83)
	CD4 TNF- α +	8,15 (7,60 - 13,50)	26,70 * (22,20 - 30,00)	9,90 † (5,58 - 21,95)
	CD4 IL4+	0,55 (0,40 - 2,50)	0,70 (0,60 - 1,90)	1,60 †* (0,80 - 2,70)
	CD4 IL10+	2,25 (1,20 - 3,80)	1,40 (0,90 - 2,70)	4,95 (1,75 - 8,68)
MET	CD4 IL2+	13,35 (2,80 - 19,10)	6,70 (2,40 - 9,00)	7,55 (3,73 - 15,65)
	CD4 IFN- γ +	21,40 (5,70 - 30,60)	74,70 * (69,70 - 82,40)	36,15 †* (25,53 - 60,95)
	CD4 TNF- α +	9,65 (3,00 - 13,40)	20,60 * (18,10 - 24,10)	9,75 † (8,55 - 15,23)
	CD4 IL4+	1,35 (0,10 - 2,10)	0,20 (0,00 - 0,90)	1,25 (0,70 - 4,20)
	CD4 IL10+	16,85 (7,50 - 26,00)	2,30 * (1,50 - 2,90)	3,10 †* (2,78 - 11,15)
MC	CD4 IL2+	0,30 (0,10 - 0,60)	0,40 * (0,30 - 1,30)	1,20 * (0,78 - 1,70)
	CD4 IFN- γ +	8,40 (6,40 - 10,20)	16,70 * (13,50 - 21,60)	13,05 † (4,85 - 31,53)
	CD4 TNF- α +	1,60 (0,70 - 2,50)	2,30 (0,70 - 3,10)	2,80 * (2,13 - 12,40)
	CD4 IL4+	19,55 (8,60 - 22,70)	30,30 * (23,40 - 39,30)	17,15 † (13,40 - 31,93)
	CD4 IL10+	5,40 (2,30 - 8,30)	17,80 * (14,10 - 23,10)	11,50 †* (8,18 - 17,30)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de las citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+, en cada una de las subpoblaciones celulares según su estado de activación. Los datos de porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD4+ para cada una de las subpoblaciones definidas según el estado de activación.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Por su parte las alteraciones observadas en el porcentaje de células productoras de IFN- γ se deben sobre todo a la subpoblación de células memoria efectora (MENT Y MET) y a la población de células memoria central. En cuanto a las diferencias descritas para TNF- α , éstas se deben básicamente a las poblaciones efectoras (Tabla 10.1.2).

En lo referente a las diferencias encontradas en los porcentajes de células productoras de las citocinas IL-4 e IL-10, observamos que las alteraciones en la producción de IL-4 se fundamenta básicamente en las subpoblaciones de linfocitos NAIVE y MENT, mientras que las alteraciones en la producción IL-10 se deben a la subpoblación de linfocitos NAIVE (Tabla 10.1.2).

- **En los pacientes con LLC-B, independientemente de la expresión de ZAP-70, se observa un incremento significativo de los linfocitos T CD4+ productores de las citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α respecto a los controles sanos.**
- **Existe un patrón diferencial de producción de citocinas asociado a la expresión de ZAP-70, de forma que los pacientes ZAP-70+ se caracterizan por un patrón Th2 (alta producción de IL-4 e IL-10) y los pacientes ZAP-70- por un patrón Th1 (alta producción de IL-2, IFN- γ y TNF- α).**
- **Las diferencias significativas observadas en cuanto a la producción de citocinas entre los grupos de pacientes y los controles sanos se dan fundamentalmente en las poblaciones de linfocitos T CD4+ novatos y efectoras.**

10.2 Estudio del porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de citocinas.

En nuestro trabajo observamos que en los linfocitos T CD8+ contrariamente a lo observado en los linfocitos T CD4+, los pacientes con LLC-B a nivel general, presentan incrementos significativos sólo en los porcentajes de células productoras de IFN- γ y de TNF- α , valores que se encuentran aumentados 3 veces con respecto a los controles sanos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes según la expresión de ZAP-70 (Tabla 10.2.1).

En el caso del resto de citocinas estudiadas (IL-2, IL-4 e IL-10) indicar que si bien los dos grupos de pacientes con LLC-B presentan valores superiores a los de los controles, estos porcentajes a excepción de IL-10 en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ no presentan aumentos significativos como los mencionados anteriormente (Tabla 10.2.1).

Tabla 10.2.1: Porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de citocinas.

	Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
CD8 IL2+	4,95 (2,00 - 5,20)	5,80 (4,00 - 7,50)	5,30 (3,23 - 8,45)
CD8 IFN- γ +	12,40 (9,70 - 30,80)	59,30 (54,10 - 63,80)	53,55 (49,68 - 79,70)
CD8 TNF- α +	2,70 (1,60 - 3,40)	8,60 (6,40 - 9,20)	9,90 (5,40 - 11,50)
CD8 IL4+	0,55 (0,30 - 0,90)	1,00 (0,40 - 1,10)	1,55 (0,45 - 2,40)
CD8 IL10+	1,45 (0,90 - 3,50)	2,50 (1,80 - 2,70)	3,00 (2,53 - 5,95)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de las citocinas IL-2, IFN γ , TNF α , IL-4 e IL-10 de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+. Los datos de porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD8+.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

Al estudiar el estado de activación de los linfocitos T CD8+ podemos observar que las alteraciones descritas en el porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ se deben fundamentalmente a las subpoblaciones de células efectoras (MENT y MET) además de la subpoblación de células MC (Tabla 10.2.2).

Por su parte las alteraciones de los porcentajes de producción de TNF- α están basadas en las diferencias existentes en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ NAIVE y MENT. En el caso de las alteraciones observadas en los porcentajes de producción de IL-10, estas se deben fundamentalmente a la subpoblación de linfocitos MENT (Tabla 10.2.2).

Por último señalar en relación con los porcentajes de linfocitos T CD8+ productores de IL-2 e IL-4, que los pacientes con LLC-B presentan pocas diferencias con los controles sanos y que estas diferencias derivan principalmente de pequeñas alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ NAIVE y MENT, y efectoras (MENT y MET) respectivamente para esas citocinas (Tabla 10.2.2).

Tabla 10.2.2: Porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de citocinas según su estado de activación.

		Controles	ZAP-70-	ZAP-70+
NAIVE	CD8 IL2+	8,45 (2,70 - 12,00)	5,90 (5,70 - 12,20)	4,40 †* (2,70 - 6,10)
	CD8 IFN- γ +	26,75 (9,70 - 44,80)	38,40 (34,40 - 55,20)	57,20 * (36,90 - 70,38)
	CD8 TNF- α +	3,75 (1,60 - 4,10)	4,70 (4,00 - 8,30)	6,15 * (2,13 - 9,20)
	CD8 IL4+	0,60 (0,30 - 1,20)	1,10 (0,70 - 2,00)	2,20 * (1,60 - 2,88)
	CD8 IL10+	2,25 (0,60 - 3,60)	1,70 (1,10 - 3,70)	3,80 † (2,28 - 7,28)
MENT	CD8 IL2+	3,20 (0,80 - 4,10)	6,40 (3,90 - 10,20)	10,90 * (4,43 - 13,25)
	CD8 IFN- γ +	6,05 (4,80 - 10,30)	53,30 (48,00 - 62,50)	37,45 †* (15,70 - 70,83)
	CD8 TNF- α +	2,45 (1,60 - 3,50)	10,50 (9,40 - 20,00)	20,15 * (6,78 - 24,60)
	CD8 IL4+	0,80 (0,50 - 1,00)	0,80 (0,70 - 1,30)	1,00 (0,33 - 7,75)
	CD8 IL10+	1,40 (1,20 - 3,40)	4,00 (1,20 - 6,20)	5,65 †* (2,50 - 10,15)
MET	CD8 IL2+	1,25 (0,80 - 1,60)	1,90 (0,90 - 2,90)	1,85 * (1,08 - 7,05)
	CD8 IFN- γ +	9,45 (7,70 - 28,70)	70,70 (61,60 - 77,40)	58,80 * (32,50 - 87,05)
	CD8 TNF- α +	1,75 (1,00 - 2,70)	9,90 (5,10 - 11,80)	8,65 * (5,03 - 14,38)
	CD8 IL4+	0,25 (0,20 - 0,50)	0,60 (0,20 - 0,60)	1,50 * (0,30 - 4,20)
	CD8 IL10+	2,20 (0,60 - 3,60)	0,70 (0,50 - 2,20)	3,20 † (2,18 - 17,05)
MC	CD8 IL2+	0,85 (0,50 - 3,00)	0,70 (0,60 - 1,40)	0,65 (0,03 - 1,43)
	CD8 IFN- γ +	27,50 (17,70 - 41,40)	56,80 (50,00 - 58,40)	52,75 * (19,95 - 72,35)
	CD8 TNF- α +	3,40 (0,70 - 6,00)	1,40 (1,30 - 3,30)	3,90 (0,90 - 4,95)
	CD8 IL4+	10,70 (8,30 - 14,90)	19,70 (8,30 - 25,60)	7,75 †* (1,50 - 13,55)
	CD8 IL10+	6,10 (4,50 - 7,50)	9,70 (7,40 - 20,40)	6,65 † (3,23 - 9,25)

Se representa la mediana y el rango intercuartílico ($P_{25} - P_{75}$) del porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de las citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 de controles sanos, pacientes con LLC-B ZAP-70- y pacientes con LLC-B ZAP-70+, en cada una de las subpoblaciones celulares según su estado de activación. Los datos de porcentajes están referenciados al número total de linfocitos CD4+ para cada una de las subpoblaciones definidas según el estado de activación.

† Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de pacientes ZAP-70- y ZAP-70+.

* Para valores significativos con $p < 0.05$ entre grupo de controles sanos y de pacientes con LLC-B.

- **En los pacientes con LLC-B, independientemente de la expresión de ZAP-70 se observa un incremento significativo de los linfocitos T CD8+ productores de las citocinas IFN- γ y TNF- α respecto a los controles sanos.**
- **Las diferencias observadas en los porcentajes de células productoras de las citocinas IFN- γ y TNF- α con respecto a los controles sanos se debe fundamentalmente a las subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD8+.**

DISCUSIÓN

La LLC-B es un síndrome linfoproliferativo maligno heterogéneo no sólo en su historia natural sino también en su biología. Se desconoce la causa de su variabilidad clínica y pronóstica y sin embargo distintas alteraciones acumuladas por las células leucémicas y por el sistema inmune del paciente se implican en su patogenia. En este sentido se ha hipotetizado que las células y moléculas inmunitarias contribuyen de una manera efectiva en el desarrollo y mantenimiento de la proliferación linfocitaria leucémica. Esta participación puede ser facilitada por la deficiencia de los mecanismos efectores antitumorales o por el favorecimiento de un entorno de crecimiento y supervivencia de las células leucémicas (Álvarez-Mon M, 1986; 1989). La posibilidad de existencia de patrones de alteración biológica que se relacionen con los estadios y criterios pronósticos de la enfermedad es un objetivo crítico para el avance en el conocimiento de la enfermedad y en la optimización de su manejo clínico.

Nuestro trabajo pretende aportar nuevos conocimientos a esta estrategia de estudios involucrados dentro de la leucemia linfática crónica. Nos hemos centrado en la caracterización mediante nuevos criterios de la distribución, estado de activación y capacidad funcional de diferentes poblaciones celulares del sistema inmunológico de potencial relevancia patogénica en pacientes con LLC-B. Estas alteraciones se han investigado asociadas a las características clínicas y pronósticas de la enfermedad. De esta manera hemos estudiado como factor biológico diferencial crítico la expresión de ZAP-70 por las células B leucémicas.

Consecuentemente uno de los primeros objetivos de este trabajo ha sido categorizar los pacientes con LLC-B en estadio inicial de la enfermedad en dos grupos de pacientes de diferente pronóstico atendiendo a la de expresión de ZAP-70 en sus células B leucémicas.

La metodología para el análisis de la expresión de ZAP-70 en la LLC-B es un aspecto controvertido. La aplicación de la citometría de flujo para estudiar el pronóstico de estos pacientes ha sido objetivo de diferentes grupos de investigación, con especial énfasis en la reproducibilidad de los resultados. Se ha propuesto la expresión de los resultados como el porcentaje de células B leucémicas positivas a la expresión de ZAP-70 teniendo en cuenta como control su expresión en las células B normales de controles sanos (Rassenti LZ, 2004) o en los linfocitos T y células NK del propio paciente (Crespo M, 2003). Otros autores proponen el uso de la expresión de los resultados como un ratio

entre la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la expresión de ZAP-70 en los linfocitos T y la MFI de la expresión de ZAP-70 en las células B leucémicas de los pacientes con LLC-B (Letestu R, 2006).

Se han propuesto otras alternativas como cuantificar el ratio entre la MFI de la expresión de ZAP-70 en células B leucémicas y células B residuales no transformadas (Shankey TV, 2006) o el ratio de la MFI de la expresión de ZAP-70 en células B leucémicas del paciente y en células B normales de controles sanos (Gachard N, 2008), aportando esta última una buena correlación de los resultados con el estado mutacional de la IgVH.

En nuestro trabajo la expresión de ZAP-70 se determinó por citometría de flujo siguiendo la metodología propuesta por Crespo y cols (Crespo M, 2003), siendo ésta una de las metodologías más utilizadas. Debido a que nuestra finalidad no era la de validar una u otra forma de metodología de expresión de los resultados de ZAP-70, pero consideramos que era imprescindible la mayor exactitud posible en la categorización de los pacientes para evitar errores en la comparación de los parámetros inmunológicos estudiados, procedimos a realizar de forma complementaria la categorización de los pacientes según la propuesta de Gachard y cols (Gachard N, 2008), confirmando así los resultados obtenidos en la primera metodología. Como consecuencia de esto, aquellos pacientes que mostraron resultados dispares en cuanto la expresión de ZAP-70 al comparar ambas metodologías fueron excluidos de este trabajo, considerando este hecho como un criterio de exclusión en el estudio de los pacientes. Señalar que tan sólo un paciente mostró resultados diferentes al comparar ambas metodologías lo que indicaría la fiabilidad de las metodologías empleadas en el estudio de la expresión de ZAP-70.

