



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departament de Medicina

Facultat de Medicina

TESI DOCTORAL:

**“Estudi del compartiment proliferant i quimioresistent
en la Leucèmia Limfàtica Crònica. Modelització i
identificació d’una nova diana terapèutica”**

Tesi presentada per

Noèlia Purroy i Zuriguel

per optar al grau de

Doctora en Medicina

Directors

Dr Francesc Bosch Albareda

Dra Marta Crespo Maull

Tutor

Dr Víctor Vargas Blasco

Barcelona, 2015

Als meus pares i a la meua germana

A l'Oriol

El mundo

Un hombre del pueblo de Neguá, en la costa de Colombia, pudo subir al alto cielo.

A la vuelta, contó. Dijo que había contemplado, desde allá arriba, la vida humana. Y dijo que somos un mar de fueguitos.

- El mundo es eso – reveló -. Un montón de gente, un mar de fueguitos.

Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.

Eduardo Galeano

El libro de los abrazos

Agraïments

Recordar: del llatí *re-cordis*, tornar a passar pel cor.

Arribats al final, cal mirar enrere i recordar. Recordar els moments i recordar les persones. Que el passat es faci present per uns instants i així adonar-nos que aquest treball és de tots i cadascun de vosaltres.

És del Dr Francesc Bosch, que un dia em va donar l'oportunitat de començar i, amb el temps, la confiança per a continuar. Gràcies, Francesc, per l'oferiment de treballar plegats, pel suport i acompanyament en aquests anys, pels consells i les discussions. Gràcies per mantenir el rumb de tot plegat.

És de la Dra Marta Crespo. És difícil trobar les paraules que expressin tot el meu agraïment cap a tu, Marta. No et faria justícia. I no tant pel que has fet sinó pel que has estat per a mi. Has estat el sentit comú, l'exigència i l'eficiència en la feina però sobretot, has estat algú amb qui he pogut compartir dubtes i preocupacions però també satisfaccions i molts riures. Mai t'ho acabaré de pagar.

És dels companys del laboratori. I en especial, de la Júlia. Gràcies, Júlia, tu també m'has ensenyat moltes coses, m'has ensenyat a ser sincera, a tenir una capacitat de treball incondicional, a no perdre mai l'alegria i el bon humor. Espero que puguem mantenir-nos a prop molt de temps. Gràcies, Eva, per rebre'm amb simpatia i generositat, gràcies per les primeres classes d'iniciació a la "poyata" i per les converses entre ratolins. Va ser un plaer compartir aquestes estones amb tu. També gràcies a la Ceci, perquè sempre has demostrat, tant al laboratori com a l'hospital, la teva disposició inesgotable a ajudar i gràcies també per la teva disposició a "endolcir-nos la vida". I a tu, Pau, tot i que no ets al laboratori sempre t'hem sentit ben a prop. Moltes gràcies pel teu suport i per la teva generositat, és un autèntic plaer treballar amb tu. Gracias, Isabel, hace poco que eres "una más", pero igualmente el trabajo también es tuyo. Espero que aprendas mucho y disfrutes haciéndolo. És també de tots els estudiants que han anat passant durant aquest temps pel laboratori: la Meri, la Leire, la Marta, el Marc i la Lídia. Tots heu posat el vostre granet o muntanya de sorra en aquest treball. M'heu donat esforç, interès i il·lusió. Moltes gràcies.

I encara al laboratori, la meva primeríssima companya de feina, l'Anna, saps que vas ser molt important per a mi, va ser molt fàcil entendre'ns i molt difícil oblidar-ho. Gràcies per la simpatia, pel bon humor i pels riures compartits.

Aquest treball no seria sense la citometria. I dir citometria és dir Carles i dir Laura. Moltíssimes gràcies pels consells, per l'ajut generós, per la vostra amabilitat i pel vostre interès. És un regal poder-vos tindre ben a prop. I gràcies també a la Isabel i la Montse, pel suport i ajut que sempre ens heu donat. Gràcies a la Carme Sànchez i la Mayda del laboratori de citologia, a la Magui i la Teresa Vallespí del laboratori de citogenètica, i a la Dori del laboratori de biologia molecular, sempre heu demostrat la vostra disposició a ajudar-me i amablement ho va fer quan ho vaig necessitar.

Aquesta tesi també és dels meus primers companys a l'hospital. Aquells qui des del primer dia em van fer sentir "membre de la família". Aquells qui em van ensenyar a ser el tipus de metge que vull ser. I entre aquests, m'hauria agradat ensenyar aquest treball al Dr. Julià i al Dr. Zuazu i donar-vos-en les gràcies. Vull pensar que us n'hauríeu sentit, d'alguna manera, orgullosos. Gràcies, Dr. Bueno, Dr. Callís i Dra. Massagué. Gracias, Dr. López por tu inagotable buen humor, por tu amabilidad, por la ayuda generosa, por los sabios consejos, por tu humanidad, porque gracias a tí pasé los peores nervios que he pasado por una buena razón. Muchísimas gracias. Siempre nos quedará el R-EPOCH!. Moltes gràcies a la Teresa, la Cristina, la Mayda, l'Eva, la Marta, la Laura, l'Andrés i la Vero: és impossible resumir en unes paraules tot el que em van donar i ensenyar, el que vam viure i compartir dins i fora de l'hospital. Afortunadament, l'amistat continua i la distància només ha significat un punt i seguit. Gràcies, Vero, el primer dia que ens vam conèixer em vas donar la mà i encara no me l'has deixat anar mai. Gràcies a les meves companyes de residència: la Sandra, la Ceci, la Lúcia, la Nerea, la Fabi, l'Anny, la Noe, l'Analí i la Dani. Van fer dels meus anys de resident un anys de completa alegria, il·lusió i felicitat. Gràcies per la vostra amistat i estimació. Gracias Lidia, desde nuestro "flechazo" no ha habido un momento que haya dejado de pensar que tu amistad para mí, es un auténtico tesoro.

I també és dels meus actuals companys a l'hospital. Gràcies, David, Pere, Guillem, Olga, Merche, Ana, Sabela, Julia, Laura, Brayan, Pàvel i Elisenda per la vostra amabilitat, el vostre ajut, interès i col·laboració que han estat bàsics per aquesta feina. Gràcies, Mireia, per ajudar-me sense demanar-t'ho, per l'afecte i pel teu riure contagiós. Gràcies també a la Dubraska, Nela, Carlos, Antonieta i Katia. Gràcies per fer-me fàcil el retorn a les guàrdies. I gràcies a la resta de companys de l'hospital que m'heu ajudat i donat suport d'una manera o una altra en aquests anys.

Si aquesta tesi és d'algú, és de la meua família. Gràcies als meus pares i a la meua germana. Aquesta tesi és més vostra que meua, sentiu-vos-la com a pròpia. Perquè ho sou tot per a mi i tot us ho donaria. Gràcies, Jaume, per ser el millor pare que el Xavi i el Sergi podien tindre. I gràcies Xavi i Sergi, per ser-hi, perquè mai havia pogut arribar a imaginar el que sento

per vosaltres, un amor immens. Gràcies també a la resta de la família. Gràcies, Sergi, per descobrir-me Barcelona, les pel·lícules iranians, i per les tardes d'hivern al Camp d'Esports (això sí que té mèrit!). Els meus pares ho van veure clar fa 34 anys i jo els dono les gràcies ara, no hauria pogut tindre un padrinet millor. Gràcies, Joaquim, perquè, tot i que últimament et llegeixo més que et vec, sempre t'he sentit molt a prop. I no puc em estar de dir-te (i sé que ho pagaré car): jo l'he acabada abans. Gràcies, cosins, per les sortides que ens mantenen units (ja sabem com és la família, oi Ramon?). I gràcies a la Pilar, el Josep, la Mireia, la Núria i l'Ivan per fer-me sentir des del primer dia, una més d'aquesta nova família.

Gràcies, Remei i Gemma, pel temps que vam viure plegades, un regal immillorable. Als amics d'Almacelles, per fer-me sentir orgullosa de la meva terra i la seva gent, que són les meves arrels, tronc i branques. I a la resta d'amics i amigues, que m'heu estat acompanyant tot aquest temps.

I gràcies a tu, Oriol, i justament amb tu, faré una excepció i deixaré que algú altre parli per mi:

Corren les nostres ànimes com dos rius paral·lels.

Fem el mateix camí sota els mateixos cels.

No podem acostar les nostres vides calmes:
entre els dos hi ha una terra de xiprers i de palmes.

En els meandres grocs de lliris, verds de pau,
sento, com si em seguís, el teu batec suau
i escolto la teva aigua, tremolosa i amiga,
de la font a la mar -la nostra pàtria antiga-.

Màrius Torres

Cançó a Mahalta

Així doncs, gràcies a tots vosaltres, els "petits focs" que m'heu donat llum i escalfor durant aquests anys. Us espero en els que vindran.

ÍNDIX

I.	INTRODUCCIÓ	1
1.	Hematopoesi i maduració del limfòcit B	1
1.1.	Hematopoesi	1
1.2.	Del progenitor hematopoiètic pluripotencial al limfòcit B immadur.....	3
1.2.1.	De les HSC al limfòcit pre-B	4
1.2.2.	Del limfòcit pre-B al limfòcit B immadur	5
1.3.	Desenvolupament del limfòcit B madur perifèric	7
2.	La Leucèmia Limfàtica Crònica	9
2.1.	Diagnòstic	9
2.1.1.	Presentació clínica	9
2.1.2.	Morfologia	10
2.1.3.	Immunofenotip.....	11
2.2.	Pronòstic.....	11
2.2.1.	Sistemes d'estadiatge.....	11
2.2.2.	Factors pronòstic	14
2.2.2.1.	Temps de duplicació limfocitària.....	14
2.2.2.2.	Marcadors sèrics.....	15
2.2.2.3.	Estat mutacional de les immunoglobulines	16
2.2.2.4.	L'expressió de ZAP-70.....	17
2.2.2.5.	L'expressió de CD38.....	17
2.2.3.	Alteracions citogenètiques	18
2.2.4.	Mutacions puntuals	20
2.3.	Patogènesi	23
2.3.1.	Origen cel·lular	23
2.3.2.	El microambient.....	26
2.3.2.1.	Les cèl·lules estromals del moll de l'os (BMSC).....	27
2.3.2.2.	Les quimioquines i els seus receptors	28
2.3.2.3.	Molècules d'adhesió.....	31
2.3.2.4.	El receptor CD40.....	32