Estudio fenotípico de células dendríticas (DCs) y monocitos.

Las DCs desempeñan un papel esencial en la activación de linfocitos T que a su vez desempeñan un importante papel regulador o efector, siendo esta una de las funciones primordiales de la respuesta inmune. Por tanto alteraciones en las DCs podrían repercutir en el adecuado funcionamiento del sistema inmune. De esta manera se ha descrito que alteraciones en las DCs pueden constituir uno de los mecanismos que permiten escapar a los tumores del control del sistema inmune. De hecho se ha detectado la presencia de DCs alteradas tanto en número como en función en pacientes

con tumores sólidos (Enk A, 1997; Almand B, 2000; Mohty M, 2001) y con diversas patologías hematológicas tanto tumorales como no tumorales (Mohty M, 2001; Bourguin-Plonquet A, 2002; Ratta M, 2002). Estas alteraciones pueden deberse a factores solubles producidos por las células tumorales que impedirían la correcta maduración de las DCs y consecuentemente su correcta función antineoplásica (Menetrier-Caux C, 1998; Kiertscher SM, 2000).

En pacientes con LLC-B Orsini y cols. (Orsini E, 2003) demostraron una alteración de las DCs, observándose una población celular inmadura que podría provocar una incapacidad de estimular correctamente a los linfocitos T, y por lo tanto un déficit a la hora de enfrentarse a los agentes infecciosos.

En nuestro trabajo hemos demostrado una profunda alteración en las DCs circulantes en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los ZAP-70- y a los controles sanos, con disminución significativa de las DCs mieloides tipo I (mDCs 1) y de las DCs plasmacitoides (pDCs) asociadas a un incremento significativo de las DCs mieloides tipo II (mDCs 2). De esta manera los pacientes ZAP-70+ presentan una importante alteración de este compartimento celular que puede estar asociado a su peor pronóstico.

En el caso de las DCs mieloides esta idea estaría soportada por el hecho de que se han encontrado alteraciones en la madurez de las DCs mieloides que provocan su incapacidad de activar linfocitos T además de inducir la expresión de FOXP-3 y la producción *in vitro* de IL-10 por parte de células T reguladoras (Jonuleit H, 2000; Cong Y, 2005) pudiendo provocar la represión del sistema inmune y por tanto tener una peor respuesta ante un tumor.

El desbalance observado en las células dendríticas mieloides podría deberse al hecho de que las DCs mieloides tipo I (mDC 1) difieren de las tipo II (mDC 2) en su grado de maduración. Ha sido descrito que las mDCs 1 son un subtipo de células dendríticas mieloides maduras mientras que las mDCs 2 son inmaduras (Dzionek A, 2000). En nuestro caso constatamos un predominio en sangre periférica de los pacientes con LLC-B ZAP-70+ de aquellas DCs que producen un mayor incremento de células T reguladoras, que podrían estar a su vez involucradas en el mantenimiento de mecanismos que favorezcan a la masa tumoral. Por otra parte, esto se complementaría con el descenso significativo en sangre periférica de las pDCs observado en los pacientes ZAP-70+ que podría indicar un mayor reclutamiento de estas células en los nódulos linfáticos donde a su vez estarían promoviendo la inducción de células T

reguladoras. Esto estaría basado en el hecho demostrado de cómo las pDCs son capaces de inducir linfocitos T CD4+CD25+FOXP-3+ con una potente capacidad supresora del sistema inmune (Mosseman EA, 2004).

Así nuestros resultados están de acuerdo con esta idea, ya que demostramos como en los pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos se observa un aumento tanto del número absoluto como del porcentaje de linfocitos CD4+FOXP-3+, siendo este aumento significativo en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ donde se alcanzan incrementos 3 veces superiores a lo observado en los controles sanos. Estos resultados son muy similares a los observados por otros autores (Beyer M, 2005; Giannopoulos K, 2008) los cuales reportan un incremento de los linfocitos T reguladores que expresan FOXP-3+ en los pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos y particularmente incrementados en pacientes de estadios más avanzados (B y C de Binet) sin tratar. Por tanto, las alteraciones observadas en el número absoluto en sangre periférica de los diferentes tipos de DCs en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ estarían muy relacionadas con aquellas alteraciones observadas tanto en número absoluto como porcentaje de linfocitos CD4+FOXP-3+ en los mismos pacientes. De esta manera podrían constituir en su conjunto una de las razones por las cuales los pacientes con LLC-B ZAP70+ presentan un peor pronóstico.

Los pacientes con LLC-B tienen en las infecciones producidas por diversos agentes infecciosos una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (Molica S, 1994; Rozman C, 1995). Los monocitos constituyen una población celular muy importante en la protección frente a los agentes infecciosos, además de estar también involucrados en la defensa antitumoral. Alteraciones en esta población celular junto con la disfunción de otros compartimentos del sistema inmune en los pacientes con LLC-B, podría contribuir en gran parte a una mayor susceptibilidad de estos pacientes frente a diversas infecciones y a una peor respuesta del sistema inmune frente a las células tumorales, lo cual repercutiría en un peor pronóstico en cuanto a la evolución de la enfermedad o la respuesta a tratamientos.

Al estudiar el compartimento monocitario de los pacientes con LLC-B hemos observado que estos pacientes presentan una disminución significativa del número absoluto de monocitos circulantes en sangre periférica respecto a los controles sanos, siendo esta alteración mucho más marcada y significativa en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los ZAP-70- y los controles sanos.

Junto a esta disminución del número absoluto de los monocitos en los pacientes con LLC-B hemos observado una redistribución de algunas de sus subpoblaciones. Así en los pacientes con LLC-B ZAP-70+, observamos una disminución significativa tanto del número absoluto como del porcentaje de la subpoblación de monocitos CD14^{hi}CD16⁻, mientras que por otra parte se está produciendo un incremento significativo de esos valores en la subpoblación monocitaria CD14⁻CD16^{hi} y CD14^{low}CD16^{hi} respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos. Sin embargo en los pacientes ZAP-70+ las subpoblaciones de monocitos CD14^{hi}CD16^{hi} y CD14^{hi}CD16^{low} presentan disminuidos significativamente el número absoluto y el porcentaje respecto a los controles sanos, pero sus valores son similares a los presentados en los pacientes ZAP-70-. Por tanto, nos encontramos que los pacientes con LLC-B respecto a los controles presentan una disminución el número absoluto de monocitos CD14⁺CD16⁺. Esta subpoblación de monocitos CD14⁺CD16⁺ ha sido descrita como una subpoblación con una capacidad antitumoral mayor que los monocitos CD14^{hi}CD16⁻ (Szaflarsk A, 2004) y además constituyen una subpoblación celular incrementada en diferentes patologías inflamatorias sistémicas e incluso en pacientes con cáncer (Shale MN, 1995). La disminución de monocitos CD14⁺CD16⁺ en los pacientes con LLC-B podría estar relacionada con una menor respuesta frente a las células leucémicas y frente a los patógenos, y por tanto podría explicar en cierta medida el peor pronóstico en los pacientes ZAP-70+.

Además en ambas subpoblaciones monocitarias (CD14^{hi}CD16^{hi} y CD14^{hi}CD16^{low}) se observa una disminución importante y significativa en los pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos, del número absoluto de monocitos que expresan CX3CR1⁺, cuando son precisamente los monocitos CD14⁺CD16⁺ los que expresan con mayor intensidad la molécula CX3CR1. Señalar que esta molécula es la responsable de la migración de los monocitos circulantes a los tejidos residentes y su pérdida redirige a los monocitos a tejidos inflamados. A su vez, en ambas poblaciones monocitarias los pacientes con LLC-B presentan respecto a los controles sanos una disminución

significativa de los monocitos CD86+CD80- y CD86+CD80+. Por tanto las subpoblaciones monocitarias CD14+^{hi}CD16+^{hi} y CD14+^{hi}CD16+^{low} en los pacientes con LLC-B estarían disminuidas en sangre y además podrían presentar alteraciones en su capacidad migratoria y de coestimulación de otros elementos del sistema inmune, por lo que podría estar comprometida la respuesta frente a agentes infecciosos o las propias células tumorales.

Por otra parte, hay que señalar que dentro de la subpoblación CD14+CD16+ los pacientes con LLC-B ZAP-70+ muestran un incremento en el número absoluto y en el porcentaje de monocitos CD14+^{low}CD16+^{hi}, esto podría estar relacionado con las alteraciones descritas en nuestro trabajo en las células dendríticas en estos pacientes ya que la subpoblación monocitaria CD14+^{low}CD16+^{hi} presenta gran similitud con células dendríticas circulantes y que además desempeñan un papel inmunomodulador, debido a su capacidad de migración y a una importante capacidad de producción de citocinas pro-inflamatorias (Grage-Griebenow E, 2001; Belge KU, 2002; Horlet A, 2002; Ancuta P, 2003; Mizuno K, 2005).

La relación entre las alteraciones observadas en las DCs y las alteraciones en el compartimento monocitario, podría estar sustentado a su vez por los resultados observados en cuanto a la subpoblación monocitaria CD14-CD16+^{hi}, la cual es una subpoblación monocitaria con características específicas denominada “monocitos circulantes prodendríticas” tanto por sus propiedades fenotípicas como funcionales, y que se definen fenotípicamente por la expresión del marcador M-DC8 (Schäkel K, 1998). Dicha subpoblación de monocitos se encuentra significativamente incrementada tanto en número absoluto como en porcentaje en los pacientes con LLC-B ZAP-70+, que a su vez son aquellos en los que hemos encontrado mayores alteraciones en los números absolutos de DCs de sangre periférica.

Estudio fenotípico de linfocitos B.

Uno de los aspectos más característicos de la LLC-B es la de linfocitosis que presentan los pacientes. Así el número de linfocitos circulantes leucémicos es un indicador del crecimiento de la masa tumoral y puede tener cierto valor pronóstico en los pacientes con LLC-B (Rai KR, 1990). En este sentido, nuestro trabajo ha demostrado que la linfocitosis característica de estos pacientes respecto a los controles sanos es más acusada en los pacientes ZAP-70+. Así los pacientes ZAP-70+ presentaron un incremento significativo del 31% en el número absoluto de linfocitos totales y hasta un 57% en el número absoluto de linfocitos B respecto a los pacientes ZAP-70-. Esto indicaría por si mismo un factor diferencial en el comportamiento de la enfermedad en los pacientes dependiendo de la expresión de ZAP-70 por parte de las células leucémicas.

Dentro de esta linfocitosis diferencial de células B entre los pacientes con LLC-B, destacamos el incremento importante y significativo de linfocitos B leucémicos CD5+ en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los ZAP-70- llegando casi a doblar el número absoluto y alcanzando unos valores de porcentaje hasta del 97% de las células B. Esto podría indicar una mayor expansión y agresividad del tumor en los pacientes ZAP-70+ ya que estos datos representan un aumento de las células B leucémicas y una retracción muy importante de las células B CD5- y por consiguiente de las células B normales residuales en estos pacientes. Además este incremento de la masa tumoral en los pacientes ZAP-70+ se acompaña de disminuciones significativas respecto a los ZAP-70- tanto en los números absolutos como en los porcentajes de células B CD80+ y CD86+. Por tanto en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ tendríamos no sólo un incremento de células tumorales sino que además este incremento se debería en parte a células cuya reducida expresión de moléculas coestimuladoras puede comprometer su función como células presentadoras de antígenos.

Otro de los datos de nuestro trabajo más destacable, en cuanto al estudio inmunofenotípico de células B en pacientes con LLC-B, es el incremento tanto en el número absoluto como en el porcentaje de las células B que expresan CD38 en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70-. CD38 se ha mostrado

cómo un buen factor pronóstico de la enfermedad por su buena correlación con el estado mutacional de la IgVH (Hamblin TJ, 1999), por tanto el hecho de que los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presenten valores significativamente elevados de células B CD38+ respecto a los pacientes ZAP-70- sirve para apoyar el valor pronóstico tanto de ZAP-70 como de CD38. Por otra parte CD38 y ZAP-70 no sólo constituyen marcadores de la LLC-B sino que también desempeñan papeles como moléculas relacionadas con la transducción de señales ligadas a la proliferación y/o mantenimiento de la masa tumoral (Chen L, 2002; Deaglio S, 2003).

Nuestro trabajo demuestra un patrón diferente de activación de las células B leucémicas en los pacientes según la expresión de ZAP-70. Así los pacientes ZAP-70+ presentan un incremento significativo del número absoluto y del porcentaje de células B que expresan CD38 y CD40, mientras que por otra parte presentan una disminución significativa del porcentaje de células B CD21+ respecto de los pacientes ZAP-70-.

Señalar que generalmente la expresión de CD21 se encuentra elevada en los pacientes con LLC-B respecto a los controles. La diferente expresión de CD21 puede estar relacionada con el tipo de células a partir del cual se origina la célula leucémica. Las células B de la zona del manto se caracterizan por no presentar hipermutación somática y reciben señales de coestimulación de componentes activados del complemento a través del receptor CD21. Por tanto estas células expresan mayores niveles de CD21 que las células foliculares. Según esta hipótesis de asociación las células leucémicas de los pacientes con LLC-B ZAP-70+ sin signos de hipermutación somática se originan a partir de células B que se han diferenciado en los folículos linfoides y expresarían menos CD21. Sin embargo las células B de los pacientes ZAP-70+ se originarían a partir de otro linaje celular con características similares a las células B del manto expresando más CD21. Nuestros resultados de expresión de CD21 son contrarios a esta idea por lo que no podemos establecer una relación entre la expresión de ZAP-70 por parte de las células B y su origen folicular o del manto.

Por otra parte, la expresión de CD40 suele estar disminuida en los pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos, sin embargo ha sido demostrado por otros autores un aumento de su expresión en pacientes con LLC-B CD38+ indicando un diferente patrón de activación en las células B leucémicas (Damle RN, 2002).

Los resultados de CD38, CD40 y CD21 estarían estrechamente ligados entre sí e indicarían un estado diferente de activación en los pacientes ZAP-70+ respecto a los pacientes con LLC-B ZAP70- los cuales presentan valores de porcentajes similares a los controles en las células B CD21+, y disminución de los porcentajes de las células B CD38+ y CD40+. Este patrón diferencial de la activación a su vez estaría relacionado con la mayor agresividad del tumor en los pacientes con LLC-B ZAP-70+.

La menor expresión de CD21 por parte de las células B leucémicas en los pacientes ZAP-70+ podría explicarse por la compensación que la propia expresión de ZAP-70 conlleva en la transducción de la señal en estas células, ya que se ha demostrado una mayor señalización a través del BCR en las células B leucémicas que expresan ZAP-70 (Chen L, 2002 y 2005). A su vez se ha demostrado una relación entre la señalización a través de CD38 y la presencia de ZAP-70 en las células B leucémicas dando lugar a una gran capacidad de migración por parte de estas células (Deaglio S, 2007) y que vendría a apoyar otros trabajos previos donde se demuestra esa mayor capacidad migratoria de las células B leucémicas ZAP-70+ a nódulos linfáticos donde se crea un entono de reclutamiento masivo de linfocitos T CD4+CD40L+ que contribuyen a la proliferación y supervivencia de las células B tumorales (Richardson SJ, 2006).

El modelo de leucemia más progresiva propuesto por Richardson donde las células B leucémicas tienen gran capacidad de migración y crean centros de proliferación y supervivencia de células B tumorales relacionado con la expresión de ZAP-70 concuerda con nuestros datos, puesto que en nuestro trabajo observamos que los pacientes con LLC-B presentan aumentados el número absoluto y el porcentaje de linfocitos T CD4+CD40L+, si bien los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presentan valores muy similares a los pacientes ZAP-70-.

Por tanto en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ nos encontramos con una población aumentada de células tumorales CD38+ y CD40+ con gran capacidad migratoria y de reclutamiento de linfocitos T CD4+CD40L+ (a su vez incrementados en los pacientes) que al interactuar con las células leucémicas inducirían en éstas la producción de survivina (Granziero L, 2001) y activación de NF-κB (Furman RR, 2000) entre otros factores, que promueven en las células B un aumento de la resistencia a la apoptosis, y que por tanto estarían contribuyendo a un peor pronóstico de estos pacientes.

Estudio fenotípico de linfocitos T, células NK y TK.

En cuanto a las alteraciones existentes en los linfocitos T y sus diversas poblaciones, los resultados de nuestro trabajo demuestran que dentro del incremento del número absoluto de linfocitos T CD3+ en los pacientes con LLC-B respecto a los controles sanos, ya demostrado por diversos autores (Plastukas CD, 1982; Vullier F, 1988; Bartik MM, 1998), encontramos a su vez una clara diferencia entre los pacientes según la expresión de ZAP-70, siendo los pacientes ZAP-70+ los que presentan incrementos significativos mayores con respecto de los pacientes ZAP-70- y los controles sanos. Este incremento del número de linfocitos T CD3+ en los pacientes con LLC-B se debe al aumento del número de linfocitos T CD4+, CD8+ y células TK CD3+CD56+, produciéndose de nuevo los mayores incrementos en los pacientes con LLC-B ZAP70+ si bien este incremento sólo es significativo respecto a los pacientes con LLC-B ZAP-70- en el número de linfocitos T CD8+ y células TK CD3+CD56+. Señalar que dicho incremento en los linfocitos T CD4+ esta compensado con el incremento de T CD8+ en los dos grupos de pacientes con LLC-B, presentando porcentajes similares de estas poblaciones y sin verse alterado el ratio CD4/CD8. Estos resultados en las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, entran en controversia con otros trabajos donde se demuestra una expansión de los linfocitos T CD8+ con respecto a los CD4+ y por tanto modificaciones del ratio en estos pacientes con respecto a los controles (Catovsky D, 1974; Kay NE, 1979; Matutes E, 1981; Plastukas CD, 1982; Vullier F, 1988). Nuestros resultados también difieren en parte con otros similares donde también se separaron grupos de pacientes con LLC-B, así Reyes y cols. (Reyes E, 1997) demostró como pacientes con morfología típica presentaban porcentajes diferentes de linfocitos T CD4+ y CD8+ así como modificaciones en su ratio al compararlo con pacientes con LLC-B atípica, mostrando expansión de T CD8+ en estos últimos pacientes.

En nuestro caso la “no expansión” observada de los linfocitos T CD8+ en los pacientes con LLC-B y en concreto en los pacientes ZAP-70+ respecto a los ZAP-70- puede deberse a un enmascaramiento del porcentaje de los linfocitos denominados T CD8+ ya que en ese porcentaje se están excluyendo las células TK CD3+CD56+ que expresan CD8+ y cuyo porcentaje se encuentra incrementado significativamente en los pacientes ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos. En este caso, nuestros

resultados tendrían mayor concordancia con los obtenidos por Reyes y cols., entendiendo como similares aquellos pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70 y la morfología linfocitaria, encontrando similares a los pacientes ZAP-70⁻ y pacientes con morfología típica, y los pacientes ZAP-70⁺ y pacientes con morfología atípica. La validez como valor pronóstico de la morfología linfocitaria ha sido muy estudiado (Dubner HN, 1978; Peterson LC, 1980; Ghani AM, 1986) y es considerado por algunos autores como factor pronóstico sobre todo en estadios tempranos (Matutes E, 1999). A esto hay que añadir la importancia dada por diversos autores de considerar la LLC-B como dos tipos de enfermedad con diverso riesgo clínico, descritos por la integración de los diferentes factores pronóstico entre ellos ZAP-70 y la morfología linfocitaria (Shanafelt TD, 2004; Herisanu Y, 2005).

Siguiendo esta misma idea, al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Reyes y cols (Reyes E, 1997) observamos que los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ presentan alteraciones similares a los pacientes con LLC-B y morfología atípica ya que en ambos casos se observa una disminución significativa del porcentaje de células NK (CD3⁻CD56⁺) y un incremento significativo del porcentaje de células TK (CD3⁺CD56⁺) respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y morfología típica. En este sentido también otros autores han demostrado un incremento de células NK en pacientes con un número de linfocitos B circulantes bajo respecto a pacientes con ese parámetro elevado, pudiendo establecer cierta relación con nuestros resultados (Prieto A, 1997). A esto habría que añadir el hecho demostrado de que las células NK en los pacientes con LLC-B tienen alterada su capacidad citotóxica (Ziegler-Heitbrock HW, 1981, Álvarez-Mon M, 1987).

Por tanto los pacientes descritos con peor pronóstico (según la expresión de ZAP-70) tendrían disminución en números absolutos y relativos, y alteración de la función en una de las poblaciones celulares con mayor capacidad citotóxica, lo que podría contribuir al peor control de la masa tumoral y por tanto su peor progresión.

No obstante, dentro de la disminución en el porcentaje de células NK que constatamos en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ respecto a los ZAP-70⁻ y de ambos respecto de los controles sanos, destacamos como en los pacientes ZAP-70⁺ dentro de la disminución de células NK se observa una disminución significativamente importante de las células NK CD56^{hi}CD16^{low} respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y los controles

sanos, constituyendo estas células una subpoblación con baja capacidad citotóxica, pero que tiene la propiedad de producir abundantes citoquinas inmunoreguladoras como IFN- γ TNF- β , IL-10, IL-13 y GM-CSF (Cooper MA, 2001). Por otra parte los pacientes ZAP-70+ presentan respecto de los pacientes ZAP-70- un incremento significativo en el porcentaje de la subpoblación de células NK CD56+^{low}CD16+^{hi} la cual tiene una gran capacidad citotóxica (Cooper MA, 2001). Señalar que en ambas subpoblaciones nos encontramos con incrementos importantes y significativos de células activadas puesto que los porcentajes de células NK CD56+^{hi}CD16+^{low}CD57+ y CD69+ se encuentran incrementadas en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles, al igual que ocurre con las células NK CD56+^{low}CD16+^{hi}CD57+. Esto indicaría una dicotomía en la alteración del compartimento NK ya que nos muestra un incremento de células activadas dentro de una población celular disminuida de manera significativa con respecto a la masa tumoral, y por tanto puede estar presentando un conjunto de células que si reaccionan de alguna manera a las células tumorales y se activan intentando controlar el tumor. Esta idea se apoya en trabajos donde se ha logrado la expansión *in vitro* de células NK y células TK a partir de células de sangre periférica en pacientes con LLC-B y que indicarían la presencia en estos pacientes de poblaciones de células NK con capacidad de reconocer y eliminar células tumorales (Güven H, 2003).

Como indicamos con anterioridad, al igual que ocurría con los pacientes de morfología atípica respecto a los pacientes con morfología típica en los trabajos de Reyes y cols, los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presentan respecto a los pacientes ZAP-70- un incremento en el porcentaje de células TK (CD3+CD56+) y dentro de estas células aquellas que expresan CD8+CD57+ respecto a los controles también. Se ha demostrado que los linfocitos T que expresan CD56 son linfocitos efectores con una gran actividad citolítica (Pittet, 2000). Además las células TK constituyen una población de células autorreactivas que participan en funciones inmunológicas protectoras y reguladoras protegiendo los tejidos de la respuesta inflamatoria tipo Th1 (Wang EC, 1994; Godfrey DL, 2000; Wang B, 2001), y demostrándose por otra parte, como *in vivo*, la activación de estas células promueve la actividad Th2, favoreciendo el incremento sérico de IgE y de IL-4 (Bendelac A, 1996).

Por tanto el incremento de estas células en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ podrían indicar bien una población de células que reconocerían el tumor y se encuentran activas frente al mismo como compensación del descenso de células NK en estos pacientes, o bien una población que contribuye al mantenimiento del tumor mediante la producción de factores como puede ser la IL-4, IL-13 o IFN- γ .

Por otra parte al realizar un análisis más profundo del compartimento de linfocitos T observamos grandes alteraciones en esta población en los pacientes con LLC-B ZAP-70+. Al realizar la comparación de la expresión de CD28, CD62L, CD45RO y CD95 tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+ entre los pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70, observamos como los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se caracterizan por presentar grandes diferencias en el número absoluto y en el porcentaje de linfocitos T que expresan esas moléculas y que podrían estar por tanto asociadas al peor pronóstico de estos pacientes.

Señalar que CD28 es una molécula que desempeña un papel importante en la activación celular de los linfocitos T CD4+ y CD8+. Se ha descrito la existencia de alteraciones en la expresión de CD28 por linfocitos T en pacientes con LLC-B, demostrando una disminución significativa del número de linfocitos T circulantes que expresan CD28 respecto a controles sanos (Scrivener S, 2001). Otros autores han demostrado que los linfocitos T CD4+ y los CD8+ de pacientes con LLC-B presentan una alteración en cuanto a la cinética de expresión de CD28+ tras estimulación *in vitro*, con una mayor rapidez en su disminución de su expresión tras la estimulación (Frydecka I, 2004).

Los resultados de nuestro trabajo reiteran estos hallazgos ya que demostramos como los pacientes con LLC-B presentan porcentajes menores de linfocitos T CD4+CD28+ respecto de los controles siendo estas disminuciones más marcadas y significativas en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos. En el caso de los linfocitos T CD8+CD28+, en los pacientes ZAP-70+ respecto a los controles sanos también observamos una disminución significativa de esta población celular.

Este fenómeno aquí constatado podría reflejar una situación de alteración importante de la activación celular, ya que como vimos en los pacientes ZAP-70+ tanto algunas subpoblaciones de monocitos como los linfocitos B se caracterizaban precisamente por una disminución de células que expresaban moléculas coestimuladoras CD80 y CD86.

Esto unido a la menor cantidad de células T que expresan CD28+ podría constituir un mecanismo deficiente en la inmunidad celular de estos pacientes. Por otra parte, como veremos más adelante, en los pacientes con LLC-B y en concreto los pacientes ZAP-70+ se van a caracterizar por un incremento de células activadas y una disminución de células novatas, situación ésta que estaría reflejada en los datos obtenidos en cuanto a la expresión de CD28+ tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+ y que podría tener relación con los datos de Frydecka y cols (Frydecka I, 2004), donde tendríamos una población celular activada donde rápidamente se ha perdido la expresión de CD28 y por tanto la posibilidad de nueva estimulación.

Referente a la expresión de CD62L indicar que es una L-selectina que participa en la extravasación de las células a nódulos linfoides y está expresada en la mayoría de leucocitos perdiéndose tras la activación celular. Por lo anteriormente mencionado en relación con CD28+ y el incremento de células activas que presentan los pacientes de LLC-B y dentro de estos los ZAP-70+ respecto a los controles, cabría esperar que existiera una disminución también de linfocitos CD4+ y CD8+ que expresaran CD62L. En nuestro trabajo observamos no sólo que esto no ocurre sino que contrariamente a lo esperado los pacientes con LLC-B tienen incrementado el número absoluto y el porcentaje de los linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan CD62L, siendo los pacientes con LLC-B ZAP-70+ los que presentan los valores significativamente más incrementados respecto a los controles sanos observándose además aumentos significativos en el porcentaje de linfocitos CD4+CD62L+ respecto a los pacientes ZAP-70-. Estos resultados podrían explicarse por la idea ya expuesta anteriormente, donde las células B leucémicas ZAP-70+ están migrando a los nódulos linfáticos creándose un entono de reclutamiento masivo de linfocitos T con especial énfasis en linfocitos T CD4+CD40L+ creándose centros de proliferación y supervivencia de las células B tumorales (Richardson SJ, 2006).

Como hemos indicado en varias ocasiones de este apartado, en nuestro trabajo se constata en los pacientes con LLC-B un incremento significativo de células T activadas respecto a los controles sanos. Varios trabajos han demostrado el incremento en la expresión de antígenos de activación (Totterman TH, 1989; García-Suárez, 1991) reflejando un posible estado de activación *in vivo* reactivo a la expansión de la masa tumoral, observando en algunos casos incrementos en la activación en estadio avanzado de la enfermedad y/o pacientes con mayor masa tumoral (García-Suárez, 1991; Prieto A, 1997).