ÍNDIX

2.3.2.5.	Toll-like receptors (TLRs)	33
2.3.3.	El receptor de la cèl.lula B (BCR)	35
2.3.3.1.	La senyalització derivada del BCR.....	36
2.3.3.2.	La proteïna Syk	38
2.3.3.3.	La proteïna ZAP-70	40
2.3.4.	La proteïna survivina	41
2.3.4.1.	La survivina en la Leucèmia Limfàtica Crònica	43
2.3.4.2.	L'antisurvivina (YM155).....	44
2.4.	Tractament	46
2.4.1.	Tractaments convencionals.....	47
2.4.1.1.	Tractament quimioteràpic.....	47
2.4.1.2.	Immunoquimioteràpia.....	49
2.4.2.	Nous tractaments	50
2.4.2.1.	Nous anticossos monoclonals	50
2.4.2.2.	Immunomoduladors	51
2.4.2.3.	Inhibidors de tirosina quinases.....	52
2.4.2.4.	Inhibidors de BCL-2.....	57
2.4.2.5.	CARs	57
2.4.3.	El trasplantament de progenitors hematopoètics	58
2.4.3.1.	El trasplantament autòleg de progenitors hematopoètics	58
2.4.3.2.	El trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics.....	58
2.4.4.	La malaltia mínima residual (MMR)	59
II.	HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS	63
III.	RESULTATS	65
IV.	DISCUSSIÓ.....	97
V.	CONCLUSIONS.....	103
VI.	BIBLIOGRAFIA.....	105

ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

Figura 1 Hematopoesi.....	2
Figura 2 Representació esquemàtica d'una immunoglobulina (Ig).....	3
Figura 3 El desenvolupament del limfòcit B	5
Figura 4 Extensió de sang perifèrica d'un pacient amb LLC.....	10
Figura 5 Origen de la cèl·lula d'LLC.....	25
Figura 6 Principals interaccions moleculars entre les cèl·lules d'LLC i el seu microambient	30
Figura 7 Representació esquemàtica de la senyalització derivada del BCR en la cèl·lula d'LLC.....	37
Figura 8 Representació esquemàtica de les estructures moleculars de Syk i ZAP-70.....	38
Figura 9 Estructura esquemàtica i funció de la survivina	41
Figura 10 Representació esquemàtica de la senyalització derivada del BCR i principals opcions terapèutiques.....	53
Taula 1 Expressió dels marcadors de superfície en els diferents estadis de maduració del limfòcit B.....	4
Taula 2 Sistema d'estadiatge segons la classificació original de Rai ³³	12
Taula 3 Sistema d'estadiatge segons la classificació de Binet ³⁴	13
Taula 4 Sistema d'estadiatge combinat segons la iwCLL ³⁵	13
Taula 5 Principals factors pronòstic.....	23
Taula 6 Criteris de malaltia activa per a l'indicació d'inici de tractament segons la iwCLL ³⁰	46
Taula 7 Nous anticossos monoclonals per al tractament de l'LLC ²⁴⁸	51

I. INTRODUCCIÓ

1. Hematopoesi i maduració del limfòcit B

1.1. Hematopoesi

L'hematopoesi és el procés de formació, maduració i pas a la sang dels diferents tipus de cèl·lules sanguínies a partir de la cèl·lula mare hematopoètica (HSC, de l'anglès *haematopoietic stem cell*). El desenvolupament de les cèl·lules hematopoètiques comença en el 7è dia embrionari (E7) a la membrana vitel·lina, en el mesoderm extraembrionari, a partir del qual sorgirà inicialment l'hemangioblast que donarà lloc a les cèl·lules endotelials i als precursors primitius eritroides (que expressaran la ζ globina). Els limfòcits s'originen en una segona "onada" a la regió anomenada aorto-gònado-mesonefros (AGM) en els E28-40 i posteriorment a la placenta i fetge fetal. Tot i que el moll de l'os comença a produir cèl·lules hematopoètiques a partir de la 8a setmana de gestació, aquestes són majoritàriament cèl·lules mieloides i contribueixen poc en el nombre total de cèl·lules circulants. És just abans del naixement quan el moll de l'os esdevé definitivament el principal nínxol hematopoètic, definit com aquell microambient dins d'un teixit determinat que manté i regula directament l'HSC. A partir d'aquest moment, serà només en resposta a estrès hematopoètic quan el nínxol hematopoètic podrà traslladar-se a altres localitzacions extramedul·lars^{1,2}.

El moll de l'os és un òrgan complex, conté molts tipus cel·lulars diferents hematopoètics i no hematopoètics que es troben envoltats per una matriu òssia vascularitzada i innervada. Les HSC es troben principalment adjacents als sinusoides (vènules especialitzades que formen una xarxa reticular de vasos fenestrats per permetre el pas de cèl·lules cap a la circulació i a l'inversa). Tant les cèl·lules endotelials com les BMSC (de l'anglès *bone marrow stromal cells*) promouen el manteniment de les HSC gràcies a la producció d'SCF (de l'anglès, *stem cell factor*) i CXCL12 (de l'anglès, *C-X-C motif chemokine 12*) entre d'altres factors³. Les cèl·lules estromals a més a més s'encarreguen de produir una matriu extracel·lular formada per col·làgen, laminina, fibronectina, àcid hialurònic, etc. Aquestes substàncies al seu torn, s'uneixen a les HSC a través de les integrines i d'altres molècules de superfície per tal de formar una matriu sòlida on les cèl·lules hematopoètiques s'hi mantenen unides⁴. Altres tipus cel·lulars contribueixen a la regulació del nínxol de les HSC, com són el sistema nerviós simpàtic (entre altres funcions, aquestes fibres formarien sinapsi amb les cèl·lules estromals perivasculars conferint-les una regulació circadiana de la producció de CXCL12 i la conseqüent mobilització de les HSC⁵), els osteoclastes i els osteoblastes². Aquests últims, tot i que no

INTRODUCCIÓ

promouen directament el manteniment de les HSC, sí que promouen el manteniment i la diferenciació de certs progenitors limfoides B⁶.