Al estudiar el grado de activación de los linfocitos T según la definición de memoria inmunológica clásica por la expresión de CD45RA y CD45RO en linfocitos T CD4+ observamos un incremento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD4+ memoria (CD45RO+CD45RA-) además de una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T CD4+ novatos (CD45RO-CD45RA+) en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto de los pacientes ZAP-70- y los controles sanos. Estos resultados son similares a los observados en la población linfocitaria T CD8+ donde los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presentan con respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos aumento y disminución significativa del porcentaje de linfocitos T CD8+ memoria (CD45RO+CD45RA-) y linfocitos T CD8+ novatos (CD45RO-CD45RA+) respectivamente.

Relativo a la expresión de CD45RO y CD45RA existen diversos trabajos que demuestran como los pacientes con LLC-B presentan disminuciones importantes de linfocitos T CD4+CD45RA+ respecto a los linfocitos T CD4+CD45RO+ (Briggs PG, 1990; Frolova EA, 1995). Nuestros resultados concuerdan con los de otros trabajos similares donde se relaciona la diferente distribución de linfocitos T según su activación en diferentes grupos de pacientes con LLC-B atendiendo a diversos parámetros clínicos. Así se ha demostrado como pacientes con un elevado número de linfocitos B circulantes presentan incrementos significativos del porcentaje de linfocitos T CD4+CD45RO+ (Prieto A, 1997), dato éste que podría asemejarse a la situación que observamos en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ los cuales como indicamos con anterioridad presentan también valores estadísticamente superiores de linfocitos circulantes T CD4+CD45RO+ con respecto a los pacientes ZAP70-.

Nuestros resultados también entrarían en concordancia con los obtenidos por Reyes y cols (Reyes E, 1997) donde los pacientes con morfología atípica presentan disminuciones significativas del porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ CD45RA+ e incrementos del porcentaje de CD4+ y CD8+ CD45RO+ con respecto a los pacientes con morfología típica, presentando un comportamiento similar a lo observado en nuestro estudio al separar a los pacientes con LLC-B en dos grupos según la expresión de ZAP-70. A su vez otros trabajos también apoyarían estos resultados al mostrar que existe una expansión más marcada de linfocitos T CD4+ y CD8+ CD45RO+ en enfermos con LLC-B en estadios avanzados (II-IV) de Rai (Peller S, 1991).

Estas similitudes con los resultados de otros trabajos son muy importantes ya que estadios avanzados de los sistemas de clasificación clásicos (Rai y Binet), junto con morfología atípica, mayor masa tumoral y ZAP-70+ unidos a otros factores pronóstico sirven para categorizar a los pacientes dentro de un grupo de mayor riesgo clínico y peor pronóstico de la enfermedad, por lo que hallazgos inmunológicos similares servirían de nexo entre estos criterios, además de poder constituir por si mismos factores que permitieran pronosticar el curso futuro de la enfermedad.

Un análisis más profundo del estado de activación de los linfocitos T tanto CD4+ como CD8+ se realizó de acuerdo con la expresión de los marcadores CD45RA y CD27. En este caso y en concordancia con lo anteriormente expuesto se observó como en los linfocitos T CD4+ los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presentaban respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos una expansión significativa de las subpoblaciones efectoras (memoria efectora no terminada y terminada) a costa de un retroceso de la subpoblación novata. Algo similar ocurre con los linfocitos T CD8+ los cuales sufren en los pacientes ZAP-70+ un aumento de la subpoblación memoria central a costa del descenso de subpoblación novata. En consecuencia señalar que a nivel general los pacientes con LLC-B se caracterizan respecto a los controles sanos por tener disminuciones significativas del porcentaje de la subpoblación novata de linfocitos T.

La importancia de esta redistribución asociada a la expresión de ZAP-70 se discutirá más adelante al comentar los resultados en cuanto a la capacidad de producción de citocinas por parte de los linfocitos T según la expresión de ZAP-70 en los pacientes con LLC-B.

Dentro de los linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresaban CD45RO, estudiamos la expresión de CD95, mostrando que los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presentan respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos incrementos significativos del número absoluto y del porcentaje de las células CD95+. Como discutiremos en el siguiente apartado esta alteración en la expresión de CD95 se relaciona con la susceptibilidad a la apoptosis espontánea tras 21 horas de cultivo. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores que observaron incrementos en la expresión de CD95 en linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con LLC-B respecto a controles sanos, donde además se demostró una mayor susceptibilidad de muerte por apoptosis a través de esta vía por los linfocitos T CD4+ (Tinhofer I, 1998; De Fanis U, 2002).

Sin embargo como veremos más adelante al discutir los resultados de apoptosis en linfocitos T, la mayor presencia de CD95 en linfocitos T CD4+ (al igual que en los linfocitos T CD8+) en los pacientes ZAP-70+ no se relaciona con una mayor mortalidad de estos linfocitos en estos pacientes al presentar niveles de apoptosis incluso inferiores a los observados en los controles a nivel basal.

Estudio de la apoptosis en linfocitos T.

La LLC-B se caracteriza por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B monoclonales y funcionalmente incompetentes debido a un aumento anormal de la resistencia al proceso de apoptosis, existiendo numerosos estudios relacionados con la apoptosis en las células B leucémicas. Sin embargo, la apoptosis ha sido un fenómeno poco estudiado en las células T en aquellos pacientes con LLC-B no tratados, si bien es cierto, que se ha estudiado el efecto sobre la supervivencia en linfocitos T ejercido por algunos fármacos utilizados en la terapia de esta enfermedad. No obstante, existen unos pocos trabajos donde se realizó un estudio de la apoptosis de linfocitos T en pacientes con LLC-B atendiendo a la expresión de moléculas relacionadas con los procesos de apoptosis. Algunos de estos trabajos como indicamos anteriormente demostraron la existencia de una mayor susceptibilidad de muerte por apoptosis a través de la vía CD95-CD95L por los linfocitos T CD4+ que explicaría en parte la alteración en los ratios CD4+/CD8+ observada por algunos autores en estos pacientes (Tinhofer I, 1998).

En otros casos se ha estudiado la expresión de proteínas relacionadas con el mecanismo de apoptosis como son la molécula anti-apoptótica *bcl-2* y la molécula pro-apoptótica *bax* (Scamardella F, 2006), mostrando en este trabajo tanto las células B como los linfocitos T un descenso importante del ratio *bax/bcl-2* que indicaría una mayor resistencia de estas células a sufrir apoptosis.

En nuestro trabajo detectamos una importante alteración en cuanto a la apoptosis de los linfocitos T tanto CD4+ como CD8+ en los pacientes con LLC-B respecto a los controles siendo estas alteraciones mucho más marcadas en los pacientes con LLC-B ZAP-70+.

Uno de los resultados más destacables es la disminución significativa de la apoptosis a nivel basal observada en los linfocitos T CD4+ y CD8+ en los pacientes con LLC-B, siendo mucho más importante este descenso en el caso de los pacientes ZAP-70+, esto entraría en concordancia con el trabajo de Scamardella y cols (Scamardella F, 2006) donde se demuestra que los pacientes con LLC-B presentan unos linfocitos T con cierta resistencia a la apoptosis. En nuestro caso, estos resultados podrían explicar en parte el incremento existente de linfocitos T CD4+ y CD8+ observado en los pacientes con LLC-B respecto a los controles ya que reflejarían al igual que ocurre con las células B una acumulación de estas poblaciones celulares por una mayor resistencia a eliminarse por apoptosis. Sin embargo, esta situación tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+ se revierte tras 21h de cultivo, condición ésta donde se observa que la apoptosis espontánea de los linfocitos T CD4+ y CD8+ se incrementa en los pacientes con LLC-B respecto de los controles sanos, siendo de nuevo los pacientes ZAP-70+ donde estos incrementos son más marcados y significativos respecto de los pacientes ZAP-70- y los controles sanos. Este hecho podría explicarse debido al alto grado de activación que observamos en los linfocitos T en los pacientes ZAP-70+, donde como mencionamos anteriormente existe un aumento de células activadas y efectoras, y sobre todo debido a que nuestro trabajo demuestra que existe una correlación significativa directa entre la apoptosis en linfocitos T CD4+ y CD8+ y la coexpresión de CD45RO y CD95. Esto entraría en concordancia con el trabajo de Tinhofer y cols (Tinhofer I, 1998) donde se constata la mayor susceptibilidad de sufrir apoptosis por parte de linfocitos T a través de CD95. Este incremento en la apoptosis espontánea *in vitro* observada en los linfocitos T de los pacientes con LLC-B ZAP-70+ podría explicarse también por un mayor requerimiento de factores de crecimiento y supervivencia así como de contactos

intercelulares más estrictos que los necesarios en linfocitos T de pacientes ZAP-70⁻ y controles sanos.

Por tanto, en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ tendríamos una cierta resistencia a la apoptosis de los linfocitos T *in vivo* que es contrarestanda por un incremento de la misma *in vitro*, situación esta muy similar a lo que ocurre con los linfocitos B en los pacientes con LLC-B. Esta hipótesis sería validada con nuestros resultados sobre el estudio de apoptosis ya que prácticamente en todas las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (novatas, memoria efectora terminada y no terminada, y memoria central) se observa el mismo patrón de apoptosis; donde los pacientes con LLC-B y en concreto los ZAP-70⁺ (que a su vez presentaban una gran activación del compartimento T) son los que presentan respecto de los pacientes ZAP-70⁻ y controles sanos disminuciones significativas de la apoptosis a nivel basal, revertiendo los valores tras cultivo donde presentan los valores más elevados de apoptosis.

Otro de los resultados más llamativo del estudio de la apoptosis en nuestro trabajo, es el hecho constatado de la diferente magnitud de la apoptosis sufrida por los linfocitos T que expresan CD62L por todas las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T estudiadas y en todas las condiciones experimentales con respecto a las células que no expresan CD62L. Así, observamos que los linfocitos T CD62L⁺ tanto en pacientes como controles sanos presentan porcentajes de apoptosis mucho menores que aquellos linfocitos que no expresan CD62L. Los valores más bajos de apoptosis detectados en los linfocitos T que expresan CD62L podrían explicarse debido al fenómeno demostrado de la pérdida en la expresión de determinados marcadores linfocitarios en el proceso de apoptosis (Díaz D, 2004) y que podría en este caso estar reflejado en nuestros resultados. Sin embargo sería necesario un estudio más profundo para poder establecer la causa real de la diferente magnitud en los valores de apoptosis detectada en linfocitos T según la expresión de CD62L de nuestro trabajo.

Estudio del porcentaje de linfocitos T productores de citocinas.

El estudio del porcentaje de linfocitos productores de citocinas combinado con el estudio fenotípico del estado de diferenciación/activación de los linfocitos T nos ha permitido profundizar en las alteraciones del compartimento T de los pacientes con LLC-B. Como indicamos con anterioridad en lo referente a la activación de linfocitos T, en nuestro trabajo observamos que en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ se produce respecto a los pacientes ZAP-70- y a los controles sanos una disminución significativa de la subpoblación novata tanto en CD4+ como en CD8+ producida por un incremento significativo de las subpoblaciones efectoras (memoria efectora no terminada y terminada) en el caso de los linfocitos T CD4+, y de un incremento de la subpoblación memoria central en el caso de los linfocitos T CD8+.

Esta redistribución representa una profunda alteración en la activación de los linfocitos T en los pacientes con LLC-B y en concreto en los pacientes ZAP-70+. En el caso de los linfocitos T CD4+ nos encontramos con el hecho de que los pacientes ZAP-70+ presentan una disminución de aquellos linfocitos que no han tenido ninguna experiencia antigénica y presentan gran capacidad de migrar a los órganos linfoides secundarios y por tanto de activarse, mientras que tienen incrementadas las subpoblaciones efectoras y con la capacidad de migrar a órganos linfoides secundarios comprometida pero gran capacidad de producción de citocinas, que indicaría una posible activación mediada por las células tumorales. A esto hay que añadir el hecho de que los pacientes ZAP-70+ se caracterizan por presentar respecto a los pacientes ZAP-70- porcentajes significativamente más bajos de linfocitos productores de citocinas con un patrón de respuesta Th-1 (IL-2, TNF- α e IFN- γ) y porcentajes significativamente más altos de linfocitos productores de citocinas con un patrón de respuesta Th-2 o inmunomoduladoras (IL-4 e IL-10).

Estos resultados son soportados por los resultados de Podhorecka y cols (Podhorecka M, 2002) que describió como pacientes con LLC-B presentan un tipo de producción de citocinas Th1 pero cambiante a Th2 cuando se produce la progresión de la enfermedad.

Un análisis más profundo del estudio del porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de citocinas, nos muestra que es precisamente en los pacientes ZAP-70+ la población novata la que presenta porcentajes significativamente mayores de células productoras de IL-4 e IL-10, por tanto, esto unido a que estas células tienen gran capacidad de

migración a órganos linfoides podría estar indicando un reclutamiento en estos lugares de linfocitos T CD4+ (reflejado por su disminución porcentual respecto a otras poblaciones celulares) y su posterior activación a células productoras de citocinas que podrían intervenir en el mantenimiento y proliferación de las células tumorales. Estos resultados estarían relacionados con el incremento en los pacientes ZAP-70+ del porcentaje de los linfocitos T efectores (memoria efectora no terminada y terminada) que además presentan los valores de porcentaje más elevados de células productoras de IL-4 en el caso de la memoria efectora no terminada e IL-10 en el caso de la memoria efectora terminada, siendo IL-4 e IL-10 citocinas con probada capacidad de incrementar y/o mantener la supervivencia de los linfocitos B leucémicos. A su vez nos encontramos con una situación donde el incremento significativo de subpoblaciones de linfocitos T efectores en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los ZAP-70- y a los controles sanos se corresponde con los porcentajes significativamente más bajos de células productoras de las citocinas Th-1 (IL-2, TNF- α e IFN- γ) respecto a los pacientes con LLC-B ZAP-70-. Por tanto estos resultados reflejarían una respuesta antitumoral probablemente insuficiente en los pacientes ZAP-70+ que se vería reflejado con su peor pronóstico, ya que ambos grupos de pacientes (tanto pacientes ZAP-70- como ZAP-70+) presentan porcentajes de células productoras para estas citocinas mayores que los controles sanos.

Siguiendo la línea de explicación de los linfocitos T CD4+, los resultados con los linfocitos T CD8+ estarían también mostrando una respuesta antitumoral menos eficaz y/o insuficiente, ya que serían estos linfocitos T CD8+, en concreto las subpoblaciones efectoras, las que pueden desempeñar un papel importante frente al tumor. Como se indicó con anterioridad, una de las subpoblaciones con mayor capacidad citotóxica y de producción de citocinas como es la subpoblación memoria efectora no terminada, en los pacientes con LLC-B presentan porcentajes disminuidos con respecto a los controles sanos, lo cual ya estaría indicando cierta deficiencia en la activación de estas células. Además en el caso de los pacientes ZAP-70+ nos encontramos con un incremento significativo de la subpoblación memoria central (con menor capacidad efectora) respecto a los pacientes ZAP-70- y a los controles sanos asociado a una disminución de la subpoblación novata pero también de la subpoblación memoria efectora no terminada.

Los pacientes con LLC-B a nivel general presentan respecto a los controles sanos incrementados los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ que producen citocinas Th-1 como son IFN- γ y TNF- α . Sin embargo cuando observamos lo que ocurre en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ nos encontramos que precisamente las células más activas (memoria efectora no terminada y terminada) presentan respecto de los pacientes ZAP-70⁻ valores inferiores de porcentaje de producción de estas citocinas, siendo significativamente inferiores precisamente en los porcentajes de células memoria efectora no terminada productoras de IFN- γ . Esto unido a la redistribución existente en los pacientes ZAP-70⁺ podría indicar un profundo defecto en uno de los mecanismos naturales efectores del sistema inmune.

Por otra parte la relación de las citocinas aquí mencionadas con el mantenimiento de la masa tumoral puede ser complejo. El papel de IL-4 es el más claro de todos ya que es una citocina que inhibe la apoptosis en las células leucémicas (Dancescu M, 1992; Panayiotidis P, 1993). Por su parte IL-10 presenta cierta controversia ya que hay autores que proponen que dicha citocina induce la muerte de las células leucémicas por apoptosis (Fluckier AC, 1994) y otros autores defienden la idea contraria (Kitabayashi A, 1995). No obstante existen trabajos donde altos niveles de IL-10 séricos son detectados en pacientes con estadios avanzados (III-IV) de Rai (Kamper EF, 1999). Por otra parte la IL-10 es una citocina con una amplia variedad de actividades cuando se une a su complejo receptor, pero clásicamente se la identifica con la actividad anti-inflamatoria como un producto de células Th2 capaz de inhibir la capacidad de producción de citocinas proinflamatorias y la presentación antigénica por macrófagos y células dendríticas (Mossman TR, 1991; Fiorentino DF, 1991).

Esto entraría en concordancia con nuestros datos ya que los pacientes con peor pronóstico (ZAP-70⁺) presentarían porcentajes mayores de células productoras de citocinas que estarían contribuyendo por un lado al mantenimiento de las células tumorales al inhibir su apoptosis, y por otro lado estarían inhibiendo la activación de las células reactivas frente al tumor impidiendo la presentación antigénica en nódulos linfáticos e inhibiendo la producción de citocinas que pudieran contribuir a la activación del sistema inmune frente al mismo. El que los pacientes ZAP-70⁺ presenten además un incremento de células dendríticas mieloides de tipo II estaría muy relacionado con el hecho de presentar mayores porcentajes de células productoras de IL-10 por parte de los linfocitos T CD4⁺, ya que la IL-10 inhibe la diferenciación de las células dendríticas.

En el caso de IL-2, TNF- α e IFN- γ nos encontramos con citocinas que regulan la activación y proliferación linfocitaria, gran capacidad pro-inflamatoria y papel antiviral y de regulación de los procesos inflamatorios respectivamente. Pero también se ha observado como IL-2 e IFN- γ pueden intervenir en el mantenimiento de las células tumorales al inhibir su apoptosis (Buschle M, 1993; Huang RW, 1993), mientras que TNF- α parece desarrollar un papel importante en la activación y proliferación de las células B (Cordingley FT, 1988).

En líneas generales nuestros resultados concuerdan con los de otros autores donde demuestran que los pacientes con LLC-B presentan respecto a los controles sanos elevados niveles de producción en linfocitos T de TNF- α (Bojarska-Junak A, 2002), IL-4 (Mainou-Fowler T, 2001), IL-2 (Podhorecka M, 2001) e IFN- γ (Reyes E, 1998). Pero no concuerdan con los resultados de IL-10 donde se observan disminuciones de linfocitos T productores de IL-10 en pacientes con LLC-B respecto a controles sanos (Mainou-Fowler T, 2001).

En nuestro trabajo podemos observar un patrón diferencial de producción de citocinas dependiendo de la expresión de ZAP-70 por parte de los pacientes con LLC-B. Así los pacientes con LLC-B ZAP-70⁻ presentan porcentajes aumentados de células productoras de citocinas que podrían contribuir en cierta medida al control de las células tumorales como son IL-2, IFN- γ y TNF- α debido a su papel como moléculas activadoras de la función y proliferación linfocitaria, pero que siguen aumentadas aunque en menor medida en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺, lo que podría indicar que en estos últimos existe una respuesta antitumoral insuficiente. Por tanto observamos como se va produciendo un desbalance en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ con un aumento del porcentaje de células productoras de citocinas claramente inmunosupresoras como son IL-4 e IL-10 (respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y a los controles sanos) y mantenimiento de valores elevados respecto a los controles sanos de porcentajes de células productoras de IL-2, IFN- γ y TNF- α .

Esto último puede diferir con el trabajo de Podhorecka y cols. (Podhorecka M, 2007) donde separa a los pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70 mostrando un incremento significativo de linfocitos T CD3+ productores de IL-2, IL-4, IFN- γ y TNF- α en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto de los pacientes ZAP-70- y los controles sanos, si bien en este trabajo no se separan los linfocitos T en CD4+ y CD8+, caso éste que podía producir variaciones en los resultados de los porcentajes de células productoras con respecto a los resultados globales.

En líneas generales nuestro trabajo demuestra la existencia de una profunda alteración del sistema inmune asociada a la expresión de ZAP-70 en los pacientes con LLC-B. Así los pacientes con LLC-B ZAP-70+ presentan una alteración importante en el sistema de coestimulación de linfocitos T al producirse redistribuciones en las poblaciones celulares implicadas en dicho proceso como son células dendríticas y monocitos, así como linfocitos B con capacidad coestimuladora (CD80+ y CD86+), presentando una disminución significativamente importante de las células capaces de estimular correctamente a los linfocitos T. Afectándose por tanto de manera grave la activación celular no sólo frente al tumor sino también a las infecciones, mostrando un defecto importante del sistema inmune en estos pacientes. Estos resultados a su vez se complementan con el hecho del incremento de diferentes poblaciones celulares entre las que destacan las células reguladoras que estarían contribuyendo de manera activa al mantenimiento de la masa tumoral mediante factores que estarían aumentando la resistencia a los procesos de apoptosis por parte de los linfocitos B tumorales. Todo esto estaría contribuyendo de manera muy activa en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ a presentar mayor progresión de la enfermedad y por tanto un peor pronóstico de la misma.

CONCLUSIONES

De nuestro estudio sobre los compartimentos de células del sistema inmunitario circulante de pacientes con LLC-B en fase estable de la enfermedad y estratificados por la expresión de ZAP-70 se obtienen las siguientes conclusiones presentadas de acuerdo con el orden de los objetivos planteados:

1. Los pacientes ZAP-70+ presentan una marcada redistribución significativa del compartimento de células dendríticas circulantes consistente en una expansión de las mieloides tipo II (mDC2) y una retracción de las mieloides tipo I (mDC1) y de las plasmacitoides (pDC).
2. Los pacientes ZAP-70+ muestran una redistribución significativa del compartimento monocitario circulante con un incremento de las subpoblaciones CD14⁻CD16⁺high y CD14⁺lowCD16⁺high y una disminución de las CD14⁺hiCD16⁻. La enfermedad se asocia a una monocitopenia con descenso de la expresión de moléculas implicadas en la coestimulación y en la migración celular de la mayoría de las subpoblaciones monocitarias.
3. Los pacientes con LLC-B y de forma significativamente mayor en los ZAP-70+ que en los ZAP-70⁻, presentan una profunda redistribución del compartimento de linfocitos T CD4⁺, con un incremento significativo de linfocitos T CD4⁺ efectores y un descenso significativo de linfocitos T novatos.
4. La enfermedad se asocia a una linfocitosis T CD8⁺, que presenta una significativa redistribución de sus subpoblaciones en los pacientes ZAP-70+ caracterizada con una disminución de los linfocitos T CD8⁺ novatos y memoria efectora asociada a un aumento de los linfocitos memoria central.
5. Los pacientes ZAP-70+ presentan de forma concomitante disminución de células NK (CD3⁻CD56⁺) y aumento de células TK (CD3⁺CD56⁺) con incremento de expresión de marcadores de activación celular.

6. Las poblaciones linfocitarias T CD4+ y CD8+ y sus diferentes subpoblaciones de los pacientes ZAP-70+ muestran significativamente una menor apoptosis espontánea en fresco y muy incrementada tras cultivo *in vitro*. Además existe una fuerte correlación entre el incremento de apoptosis espontánea detectada en linfocitos T CD4+ y CD8+ y los valores del número absoluto y del porcentaje de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ CD45RO+CD95+ en los pacientes con LLC-B ZAP-70+.
7. En los pacientes con LLC-B existe una redistribución del compartimento linfocitario T CD4+ con un predominio del patrón de producción de citocinas Th1 (alta producción de IL-2, IFN- γ y TNF- α). En los pacientes ZAP-70+ se observa un incremento de los linfocitos T CD4+ con un patrón de producción de citocinas Th2 (alta producción de IL-4 e IL-10) con respecto a los ZAP-70-, siendo las subpoblaciones de linfocitos navatos y efectores las preferentemente implicadas en estas alteraciones.
8. La expresión de ZAP-70+ se asocia a una mayor linfocitosis de células B CD5+, CD38+ y CD40+ y una disminución del porcentaje del porcentaje de células B CD19+ que expresan CD80+ y CD86+.

Tomadas en conjunto, nuestras conclusiones demuestran un compromiso de las poblaciones del sistema inmunitario circulantes que no han sufrido transformación tumoral en los pacientes con LLC-B, que es diferente en los pacientes ZAP-70- y ZAP-70+, y que pueden implicarse en la patogenia del distinto compartimento clínico de ambos grupos.

BIBLIOGRAFÍA

Altes A, Sierra J, Esteve J, Martín-Henao G, Marín P, Sureda A, et al. CD34+-enriched-CD19+-depleted autologous peripheral blood stem cell transplantation for chronic lymphoproliferative disorders: high purging efficiency but increased risk of severe infections. **Exp. Hematol.**2002;**30**:824-830.

Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. **Clin. Cancer Res.**2000;**6**:1755-1766.

Álvarez-Mon M., Casas J., Toribio M., O de Landázuri M, Durántez A. Lymphokine induction of NK like activity in T cells from B CLL. **Blood.**1986;**67**, 228-232.

Álvarez-Mon M, Casas J, Laguna R, Jordá J, Durántez A. Clinical signification of natural killer activity in B cell chronic lymphocytic leukemia. **Eur. J. Haematol.**1987;**38**:268-273.

Álvarez-Mon M, de la Hera A, Gaspar ML, Orfao A, Casas J, Jordá J, Durántez A. Proliferation of B cells from chronic lymphocytic leukemia is selectively promoted by B cell growth factor. **Acta Haematol.** 1989;**81**(2):91-7.

Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. **J. Exp. Med.**2003;**197**:1701-1707.

Bartik MM, Welker D, Kay NE. Impairments in immune cell function in B cell chronic lymphocytic leukemia. **Semin. Oncol.**1998;**25**:27-33.

Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. **J. Immunol.**2002;**168**:3536-3542.

Bendelac A, Hunziker RD, Lantz O. Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. **J. Exp. Med.**1996;**184**:1285-1293.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. **J. Clin. Pathol.**1989;**42**:567-584.

Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. **Blood.**2005;**106**:2018-2025.

Biagi E, Dotti G, Yvon E, Lee E, Pule M, Vigouroux S, et al. Molecular transfer of CD40 and OX40 ligands to leukemic human B cells induces expansion of autologous tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes. **Blood.**2005;**105**:2436-2442.