Les HSC tenen la capacitat d'autorenovació, expansió i diferenciació. La pèrdua d'una o varies d'aquestes capacitats donarà lloc a la formació de la cèl·lula pluripotent hematopoètica que a la seva vegada originarà els progenitors hematopoètics específics de línia cel·lular (Figura 1)⁴. Què determina la diferenciació de les HSC cap als diferents tipus cel·lulars és una qüestió controvertida. S'ha observat que factors extrínsecs com citoquines, interleuquines, o altres estímuls instrueixen les HSC o altres progenitors cap a la diferenciació i maduració⁷; a més a més també s'hi han observat involucrats factors intrínsecs, com per exemple, diferents factors de transcripció⁸.

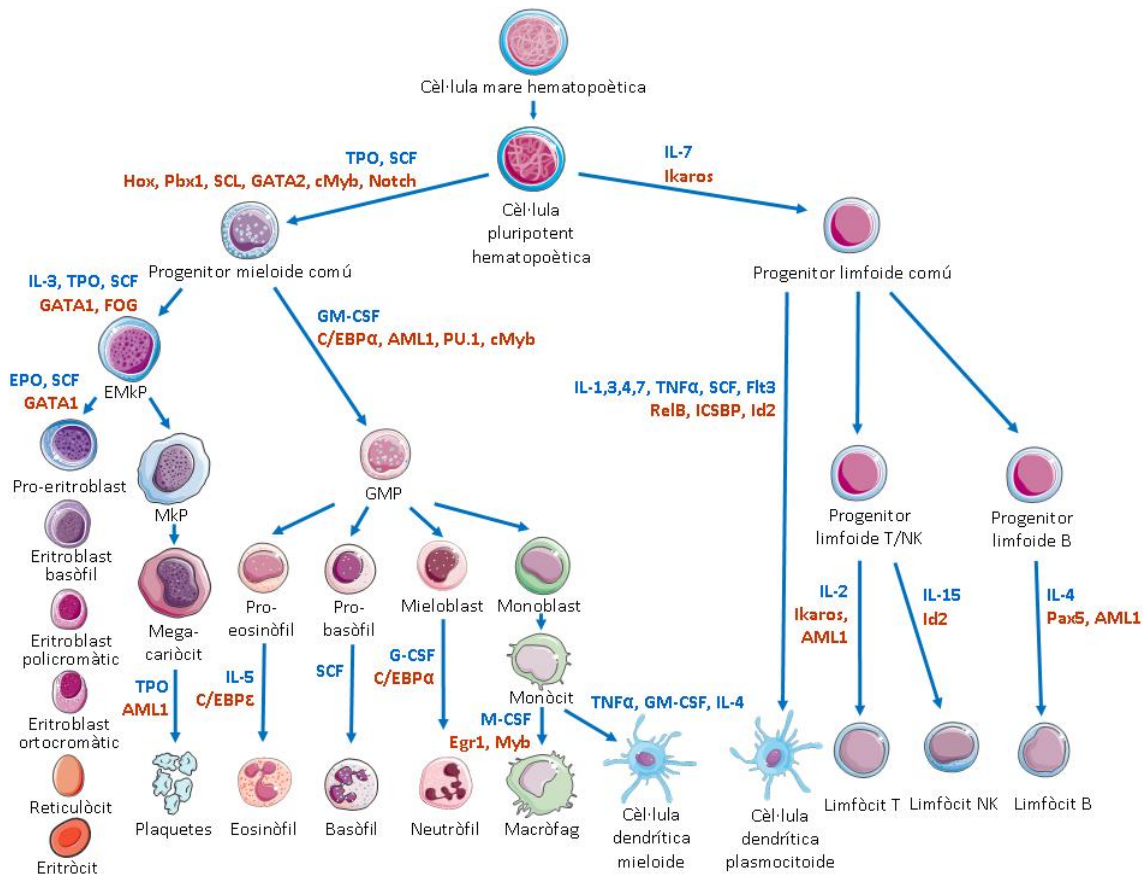


Figura 1 | Hematopoesi. Maduració i diferenciació de la cèl·lula mare hematopoètica als diferents estadis de la progènie mioide i limfoide. En blau, els diferents factors de creixement responsables de la supervivència i proliferació a cada estadi del desenvolupament hematopoètic. En vermell, els corresponents factors de transcripció. EMkP, *erithroid/megakaryocytic progenitor*; GMP, *granulocyte/monocyte progenitor*; MkP, *megakaryocytic progenitor*.

1.2. Del progenitor hematopoietic pluripotencial al limfòcit B

immadur

La limfopoesi de cèl·lules B genera un repertori divers de limfòcits B perifèrics que acabarà donant lloc a cèl·lules productores d'anticossos, les quals estaran implicades en la protecció a patògens però romandran alhora tolerants als teixits propis⁹. La distinció dels diferents estadis del desenvolupament dels limfòcits B es basa en diverses i complementàries característiques (Taula 1): marcadors de superfície, l'estat de reordenament dels gens de les immunoglobulines (Ig), la capacitat de certes fraccions cel·lulars de diferenciar-se a altres cèl·lules, i més recentment, certs factors de transcripció s'han vist implicats en el desenvolupament del limfòcit B¹⁰. D'entre aquests, el procés més important de la limfopoesi B és el reordenament de DNA seqüencial dels loci de les cadenes pesades i lleugeres de les immunoglobulines (Ig μ , IgK i Ig λ , respectivament), la seva expressió i l'assemblatge en el receptor de la limfòcit B (BCR, de l'anglès *B cell receptor*).

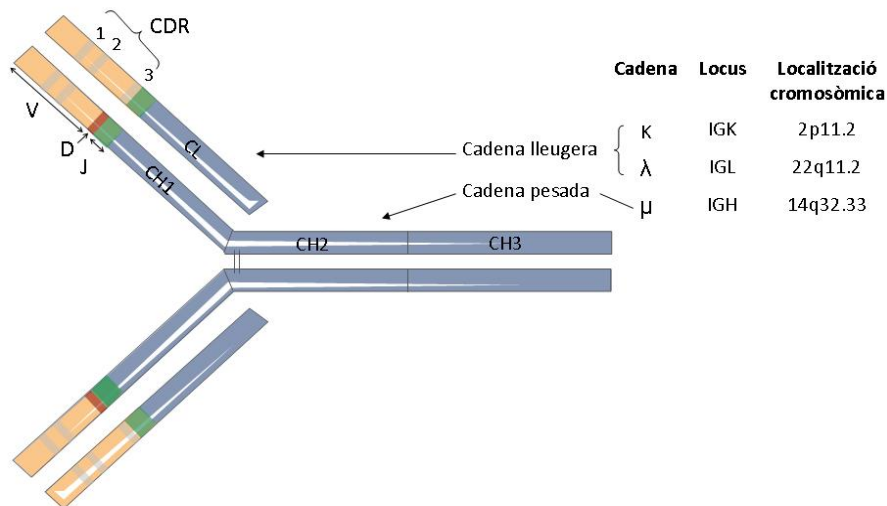


Figura 2 | Representació esquemàtica d'una immunoglobulina (Ig). Una Ig és un heterodímer format per 2 cadenes pesades i 2 cadenes lleugeres unides per ponts disulfur. Cada cadena té 2 parts: la regió N-terminal responsable del reconeixement antigènic, és la part variable (V), i la regió C-terminal, és la part constant (C), s'encarrega de diverses funcions efectores i és la determinant de l'isotip. El domini V de les cadenes pesades, o VH, està codificat per 3 tipus de gens anomenats V (*variability*), D (*diversity*) i J (*joining*), mentre el domini V de les cadenes lleugeres, o VL, només per gens V i J. Les regions CDR (*Complementarity determining regions*) són les que interaccionen directament amb els antígens. Adaptació de Ghia, P. *Ig gene analysis in CLL*, 2009.

INTRODUCCIÓ

Taula 1 Expressió dels marcadors de superfície en els diferents estadis de maduració del limfòcit B.

	HSC	CLP	Pre-pro-B	Pro-B	Pre-B I	Pre-B II	B immadur	B madur		
IgH	Germinal	DJ	VDJ	VDJ	VDJ	VDJ	VDJ	VDJ		
IgL	Germinal	Germinal	Germinal	Germinal	VJ	VJ	VJ	VJ		
Ig membrana	-	-	-	Ig μ i SLC (pre-BCR)	IgM	IgM	IgM, IgD	IgM, IgD		
CD34	—————									
CD43 (S7)	—————	—————								
CD117 (c-kit)	—————	—————								
TdT	—————	—————								
CD127 (IL-7R)	—————	—————								
CD24 (HSA)	—————	—————								
CD45R (B220)		—————	—————							
CD79		—————	—————							
CD19			—————	—————						
CD10		—————	—————							
CD38		—————	—————							
CD25 (IL-2R)				—————	—————					
BP-1				—————	—————					

HSC, *hematopoietic stem cell*; CLP, *common limfoid progenitor*; SLC, *surrogate light chain*; BCR, *B-cell receptor*; BP-1, *β -protein 1*. Adaptat de Hirose J, *Immunol Rev*, 2002¹¹

1.2.1. De les HSC al limfòcit pre-B

El limfòcit B al moll de l'os prové de la cèl·lula pluripotent hematopoètica que té els loci de les Igs en la configuració de línia germinal (Figura 3). La recombinació dels gens de les Igs és iniciada pel complex proteic RAG1 (de l'anglès, *recombination-activating gene 1*) –RAG2 a nivell del locus de la cadena pesada de les Igs (IGH) en el progenitor limfoide comú (CLP) o en el limfòcit pre-pro-B. Els reordenaments es produeixen inicialment del segment D_H al J_H seguits pels del segment V_H al DJ_H en els últims estadis del limfòcit pro-B. Si la seqüència resultat dels reordenaments dels segments V(D)J és productiva donarà lloc a la cadena Ig μ , expressada pels limfòcits pre-B formant part del complex pre-BCR¹².

A més a més, la proliferació i la supervivència dels progenitors dels limfòcits B és dependent del receptor de la interleuquina 7 (IL-7R). Mutacions en el gen que codifica per l'IL-7R bloqueja greument la limfopoesi de cèl·lules B, aquest defecte es manifesta tant a nivell del limfòcit pre-pro-B com amb progenitors més immadurs com el CLP¹³. La IL-7 és secretada per

les BMSC. La distribució dels progenitors dels limfòcits B en els diferents nínxols del moll de l'os varia segons l'estadi de desenvolupament. Mentre les HSC es localitzen prop dels osteoblasts, les cèl·lules endotelials i les BMSC secretores de CXCL12, els limfòcits pro-B estarien situats prop de les BMSC secretores de l'IL-7, la qual facilitaria i promouria la seva proliferació i desenvolupament¹⁴.