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. **Cancer.1981;48:198-206.**

Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, Charron D, d'Athis P, Vaugier G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. **Cancer.1977;40:855-864.**

Boggs DR, Sofferman SA, Wintrobe MM, Cartwright GE. Factors influencing the duration of survival of patients with chronic lymphocytic leukaemia. **Am. J. Med. 1966;40:243-254.**

Bojarska-Junak A, Rolinski J, Wasik-Szczepanek E, Kaluzny Z, Dmosynska A. Intracellular tumor necrosis factor production by T- and B-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Hematologica.2002;87:490-499.**

Bosch F, Ferrer A, López-Guillermo A, Gine E, Bellosillo B, Villamor N, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukemia. **Br. J. Haematol.2002;119:976-984.**

Bourguin-Plonquet A, Rouard H, Roudot-Thoraval F, Bellanger C, Marquet J, Delfau-Laure MH, et al. Severe decrease in peripheral blood dendritic cells in hairy cell leukaemia. **Br. J. Haematol.2002;116:595-597.**

Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 1968;97:77-89.**

Briggs PG, Kraft N, Atkins RC. T-cells and CD45RA expression in B-Chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia Res.1990;14:155-159.**

Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell derived factor-1. **Blood.2000;96:2655-2663.**

Buschle M, Campana D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV, Brenner MK. Interferon- γ inhibits apoptotic cell death in b cell chronic lymphocytic leukemia. **J. Exp. Med.1993;177:213-218.**

Busmanis I, Hussein S, Feleppa F, Rockman S, Begley CG. B cell chronic lymphocytic leukemia with florid reactive CD4+ T cell lymphocytosis in lymph nodes. **Leuk. Lymphoma.1993;9:153-156.**

Byrd JC, Peterson BL, Morrison VA, Park K, Jacobson R, Hoke E, et al. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia group B 9712 (CALGB9712). **Blood.2003;101:6-14.**

Caligaris-Cappio F. New insights into the biology of B-chronic lymphocytic leukemia. In American Society of Hematology Education Program Book. **Hematology.1999;249-254.**

Cantwell M, Hua T, Pappaas J, Kipps TJ. Acquired CD40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. **Nat. Med.1997;3:984-989.**

Carlsson M, Totterman TH, Matsson P, Nilsson K. Cell cycle progression of B-chronic lymphocytic leukemia cells induced to differentiate by TPA. **Blood.1988;71:415-421.**

Carreras J, Villamor N, Colomo L, Moreno C, Ramón y Cajal S, Crespo M, et al. Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms. **J. Pathol.2005;205:507-513.**

Catherwood MA, Matthews C, Niblock R, Dobbin E, Morris TC, Alexander H. ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Euro. J. Haematol.2006;76:294-298.**

Catovsky D, Miliiani E, Okos A, Galton D. Clinical significance of T cells in chronic lymphocytic leukaemia. **Lancet.1974;2:751-752.**

Celle PF, Mariana S, Riera L, Staccini A, Reato G, Foa R. Interleukin-8 induces the accumulation of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells by prolonging survival in an autocrine fashion. **Blood.1996;87:4382-4389.**

Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukaemia. **Blood.2002;100:4609-4614.**

Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukaemia. **Blood.2005;105:2036-2041.**

Cheson BD, Bennet JM, Rai KR, Grever MR, Kay NE, Schiffer CA, et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukaemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. **Ann. Intern. Med.1988;29:152-163.**

Cheson BD, Bennet JM, Grever MR, Kay NE, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukaemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. **Blood.1996;87:4990-4997.**

Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. **N. Engl. J. Med.2005;352:804-815.**

Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) and lymphocytic lymphoma. **Br. J. Haematol.1989;71:434-450.**

Cong Y, Knrad A, Iqbal N, Hatton RD, Weaver CT, Elson CO. Generation of antigen-specific, Foxp3 expressing CD4+ regulatory T cells by inhibition of APC proteasome function. **J. Immunology.**2005;174:2787-2795.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. **TRENDS in Immunology.**2001;22:633-640.

Cordingley FT, Bianchi A, Hoffbrand AV, Reittie JE, Heslop HE, Vyakarnam A, et al. Tumor necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. **Lancet.**1988;172:969-971.

Coxon A, Rieu P, Barkalow FJ, Askari S, Sharpe AH, Von Andrian UH, et al. A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. **Immunity.**1996;5:653-666.

Crespo M, Bosh F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukaemia. **N. Engl. J. Med.**2003;348:1764-1775.

Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. **Blood.**1999;94:1840-1847.

Damle RN, Ghiotto F, Valletto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. **Blood.**2002;99:4087-4093.

Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemia B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. **J. Exp. Med.**1992;176:1319-1326.

De Fanis U, Dalla-Mora L, Romano C, Sellito A, Tirelli A, Lucivero G. Altered constitutive and activation-induced expression of CD95 by B- and T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica.**2002;87:325-327.

De Toter D, Reato G, Mauro F, Cignetti A, Ferrini S, Guarini A, et al. IL4 production and increased CD30 expression by a unique CD8+ T-cell subset in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Br. J. Haematol.**;104:589-599.

Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Durig J, Morabito F, Duhrsen U, Malavasi F. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood.**2003;102:2146-2155.

Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. **Blood.**2007;110:4012-4021.

Delmer A, Ajchenbaum F, Tang R, Ramond S, Faussat AM, Marie JP, Zittoun R. Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. **Blood.1995;85:2870-2876.**

Díaz D, Prieto A, Barcenilla H, Monserrat J, Prieto P, Sánchez MA, et al. Loss of lineage antigens is a common feature of apoptotic lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.2004;76:609-615.**

Dianzani U, Omede P, Marmont F, di Franco D, Fusaro A, Bragardo M, et al. Expansion of T cells expressing low CD4 or CD8 levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia: Correlation with disease status and neoplastic phenotype. **Blood.1994;83:2198-2205.**

Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux P, Chastang C, Binet JL. B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. French Cooperative Group on CLL. **Blood.1991;78:1901-1914.**

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. **N. Engl. J. Med.2000;343:1910-1916.**

Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukaemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. **Blood.1997;89:2516-2522.**

Domingo A, González-Barca E, Castellsague X, Fernández-Sevilla A, Granena A, Crespo N, Ferran C. Expression of adhesion molecule in 113 patients with b-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship with clinico-pronostic features. **Leu. Res.1997;21:67-73.**

Dubner HN, Crowley JJ, Sciling RF. Prognostic value of nucleoli and cell size in chronic lymphocytic leukemia. **Am. J. Hematol.1978;4:337-341.**

Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. **Science.2002;298:850-854.**

Dzionic A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3 and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. **J. Immunology.2000;165:6037-6046.**

Enk A, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. **Int. J. Cancer.1997;73:309-316.**

Faderl S, Thomas DA, O'Brien S, García-Manero G, Kantarjian HM, Giles FJ, et al. Experience with alemtuzumab plus rituximab in patients with relapsed and refractory lymphoid malignancies. **Blood.2003;101:3413-3415.**

Falini B, Fizzotti M, Pireli S, Liso A, Pasqualucci L, Flenghi L. Bcl-6 protein expression in normal and neoplastic lymphoid tissues. **Ann. Oncol.**1997;**8 Suppl 2:101-104.**

Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, Kurzrock R. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukaemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. **Blood.**2001;**97:256-263.**

Fegan C, Robinson H, Thompson P, Whittaker JA, White D. Karyotypic evolution in CCL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced of progressive disease. **Leukemia** 1995;**9:2003-2008.**

Fernández LA, MacSween JM, Langley GR. Impaired T-cell responses in chronic lymphocytic leukemia: lack of suppressor cell effect. **Clin. Immunol. Immunopathol.**1981;**18:168-175.**

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M. IL10 acts on the production by Th1 cells. **Journal of Immunology.**1991;**146: 3444-5341.**

Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Abnormal blood monocytes in chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Res.**1988;**48:4812-4816.**

Fluckier AC, Durand I, Banchereau J. Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. **J. Exp. Med.**1994;**179:91-99.**

Foa R, Lauria F, Lusso P, Giubellino MC, Fierro MT, Ferrando ML, et al. Discrepancy between phenotypic and functional features of natural killer T-lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Br. J. Haematol.**1984;**58:509-516.**

Frankel AE, Fleming DR, Hall PD, Powell BL, Black JH, Leftwich C, Gartenhaus R. A phase II study of DT fusion protein denileukin diftitox in patients with fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. **Clin. Cancer Res.**2003;**9:3555-3561.**

Frolova EA, Richards SJ, Jones RA, Rawstron A, Master PS, Teasdale J, et al. Immunophenotypic and DNA genotypic analysis of T-cell and NK-cell subpopulations in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). **Leuk. Lymphoma.**1995;**16:307-318.**

Frydecka I, Kosmaczewska A, Bocko D, Ciszak L, Wolowiec D, Kuliczowski K, Kochanowska I. Alterations of the expression of T-cell-related costimulatory CD28 and downregulatory CD152 (CTLA-4) molecules in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Br. J. Cancer.**2004;**90:2042-2048.**

Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattee EJ. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. **J. Immunol.**2000;**164:2200-2206.**

Gachard N, Salviat A, Boutet C, Arnoulet C, Durrieu F, Lenormand B, et al. Multicenter study of ZAP-70 expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia using an optimized flow cytometry method. **Hematologica.**2008;**93:215-223.**

Gagro A, Dasic G, Sabioncello A, Rabatic S, Reckzeh B, Havemann K, et al. Phenotypic analysis of receptor-ligand pairs on B-cells in B-chronic lymphocytic leukemia. **Leuk. Lymphoma.**1997;**25:301-311.**

Galton D. The patogenesis of chronic lymphocytic leukemia. **Baillieres Clin. Haematol.**1966;**6:879-885.**

Gamberale R, Geffner JR, Trevani A, Chernavsky A, Scolnik M, Arrosagaray G, et al. Immune complexes inhibit apoptosis of chronic lymphocytic leukaemia B cells. **Br. J. Haematol.**1999;**107:870-876.**

García-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Merino JL, Álvarez-Mon M. Increased percentage of activated T lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) patients. **Br. J. Haematol.**1991;**79:657-668.**

Ghani AM, Krause JR. Investigation of cell size and nuclear cleffts as prognostic parameters in chronic lymphocytic leukemia.**Cancer.**1986;**58:2233-2238.**

Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Strola G, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. **Blood.**2003;**101.1262-1269.**

Ghigo D, Gaidano G, Treves S, Bussolino F, Pescarmona G, Caligaris-Cappio F, Bosia A. Na⁺/H⁺ antiporter has different propertis in human B lymphocytes according to CD5 expression and malignant phenotyphe. **Eur. J. Immunol.**1991;**21:583-588.**

Giannopoulos K, Schmitht M, Kowal M, Wlasiuk P, Bojarska-Junak A, Chen J, et al. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Oncol. Rep.**2008;**20:677-682.**

Godfrey DL, Hammond KJL, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. **Immunology Today.**2000;**21:573-583.**

Goolsby CL, Kuchino M, Finn WG, Peterson L. Expansions of clonal and oligoclonal T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia are primarily restricted to the CD3⁺CD8⁺ T cell population. **Cytometry.**2000;**42:188-195.**

Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. **J. Leukoc. Biol.**2001;**69:11-20.**

Granciero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, et al. Survivin is expressed on CD40 stiation and intefaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood.**2001;**97:2777-83.**

Guyen H, Gilljam M, Chambers BJ, Ljunggren HG, Christensson B, Kimby E, Dilber MS. Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL):a potencial source for cellular immunotherapy. **Leukemia.**2003;**17:1973-1980.**

Hainsworth JD, Litchy S, Barton JH, Houston GA, Hermann RC, Bradof JE, et al. Single-agent rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer research Network. **J. Clin. Oncol.**2003;**21**:1746-1751.

Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukaemia. **Blood.**1999;**93**:1732-1737.

Hamblin TJ, Abdul-Ahad A, Gordon J, Stevenson F, Stevenson G. Preliminary experience in treating lymphocytic leukemia with antibody to immunoglobulin idiotypes on the cell surfaces. **BR. J. Cancer.**1980;**42**:495-502.

Hamblin TJ, Oscier D. Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of the leukaemic cell. **Hematol. Oncol.**1997;**11**:119-128.

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. **Blood.**1999;**94**:1848-1854.

Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. 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.**2002;**99**:1023-1029.

Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadmauer E, Reed JC. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Blood.**1993;**82**:1820-1828.

Herishanu Y, Polliack A. Chronic lymphocytic leukemia: a review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options. **Transfusion and Apheresis Science.**2005;**32**:85-97.

Hernández JA, Land KJ, McKenna RW. Leukemias, myeloma, and other lymphoreticular neoplasms. **Cancer.**1995;**75 Suppl**:318-394.

Ho AD, Thaler J, Stryckmans P, Coiffier B, Luciani M, Sonneveld P, et al. Pentostatin in refractory chronic lymphocytic leukemia: a phase II trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**1990;**82**:1416-1420.

Hoffbrand AV, Panayiotidis P, Reittie J, Ganeshaguru K. Autocrine and paracrine growth loops in chronic lymphocytic leukemia. **Semin. Hematol.**1993;**30**:306-317.

Horlet A, Belge KU, Steppich B, Prinz J, Ziegler-Heitbrock L. The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production. **B. Eur. J. Immunol.**2002;**32**:1319-1327.

Huang RW, Tsuda H, Takatsuchi K. Interleukin-2 prevents programme cell death in chronic lymphocytic leukemia cells. **Int. J. Haematol.**1993;**58:83-92**.

Huguley CM Jr. Treatment of chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Treat Rev.** 1977;**4:261-273**.

Husebekk A, Fellowes V, Read EJ, Williams J, Petrus MJ, Gress RE, Fowler DH. Selection and expansion of T cell from untreated patients with CLL: source of cells for immune reconstitution?. **Cytotherapy.**2000;**2:187-193**.

International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Chronic lymphocytic leukaemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. **Ann. Intern. Med.**1989;**110:236-238**.

Jacksic B, Vitale B. Total tumor mas score (TTM). A new parameter in chronic lymphocytic leukemia. **Br. J. Haematol.**1981;**49:405-413**.

Jarque I, Sanz G, Gomis F, Martínez G, de la Rubia J, López F, Sanz MA. Chronic lymphatic leukemia. I.Clinico-biological features and survival analysis. Study of 18 patients. **Sangre Barc.**1991;**36:277-284**.

Jewell AP, Worman CP, Lydyard PM, Yong KL, Giles FJ, Goldstone AH. Interferon-alfa up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL cells from apoptosis in vitro and in vivo. **Br. J. Hematol.**1994;**88:268-274**.

Johannsson J, Specht L, Mejer J, Jensen BA. Phase II study of palliative low-dose local radiotherapy in disseminated indolent non-Hodgskin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**2002;**54:1466-1470**.

Johnstone AP, Jensenius JC, Millard RE, Hudson L. Mitogen-stimulated immunoglobulin production by chronic lymphocytic leukaemic lymphocytes. **Clin. Exp. Immunol.**1982;**47:697-705**.

Johnson SA, Catovsky D, Child JA, Newland AC, Milligan DW, Janmohamed R. Phase I/II evaluation of pentostatin (2'-deoxycoformycin) in a five day schedule for the treatment of relapsed/refractory b-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Invest. New Drugs.**1998;**16:155-160**.

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory by repetitive stimulation with allogenic immature human dendritic cells. **J. Exp. Med.**2000;**192:1213-1222**.

Juliusson G. Immunologic and cytogenetic studies improve prognosis prediction in chronic B-lymphocytic leukemia. A multivariate analysis of 24 variables. **Cancer.**1986;**58:688-693**.

Jurlander J. The cellular biology of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Crit. Rev. Oncol. Hemato.**1998;**27:29-52**.