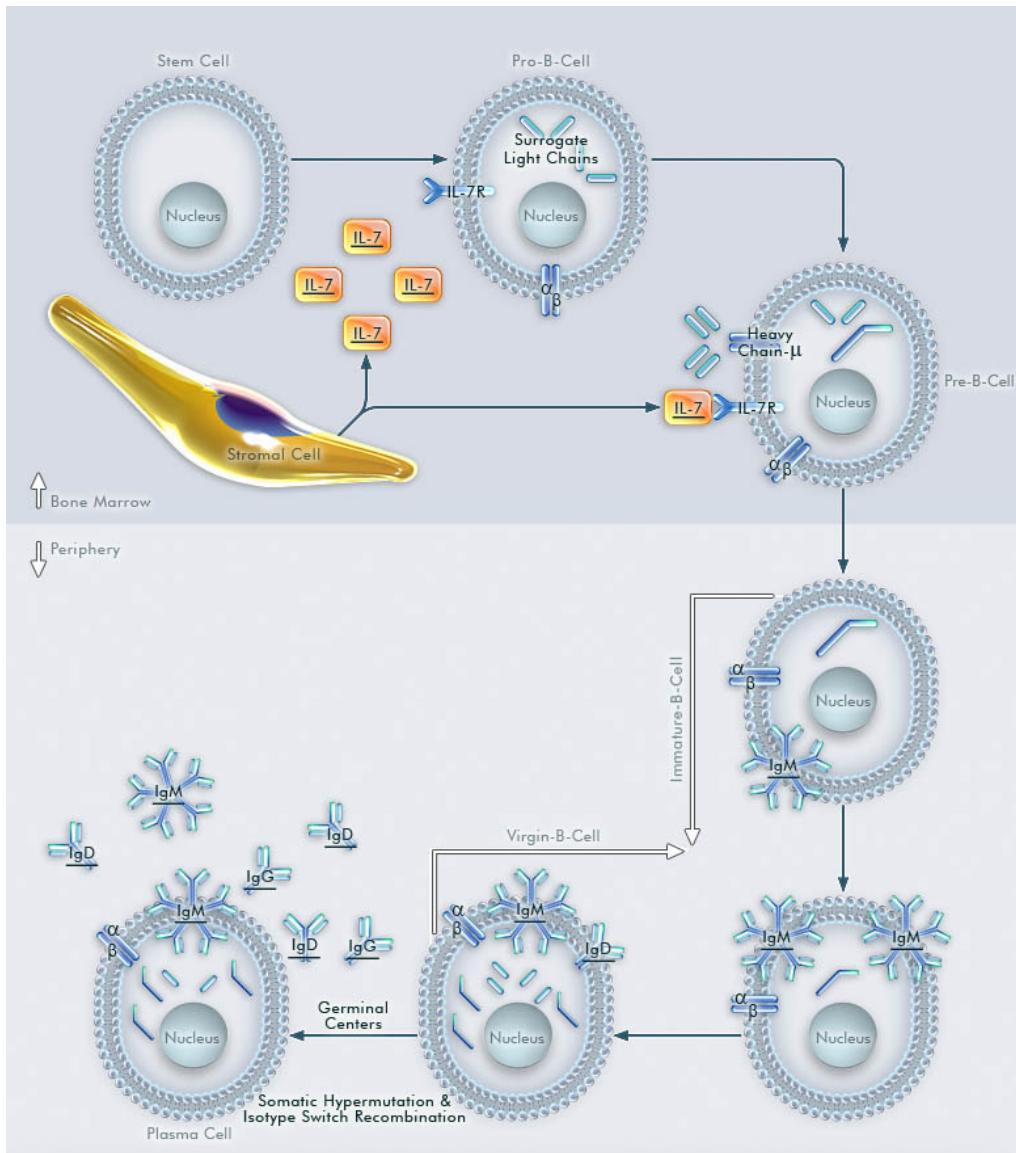


Figura 3 | El desenvolupament del limfòcit B. Imatge d'EBioscience.

1.2.2. Del limfòcit pre-B al limfòcit B immadur

Un cop completats satisfactòriament els reordenaments dels gens de la IgH el complex pre-BCR s'expressa a la superfície del limfòcit B. Aquest complex està format per la

INTRODUCCIÓ

cadena μ i una cadena lleugera “substitutiva” (SLC, de l’anglès *surrogate light chain*) associades a l’heterodímer de molècules senyalitzadores CD79A/CD79B. La senyalització derivada d’aquest pre-BCR conduirà a una inicial proliferació i expansió dels limfòcits pre-B i la posterior inhibició de nous reordenaments en la IgH, un procés anomenat “exclusió al·lèlica”. Això permet que cada limfòcit B produeixi una sola cadena d’IgH, aconseguint per tant, l’especificitat per a un únic antígen, en concordància amb la teoria de la selecció clonal, que diu que cada limfòcit expressa un únic receptor d’antígen. Després d’aquesta fase proliferativa, el cicle cel·lular dels limfòcits pre-B queda aturat en G1. L’expansió clonal *in vivo* dels limfòcits pre-B es limita a quatre o cinc divisions cel·lulars¹⁵. Posteriorment, la senyalització derivada del pre-BCR promouria un segon grup de reordenaments en el DNA, aquest cop sobre els loci de les IgL¹⁶.