Kamper EF, Papaphilis AD, Angelopoulou MK, Kopeikina LT, Siakantiris MP, Pangalis GA, Stavridis JC. Serum levels of tetranectin, intracellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 in B-chronic lymphocytic leukemia. **Clin. Biochem.**1999;**32:639-645**.

Karlsson K, Stromber M, Liliemark J, Delannoy A, Johnson SA, Porwit A, et al. Oral cladribine for b cell chronic lymphocytic leukaemia: report of a phase II trial with a 3-d, 3-weekly schedule in untreated and pretreated patients, and a long term following-up of 126 previously untreated patients. **Br. J. Haematol.**2002;**116:538-548**.

Kay NE, Johnson JD, Staner R, Douglas SD. T cell subpopulations in chronic lymphocytic leukemia. Abnormalities in distribution and in vitro receptor maturation. **Blood.**1979;**54:540-543**.

Kay NE, Kaplan ME. Relationship in chronic lymphocyte leukemia between T-cell dysfunction and defection expression of T-cell membrane antigens. **Blood.**1982;**Suppl60:113A**.

Kay NE, Kaplan ME. Defective T cell responsiveness in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of activation events. **Blood.**1986;**67:578-581**.

Kay NE, Perri RT. Evidence that large granular lymphocytes from B-CLL patients with hypogammaglobulinemia down-regulate B-cell immunoglobulin synthesis. **Blood.**1989;**73:1016-1019**.

Kay NE, Ranheim EA, Peterson LC. Tumor suppressor genes and clonal evolution in B-CLL. **Leuk. Lymphoma.**1995;**18:41-49**.

Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M, Redman J, Koller C, Barlogie B, et al. Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. **Blood.**1989;**74:19-25**.

Keating MJ, Kantarjian H. The serum beta-2-microglobulin level is more powerful than stage in predicting response and survival in CLL. **Blood.**1995;**86:606**.

Keating MJ, O'Brien S. High-dose rituximab therapy in chronic lymphocytic leukaemia. **Semin. Oncol.**2000;**suppl.12:86-90**.

Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet JL, Hillmen P, Byrd J, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. **Blood.**2002;**99:3554-3561**.

Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, Lerner S, Plunkett W, Giles F, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. **J. Clin. Oncol.**2005;**23:4079-4088**.

Khoury IF, Keating MJ, Vriesendorp HM, Reading CL, Przepiorka D, Huh YO, et al. Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia: preliminary results. **J. Clin. Oncol.**1994;**12:748-758**.

Khouri IF, Keating MJ, Saliba RM, Champlin RE. Long-term follow-up of patients with CLL treated with allogeneic hematopoietic transplantation. **Cytherapy.2002;4:217-221.**

Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. **J. Immunol.2000;164:1269-1276.**

Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukaemia and related diseases. **En Beutler E, Collier BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. Eds, Hematology. McGraw-Hill 2002, pags 1350-1363.**

Kitabayashi A, Hirokawa M, Miura AB. The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic B-lymphocyte leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cells death. **Int. J. Hematol.1995;62:99-106.**

Köning A, Menzel T, Lynen S, Wrazel L, Rosen A, AL-Katib A, et al. Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. **Leukemia.1997;11:258-265.**

Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, Bühler A, Seiler T, Kienle D, et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. **J. Clin. Oncol.2006;24:969-975.**

Kunicka JE, Platsoucas CD. Induction of suppressor cells to T- and B-cell proliferative responses and immunoglobulin production by monoclonal antibodies recognizing the CD3 T-cell differentiation antigen. **Cell. Immunol.1988;116:195-215.**

Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. **Blood.1998;91:2387-2396.**

Lai R, O'Brien S, Maushouri T, Rogers A, Kantarjian H, Keating M, Albitar M. prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. **Cancer.2002;95:1071-1075.**

Lamanna N, Weiss MA, Maslak PG, et al. Sequential therapy with fludarabine, high dose cyclophosphamide, and rituximab induces a high incidence of complete response in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.2003;22:580.**

Lauria F, Foa R, Montavani V, Fierro T, Catovsky D, Tura S. T-cell functional abnormality in B-chronic lymphocytic leukemia: Evidence for a defect in the T-helper subset. **Br. J. Haematol.1983;54:277-283.**

Lee JS, Dixon DO, Kantarjaian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. **Blood.1987;69:929-936.**

Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER. Perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. **J. Immunol.**1996;**157:1919-1925**.

Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, et al. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. **Blood.**2001;**98:2319-2325**.

Letestu R, Rawstron A, Ghia P, Villamor N, Leuven NB, Boettcher S, et al. Evaluation of ZAP-70 expression by flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia: a multicentric international harmonization process. **Cytometry B Clin. Cytom.**2006;**70:309-314**.

Lindelmal S, Liliemark J, Gruber A, Eriksson S, Karlsson MO, Wang Y, Albertioni F. Comparison of cytotoxicity of 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine (clofarabine) with cladribine in mononuclear cells from patients with acute myeloid and chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica.**2003;**88:324-332**.

Mainou-Fowler T, Miller S, Proctor SJ, Dickinson AM. The levels of TNF α , IL-4 and IL-10 production by T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). **Leuk. Res.**2001;**25:157-163**.

Mandelli F, De Rosi G, Mancini P, Alberti A, Cajozzo A, Grignani F, et al. Prognosis in chronic lymphocytic leukemia: a retrospective multicentric study from the GIMEMA group. **J. Clin. Oncol.**1987;**5:398-406**.

Matutes E, Wechsler A, Gómez R, Cherchi M, Catovsky D. Unusual T-cell phenotype in advanced B-chronic lymphocytic leukemia. **Br. J. Haematol.**1981;**49:636-642**.

Matutes E, Halsey J, Morilla R. Prognostic significance of membrane antigens and morphology in chronic lymphocytic leukemia. **Blood.**1999;**94:535**.

Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, Girelli G. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic and prognostic features. **Blood.**2000;**343:1910-1916**.

Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, Blay JY. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34+ progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. **Blood.**1998;**92:4778-4791**.

Michallet M, Corront B, Hollard D, Gratwohl A, Milpied N, Dauriac C, et al. Allogeneic bone marrow transplantation in chronic lymphocytic leukemia: 17 cases. Report from the EBMTG. **Bone Marrow Transplant. Registry.**1991;**7:275-279**.

Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, Okamoto H, Yamazaki H, Ohta K, et al. Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase HO-1 in response to acute inflammation. **Clinical and Experimental Immunology.**2005;**142:461-470**.

Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M, Zandotti C, Briere F, Lamballeri XN, et al. Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. **Blood.**2001;**98**:3750-3756.

Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. **Cancer.**1987;**60**:2712-2716.

Molica S. Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival and treatment. **Leuk. Lymphoma.**1994;**13**:203-214.

Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: analysis of its prognostic significance. **Br. J. Haematol.**1986;**62**:567-575.

Montserrat E, Vinolas N, Reverter JC, Rozman C. Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the progression and prognosis of early clinical stages. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**1988;**30**:359-361.

Montserrat E, Gomis F, Vallespi T, Rios A, Romero A, Soler J, et al. Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leucemia in younger adults. **Blood.**1991;**78**:1545-1551.

Montserrat E. Síndromes linfoproliferativos crónicos con expresión leucémica. **Medicine.**1992;**6**:219-235.

Montserrat E, Rozman C. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic factors and natural history. **Baillieres Clin. Haematol.**1993;**6**:849-866.

Montserrat E, Rozman C. Chronic lymphocytic leukaemia: present status. **Ann. Oncol.**1995;**6**:219-235.

Montserrat E, Bosch F, Rozman C. B-cell chronic lymphocytic leukaemia: recent progress in biology, diagnosis, and therapy. **Ann. Oncol.**1997; **8 Suppl 1**:93-101.

Montserrat E, Moreno C. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. **Blood Reviews.**2008;**22**:211-219.

Moreton P, Hillmen P. Alemtuzumab therapy in B-cell lymphoproliferative disorders. **Semin. Oncol.** 2003;**30**:493-501.

Morrison VA. The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. **Semin. Oncol.**1998;**25**:98-106.

Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg Am, Liu YJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. **J. Immunology.**2004;**173**:4433-4442.

Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. **Immunology Today.** 1991;12:49-53.

Motta M, Rassenti L, Shelvin BJ, Lerner S, Kipps TJ, Keating MJ, Wierda WG. Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia.** 2005;19:1788-1793.

Nakagomi H, Peterson M, Magnusson I, Juhlin C, Matsuda M, Mellstedt H, et al. Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. **Cancer Res.**1993;53:5610-5612.

Newman RA, Peterson B, Davey FR, Brabyn C, Collins H, Brunetto VL, et al. Phenotypic markers and BCL-1 gene rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. **Blood.**1993;82:1239-1246.

Nilsson K, Larsson LG, Carlsson M. Control of growth and differentiation of B-type chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. **Leukemia.**1992;6 Sppl 3:20-21.

O'Brien SM, Kantarjian H, Coets J, Beran M, Koller CA, Giles FJ, et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. **J. Clin. Oncol.**2001a;19:1414-1420.

O'Brien SM, Kantarjian HJ, Thomas DA, Giles FJ, Freireich EJ, Cortes J, et al. Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukaemia. **J. Clin. Oncol.**2001b;19:2165-2170.

Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Wiestner A, Rosenwald A, Thomas PW, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. **Lancet.**2004;363:105-111.

Orfao A, González M, San Miguel JF, Canizo MC, Galindo P, Caballero MD, et al. Clinical and immunological findings in large B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Clin. Immunol. Immunopathol.**1988;46:177-185.

Orsini E, Guarini A, Chiaretti S, Mauro FR, Foa R. The circulating dendritic cell compartment in patients with chronic lymphocytic leukemia is severely defective and unable to stimulate an effective T-cell response. **Cancer Res.**2003;63:4497-4506.

Osorio LM, De Santiago A, Aguilar-Santelises M, Mellstedt H, Jondal M. CD6 ligation modulates the Bcl-2/Bax ratio and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis induced by anti-IgM. **Blood.**1997;89:2833-2841.

Otten G, Yokohama WH. Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACScan. **Current Protocols in Immunology.** John Wiley & Sons. New York. 1994.

Panayiotidis P, Ganeshagaru K, Jabbar SA, Hoffbrand AV. Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-cell chronic lymphocytic leukemia in vitro. **Br. J. Haematol.**1993;85:439-445.

Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, Zapata JM, Karras JG, Tsukada N, et al. Protection of CLLB cells by follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. **Blood.**2002;**100**:1795-1801.

Peller S, Kaufman S. Decreased CD45RA T cells in B-Cell Chronic Lymphatic Leukemia patients: Correlation with Disease Stage. **Blood.**1991;**78**:1569-1573.

Peterson LC, Bloomfield C, Brunning RD. Relationship of clinical staging and lymphocyte morphology to survival in chronic lymphocytic leukemia. **Br. J. Haematol.**1980;**44**:563-567.

Pizzolo G, Chilosi M, Ambosetti A, Semenzato G, Fiore-Donati L, Perona G. Immunohistologic study of bone marrow involvement in B-chronic lymphocytic leukemia. **Blood.**1983;**62**:1289-1296.

Plastoucas CD, Galinski M, Kempin S, Reich L, Clarkson B, Good RA. Abnormal T lymphocyte subpopulations in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia: An analysis by monoclonal antibodies. **J. Immunol.**1982;**129**:2305-2312.

Podhorecka M, Dmoszynska A, Rolinski J, Wasik-Szczepanek E. Intracellular interleukin-2 expression by T-cell subsets in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Hematologica.**2001;**86**:549-550.

Podhorecka M, Dmoszynska A, Rolinski J, Wasik E. T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia the tree color flow cytometry analysis. **Leuk. Res.**2002;**26**:657-660.

Podhorecka M, Dmoszynska A, Rolinski J. Intracellular INF- γ expression by CD3+/CD8+ cell subset in B-CLL patients correlates with stage of the disease. **Eur. J. Haematol.**2004;**73**:29-35.

Podhorecka M, Bojarska-Junak A, Rolinski J, Dmoszynska A. Intracellular cytokine expression by T cells differs in ZAP-70-positive and ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukaemia patients. **Acta Haematol.**2007;**118**:106-110.

Porakishvili N, Kardava L, Jewell AP, Yong K, Glennie MJ, Akbar A, Lydyard PM. Cytotoxic CD4+ T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via a perforin-mediated pathway. **Hematologica.**2004;**89**:435-443.

Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. **Radiat Res.**1994;**137**:S68-97.

Prieto A, García-Suaréz J, Reyes E, Lapeña P, Hernández M, Álvarez-Mon M. Diminished DNA synthesis in T cells from B chronic lymphocytic leukemia after phytohemagglutinin, anti-CD3, and phorbol myristate acetate mitogenic signals. **Exp. Hematol.**1993;**21**:1563-1569.

Prieto A, Reyes M, García-Suárez J, Arriagada FC, del Puerto Hernández-Fuentes M, Vilaplana JC, Álvarez-Mon M. A low blood lymphocyte count is associated with an expansion of activated cytotoxic lymphocytes in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Eur. J. Haematol.**1997;**59:89-99**.

Prieto A, Díaz D, Barcenilla H, García-Suárez J, Reyes E, Monserrat J, et al. Apoptotic rate: a new indicator for the quantification of the incidence of apoptosis in cell cultures. **Cytometry.**2002;**48:185-193**.

Rabinowe SN, Soiffer RJ, Gribben JG, Daley H, Freedman AS, Daley AS, et al. Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for poor prognosis patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood.**1993;**82:1366-1376**.

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. **Blood.**1975;**46:219-234**.

Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. En Gale RP, Rai KR. Eds, **Chronic lymphocytic leukemia: recent progress and future directions. UCLA symposia on molecular and cellular biology, New series. Alan R. Liss, NY.**1987;**59:253-259**.

Rai KR, Han T. Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**1990;**4:447-456**.

Rai KR, Patel DV. Chronic Lymphocytic leukaemia. En Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ Eds, **Hematology. Basic principles and practice. Churchill Livingstone 2000a, pags1350-1363**.

Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. **N. Engl. J. Med.**2000b;**343:1750-1757**.

Rai KR, Freter CE, Mercier RJ, Cooper MR, Mitchell BS, Stadtmauer EA, et al. Alemtuzumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine. **J. Clin. Oncol.**2002;**20:3891-3897**.

Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. **N. Engl. J. Med.**2004;**351:893-901**.

Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. **Blood.**2002;**100:230-237**.

Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JA, Evans PA, et al. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. **Blood.**2002;**10:635-39**.

Redman JR, Cabanillas F, Velasquez WS, McLaughlin P, Hagemester FB, Swan FJr, et al. Phase II trial of fludarabine phosphate in lymphoma: an effective new agent in low-grade lymphoma. **J. Clin. Oncol.**1992;**10**:790-794.

Reyes E, Prieto A, Carrión F, García-Suarez J, Esquivel F, Álvarez-Mon M. Morphological variants of leukemic cells in B chronic lymphocytic leukemia are associated with different T cell and NK cell abnormalities. **Am. J. Hematol.**1997;**55**:175-182.

Rezvany MR, Jeddi-Tehrani M, Osterborg A, Kimby E, Wigzell H, Mellstedt H. Oligoclonal TCRBV gene usage in B-cell chronic lymphocytic leukemia: major perturbations are preferentially seen within the CD4 T-cell subset. **Blood.**1999;**94**:1063-1069.

Rezvany MR, Jeddi-Tehrani M, Biberfeld P, Soderlund J, Mellstedt H, Osterborg A, Rabbani H. Dendritic cells in patients with non-progressive B-chronic lymphocytic leukemia have a normal functional capability but abnormal cytokine pattern. **Br. J. Haematol.**2001;**115**:263-271.

Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). **Blood.**2006;**107**:3584-3592.

Rickinson AB, Finerty S, Epstein MA. Interaction of Epstein-Barr virus with leukaemic B cells in vitro. Abortive infection and rare cell line establishment from chronic lymphocytic leukaemic cells. **Clin. Exp. Immunol.**1982;**50**:347-354.

Ritgen M, Lange A, Stilgenbauer S, Dohner H, Bertscher C, Bosse H, et al. Unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status remains an adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia. **Blood.**2003;**101**:2049-2053.

Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, Blasinska-Morawiec M, Krykowski E, Dmoszynska A, et al. Cladribine with prednisone versus chlorambucil with prednisone as first-line therapy in chronic lymphocytic leukemia: report of a prospective, randomized, multicenter trial. **Blood.**2000;**96**:2723-2729.

Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. **J. Exp. Med.**2001;**194**:1639-1647.

Rossi E, Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Heffernan AM, Catovsky D. Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia.**1996;**10**:494-497.

Rozman C, Hernández-Nieto L, Montserrat E, Bruges R. Prognostic significance of bone-marrow patterns in chronic lymphocytic leukaemia. **Br. J. Haematol.**1981;**47**:529-537.

Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernández JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, et al. Bone marrow histologic pattern-the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. **Blood.**1984;**64**:642-648.

Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukaemia. **N. Engl. J. Med.**1995;**19**:1052-1057.

Rutella S, Rumi C, Puggioni P, Barberi T, Di Mario A, Larocca LM, Leone G. Expression of thrombospondin receptor (CD36) in B-cell chronic lymphocytic leukemia as an indicator of tumor cell dissemination. **Haematologica.**1999;**84**:419-424.

Sadamori N, Block AW, Han T, Sandberg AA. Cell cycle analysis of stimulated lymphocytes of B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Genet. Cytogenet.**1984;**11**:395-398.

Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, et al. CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. **Blood.**1995;**85**:2910-2917.

Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G, et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukaemia. **Blood.**1996;**88**:4259-4264.

Scamardella F, Maconi M, Albertazzi L, Gamberi B, Gugliotta L, Brini M. Abnormal intracellular level of bax in CD3+ cells from untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. **Laboratory Hematology.**2006;**12**:187-192.

Schäkel K, Mayer E, Federle C, Scmitz M, Riethmuller G, Rieber EP. A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by specific mAb M-DC8 and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes. **Eu. J. Immunol.**1998;**12**:4084-4093.

Schena M, Larsson LG, Gottardi D, Gaidano G, Carlsson M, Nilsson K, Caligaris-Cappio F. Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood.**1992;**79**:2981-2989.

Schranz V, Graf F. Prognostic significance of the heterogeneous expression of IgG Fc receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Ann. Hematol.**1992;**64**:140-145.

Scriviener S, Kaminski ER, Demaine A, Prentice AG. Analysis of the expression of critical activation/interaction markers on peripheral blood T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of immune dysregulation. **Br. J. Haematol.**2001;**112**:959-964.

Serrano D, Monteiro J, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Lichtman SM, et al. Clonal expansion within the CD4+CD57+ and CD8+CD57+ T cell subsets in chronic lymphocytic leukemia. **J. Immunol.**1997;**158**:1482-1489.

Seymour JF, Cusack JD, Lerner SA, Pollock RE, Keating MJ. Case/control study of the role of splenectomy in chronic lymphocytic leukemia. **J. Clin. Oncol.**1997;**15**:52-60.

Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. **Blood.**2004;**103**:1202-1210.

Shankey TV, Forman M, Scibelli P, Cobb J, Smith CM, Mills R, et al. An optimized whole blood method for flow cytometric measurement of Zap-70 protein expression in chronic lymphocytic leukemia. **Cytometry B Clin. Cytom.**2006;**70**:259-269.

Shimoni A, Marcus H, Dekel B, Shkarchi R, Arditti F, Shvidel L, et al. Autologous T cells control B-chronic lymphocytic leukemia tumor progression in human->mouse radiation chimera. **Cancer Res.**1999;**59**:5968-5974.

Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. **Blood.**1998;**91**:756-763.

Solanki DL, McCurdy PR, MacDermott RP. Chronic lymphocytic leukemia: a monoclonal disease. **Am. J. Hematol.**1982;**13**:159-162.

Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Dohner K, et al. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukaemia. **Leukemia.**1999;**13**:1331-1334.

Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Weglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B, Zembala M. Antitumor response of CD14+CD16+ monocyte subpopulation. **Exp. Hematology.**2004;**32**:748-755.

Taberero MD, San Miguel JF, García JL, García Isidoro M, Wiegant J, Ciudad J, et al. Clinical, biological, and immunophenotypical characteristics of B-cell chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12 by fluorescent in situ hybridization. **Cytometry.**1995;**22**:217-222.

Thinhofer I, Marschitz I, Kos M, Henn T, Egle A, Villunger A, Greil R. Differential sensitivity of CD4+ and CD8+ T lymphocytes to the killing efficacy of Fas (Apo-1/CD95) ligand+tumor cells in B chronic lymphocytic leukemia. **Blood.**1998;**91**:4273-4281.

Tooze JA, Bevan DH, Lver AM. Surface and molecular expression of complement-receptor type 2 of neoplastic CD5+ B cells in chronic lymphocytic leukemia. **Ann. N. Y. Acad. Sc.**1992;**651**:494-497.

Totterman TH, Carlsson M, Simonsson B, Bengtsson M, Nilsson K. T-cell activation and subset patterns are altered in B-CLL and correlate with the stage of the disease. **blood.**1989;**74**:786-792.

Trnety M, Salkova J, Karban J. Combined therapeutic modality with rituximab, fludarabine and cyclophosphamide followed by high dose therapy with autologous stem cell transplantation (ASCT) leads to excellent response rate and high probability of molecular remission in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients. **Proc. Am. Soc. Hematol.**2002;**100**:3176.

Van den Hove LE, Van Gool SW, Vandenberghe P, Boogaerts MA, Ceuppens JL. CD57+/CD28- T cells in untreated hematological patients are expanded and display a Th1-type cytokine secretion profile, ex vivo cytolytic activity and enhanced tendency to apoptosis. **Leukemia** 1998;**12**:1573-1582.

Vullier F, Tortevoeye P, Binet JL, Dighiero G. CD4, CD8 and NK subsets in B-CLL. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**1988;**30**:331-334.

Wang B, Geng YB, Wang CR. CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. **J. Exp. Med.**2001;**194**:313-320.

Wang E, Lehner PJ, Graham S, Borysiewicz LK. CD8 high (CD57+) T cells in normal healthy individuals suppress the generation of cytotoxic T lymphocytes to Epstein Barr virus transformed B cell lines. **Eur. J. Immunol.**1994;**24**:2903-2909.

Weiss MA, Maslak PG, Jurcic JG, Scheinberg DA, Aliff TB, Lamanna N, et al. Pentostatin and cyclophosphamide: an effective new regimen in previously treated patients with chronic lymphocytic leukemia. **J. Clin. Oncol.**2003a;**21**:1278-1284.

Weiss MA, Lamanna N, Maslak PG. Pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab (PCR therapy): a new active regimen for previously treated patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**2003b;**22**:580.

Wierda WG, Johnson MM, Do KA, Manshouri T, Dey A, O'Brien S, et al. Plasma interleukin 8 level predicts for survival in chronic lymphocytic leukaemia. **Br. J. Haematol.**2003;**120**:452-456.

Wierda WG, Faderl S, O'Brien S. Combined cyclophosphamide, fludarabine, alemtuzumab, and rituximab (CFAR) is active for relapsed/refractory patients with CLL. **Blood.**2004;**104**:101.

Wierda WG, O'Brien S, Wen S, Faderl S, García-Manero G, Thomas D, et al. Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. **J. Clin. Oncol.**2005;**23**:4070-4078.

Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukaemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. **Blood.**2003;**101**:4944-4951.

Winkler U, Jensen M, Manzke O, Schulz H, Diehl V, Engert A. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). **Blood.**1999;**94**:2217-2224.

Yang H, Rosove MH, Figlin RA. Tumor lysis syndrome occurring after the administration of rituximab in lymphoproliferative disorders: high-grade non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. **Am. J. Hematol.**1999;**62**:247-250.

Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. **Br. J. Haematol.**2000;**109**:794-799.

Zhu Y, Monni O, El-Rifai W, Siitonen SM, Vilpo L, Vilpo J, Knuutila S. Discontinuous deletions at 11q23 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Leukemia.**1999;**13**:708-712.

Ziegler-Heitbrock HW, Kay NE, Zarling JM. Deficiency of natural killer cell activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. **Int. J. Cancer.**1981;**27**:321-327.

SUMMARY

SUMMARY.

Background: B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is a chronic lymphoproliferative disease, are characterized by progressive accumulation of monoclonal B cells that appear mature but are to be functionally incompetent. The clinical evolution of B-CLL is very heterogeneous. The pathogenesis of this heterogeneity is poorly understood. Both the leukemic B cells and the non transformed immune cells of the patient appear to be involved in the clinical behavior of the disease. The clinical staging systems developed by Rai and Binet have been effectively used for decades to assess the diagnostic, prognostic and therapeutic requirements at the time of diagnosis. However these systems cannot identify stable or progressive forms of the patients at the early stages of the disease. There has been a persistent effort to identify other prognostic factors in B-CLL. Actually, several biologic markers have been associated with a low or high level of clinical risk in B-CLL, there include the percentage of ZAP-70 expression by B cells. The expression of the intracellular signalling molecule ZAP-70 in leukemic B-cells has been identified in a majority of B-CLL cases without IgVH mutations. ZAP-70 expression is also highly predictive of patients with more rapid disease progression and death. The aim of this study is to investigate the distribution, survival and functional state of cells from different immune system compartments in peripheral blood B-CLL patients classified by the expression of ZAP-70 in leukemic cells.

Material and methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from heparinised blood samples from thirty four LLC-B patients were obtained. A further requirement was all the patients were in Binet A and RAI 0 stage. The exclusion criteria were anything causing primary or acquired immunodeficiency, previous immunosuppressive or immunomodulation chemotherapy or radiotherapy, autoimmune or allergic disease. Eighteen blood samples from healthy donors with age- and sex-matched were obtained too. The B-CLL patients were grouped in two groups (ZAP-70⁻ B-CLL and ZAP-70⁺ B-CLL patients) according to the expression of ZAP-70 for their tumour cells. The samples were analyzed by both four and nine colors flow cytometry by study the distribution of dendritic cells, monocytes, T, B and NK cells. Apoptosis and intracellular production of cytokines by T lymphocytes were also studied.

Results: Significant differences in the distribution of DCs were observed between ZAP-70+ B-CLL patients and both ZAP-70- B-CLL patients and healthy controls. On the other hand, significant differences in the absolute counts and percentages of different subsets of monocytes were observed between ZAP-70+ B-CLL patients and both ZAP-70- B-CLL patients and healthy controls too. In addition the patients ZAP-70+ showed a significant redistribution of the circulating monocytes with an increase of the subpopulations CD14-CD16^{high} and CD14^{low}CD16^{high} and a decrease of the CD14^{hi}CD16-. The disease is associated with a decrease of monocyte counts and with decrease of the expression of molecules involved in the coestimulation and cellular migration of the majority of the monocytes subsets.

The ZAP-70+ B-CLL patients showed significant increases in absolute counts and percentages of CD4+FOXP-3+ cells when compared with both ZAP-70- B-CLL patients and healthy controls. These patients presented a deep redistribution of CD4+ CD8+ T lymphocytes, with a significant increase of effector CD4+ T cells, a significant decrease of naive CD4+ T cells, a significant decrease of the naive and effector memory CD8+ T cells and a significant increase of the central memory CD8+ T cells. On the other hand the ZAP-70+ B-CLL patients presented significant decrease of NK cells and significant increase of T_K cells with increase of expression of cell activation surface antigens. When we analyzed apoptosis in T cells, we found that ZAP-70+ B-CLL patients presented an increased spontaneous apoptosis *in vitro* in all the populations and subsets of T lymphocytes studied with regard to both ZAP-70- B-CLL patients and healthy controls. The studies on intracellular cytokine production showed that in the ZAP-70+ B-CLL patients there is an increase of the CD4+ T lymphocytes with Th2 pattern of cytokine production (high production of IL-4 and IL-10) with regard to the ZAP-70- B-CLL patients, being the naive and effector subsets more affected by these alterations.

Conclusion: Our results have demonstrated alterations of the populations of the immune system in B-CLL patients, that are markedly different in the patients according to their degree of ZAP-70 expression on leukemic cells. These different alterations can be involved in the pathogeny of the different clinical behaviour of both groups.