Inicialment, es produeix un reordenament en la IGK, si aquest és productiu donarà lloc a una cadena lleugera kappa (IgK) que s’associarà a la IgH pre-formada per tal de constituir la IgM. A més a més, així com per la IGH, la producció d’IgK inhibirà reordenaments addicionals en el segon al·lel de la IGK (exclusió al·lèlica) i en el locus de la IGL (exclusió isotípica). Així novament s’assegura que només s’expressi un tipus de cadena lleugera¹⁷. Un dels possibles mecanismes que probablement contribuiria a l’exclusió al·lèlica seria una demetil·lació asimètrica dels al·lells de la IGK. Aquesta demetil·lació asimètrica facilitaria de forma preferencial el reordenament VJ_k en un dels 2 al·lells¹⁸.

En el cas que el reordenament en la IGK no sigui productiu, s’intenta un nou reordenament en l’altre al·lel, i si altre cop és insatisfactori, serà el locus IGL el que reordenarà els segments V-J. En el cas que tampoc fos productiu, la cèl·lula moriria a menys que fos rescatada per reordenaments secundaris¹⁷.

Aquesta nova IgM s’associa als coreceptors CD79A/CD79B per a formar el nou BCR a la superfície del limfòcit B immadur. Al moll de l’os, el limfòcit B immadur està sotmès a una selecció negativa que serà la base de la tolerància immunològica. El limfòcit B que expressi un BCR que reconegui un autoantígen amb alta afinitat, entrarà en apoptosi. Només podran escapar-ne si es produeix un canvi en la seva especificitat d’antígen, és a dir, un reordenament secundari en les IgL (en menor mesura en les IgH). Aquest procés s’anomena “edició del receptor”¹⁹. Només un 5% dels limfòcits B immadurs podran, finalment, abandonar el moll de l’os i migrar cap a la melsa, on esdevindran limfòcits B transicionals, i seguir la seva maduració²⁰.

1.3. Desenvolupament del limfòcit B madur perifèric

El limfòcit B transicional es distingeix del limfòcit B madur per una sèrie de marcadors de superfície i perquè expressen nivells baixos de RAG a nivell de l'mRNA (àcid ribonucleic missatger). Aquests limfòcits tenen una vida mitja molt curta i només el 10-30% d'aquests esdevindran limfòcits B madurs. La unió d'un antígen al BCR semblaria tenir un paper important en els mecanismes que governen la selecció dels limfòcits B transicionals a limfòcits B madurs²¹.

El limfòcit B madur naïf, que expressa les Ig de superfície IgM i IgD, pot ser activat per la unió d'un antígen al BCR i participar en la resposta immunològica. Un cop activat, rebrà senyals derivats de limfòcits T que el conduiran als fol·licles primaris de limfòcits B situats en els òrgans limfoides secundaris com són els ganglis limfàtics, la melsa, i els teixits limfoides associats a mucosa (MALT, de l'anglès *mucosa-associated lymphoid tissue*), on establiran els anomenats "Centres Germinals" (GC, de l'anglès *germinal centres*)²².

Inicialment, el limfòcit B migra cap a la zona rica en cèl·lules T, és aquí on el limfòcit B s'activarà completament com a resultat de la seva interacció amb els limfòcits T CD4⁺ i les cèl·lules presentadores d'antígen. Un dels receptors dels limfòcits B més important en la mediació de la interacció amb els limfòcits T és el CD40, membre de la família de receptors de factors de necrosi tumoral (TNF, de l'anglès *tumor-necrosis factor*) i expressat per tots els limfòcits B i el seu lligand CD154 o CD40L (de l'anglès *CD40 ligand*) expressat pels limfòcits T CD4⁺. Així, el limfòcit B començarà a proliferar ràpidament i desplaçarà els limfòcits naïf IgM⁺IgD⁺ a la perifèria, on formaran la zona del mantell. L'estructura del GC estarà formada llavors per una zona fosca que consistirà en una densa població de limfòcits B proliferants anomenats centroblastes, i una zona més clara i perifèrica que estarà formada per limfòcits B més petits no proliferants anomenats centròcits i que estaran envoltats per cèl·lules dendrítiques fol·liculars (que actuarien com a cèl·lules presentadores d'antígen), limfòcits T i macròfags²².

Els centroblasts diversifiquen els seus gens de les IgV mitjançant el procés anomenat "Hipermutació somàtica" (SHM, de l'anglès *somatic hypermutation*). Aquest procés es defineix com la introducció de mutacions puntuals, delecions o duplicacions en les regions V(D)J reordenades dels gens que codifiquen per a les IgV.

El centroblast llavors es diferencia a centròcit i es desplaça a la zona clara on el recentment modificat BCR, amb l'ajuda de limfòcits T i les cèl·lules dendrítiques fol·liculars, és seleccionat de nou per millorar la seva unió a antígen. Només aquells centròcits als quals

INTRODUCCIÓ

aquesta selecció resulti favorable portaran a terme l'anomenada "Commutació de l'isotip" (CSR, de l'anglès *class-switch recombination*): l'intercanvi dels gens de les IgH_c que donarà com a resultat un limfòcit B amb diferent classe d'Ig, d'IgM i IgD a IgG, IgA o IgE. Això significa que canviaran les seves funcions efectores sense canviar el seu domini d'unió a l'antígen²³.

Finalment, el centròcit es podrà diferenciar a limfòcit B de memòria o bé a cèl·lula plasmàtica. Els senyals que indueixen a diferenciar-se a una o altra cèl·lula són encara desconeguts. La inactivació del repressor transcripcional PAX5 (de l'anglès *paired-box protein 5*) sembla ser un dels primers passos cap a la diferenciació a cèl·lula plasmàtica. PAX5 inhibeix l'expressió del factor de transcripció XBP1 (de l'anglès *X-box binding protein 1*) necessari per a la diferenciació a cèl·lula plasmàtica. La posterior sobreexpressió de BLIMP1 (de l'anglès *B-lymphocyte-induced maturation protein 1*) i IRF4 (de l'anglès *interferon-regulatory factor 4*) donaria lloc a la característica secreció d'Ig per part d'aquestes cèl·lules²⁴. En canvi, la senyalització derivada del CD40 i una mantinguda expressió de PAX5 conduirien el centròcit a diferenciar-se a limfòcit B de memòria²⁵.

La limfòcit B de memòria és un tipus de limfòcit B que restarà quiescent fins al moment de tornar a entrar en contacte amb un antígen prèviament conegut. Aquesta estimulació antigènica provocarà una ràpida i forta proliferació, que acabarà generant una elevada progènie amb un mateix BCR d'alta afinitat per aquest antígen.

Per la seva banda, les cèl·lules plasmàtiques tenen un paper fonamental en la resposta immune humoral perquè davant l'estímul antigènic s'encarregaran de secretar grans quantitats d'anticossos. Poden residir tant en els teixits limfoides secundaris formant part d'una població de cèl·lules plasmàtiques amb vida mitja curta, com en el moll de l'os i mantenir-se en un anomenat "estat quiescent de llarga durada".

2. La Leucèmia Limfàtica Crònica

La Leucèmia limfàtica crònica (LLC) és el tipus de leucèmia més freqüent a Occident. Es caracteritza per la proliferació i acumulació de petits limfòcits B d'aparença madurs, a la sang perifèrica (SP), ganglis limfàtics, moll de l'os i altres territoris limfoides com la melsa²⁶.

A Europa, la incidència és de 4.92 casos per 100.000 habitants per any. És més freqüent en els homes amb una ratio home:dona d'aproximadament 1.7:1, les taxes d'incidència entre homes i dones són 6.20 i 3.15 casos per 100.000 habitants per any, respectivament²⁷. L'LLC és una malaltia diagnosticada principalment en la gent gran: la mediana d'edat al diagnòstic són 72 anys i només un 32% del pacients en tenen menys de 65, segons dades del "Surveillance, epidemiology and end results program 2006-2011". Hi ha diferències geogràfiques substancials en la seva incidència, amb major incidència a Europa i Amèrica del Nord respecte de països asiàtics com la Xina i el Japó, on s'estima que la seva incidència és aproximadament un 10% de la incidència observada en el món occidental²⁸.

2.1. Diagnòstic

2.1.1. Presentació clínica

Més del 25% dels pacients no presenten símptomes en el moment del diagnòstic. Generalment són diagnosticats pel descobriment d'una adenopatia perifèrica o una limfocitosi absoluta no explicada per altra causa. Per la resta, els símptomes que acostumen a tenir són astènia i debilitat. Aquests símptomes poden aparèixer fins i tot sense aparent afectació major de cap òrgan ni anèmia. Fins un 20% dels casos presenten símptomes B: definit per una pèrdua de pes no intencionada superior al 10% del pes en 6 mesos, febre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ durant més de 2 setmanes sense evidència d'infecció, sudoració nocturna, o astènia extrema (Eastern Cooperative Oncology Group performance status, ECOG PS ≥ 2 , estat general que l'incapacita per a treballar); no obstant, la febre és un símptoma molt poc freqüent i sempre s'hauria de descartar una probable complicació infecciosa²⁹. Aproximadament el 80% dels pacients presenten adenopaties en el moment del diagnòstic (més freqüentment en la regió cervical, supraclavicular o axil·lar); el 50% presenta esplenomegàlia lleu o moderada. Ocasionalment, això condiona un hiperesplenisme que contribueix a empitjorar l'anèmia i la trombocitopènia. De manera menys freqüent, els pacients poden presentar hepatomegàlia secundària a la infiltració hepàtica pels limfòcits B tumorals. La infiltració d'altres òrgans és

INTRODUCCIÓ

majoritàriament detectada postmortem perquè no sol ser simptomàtica. Algunes de les localitzacions on eventualment s'ha observat infiltració per limfòcits d'LLC són: el parènquima renal, pulmons, tracte gastro-intestinal i sistema nerviós central⁴.

2.1.2. Morfologia

En la major part dels casos el diagnòstic d'LLC s'estableix amb un hemograma, una extensió de SP i l'immunofenotip.

Per al diagnòstic d'LLC es requereix de la presència de ≥ 5000 limfòcits B clonals/ μL en SP durant com a mínim 3 mesos. La clonalitat d'aquests limfòcits s'ha de confirmar per citometria de flux amb l'observació de la restricció d'expressió de cadenes lleugeres kappa o lambda³⁰.

Les cèl·lules leucèmiques observades en l'extensió de SP són característicament limfòcits petits, madurs, amb citoplasma escàs i un nucli dens sense nuclèols i amb cromatina agregada parcialment. Aquestes cèl·lules es poden trobar envoltades d'altres limfòcits més grans i atípics, limfòcits clivellats o prolimfòcits els quals poden arribar a ser un 55% del total dels limfòcits (en aquest cas s'hauria de plantejar el diagnòstic diferencial amb la leucèmia prolimfocítica). Una altra característica són les ombres de Grumpecht: restes nuclears de les cèl·lules leucèmiques³¹.

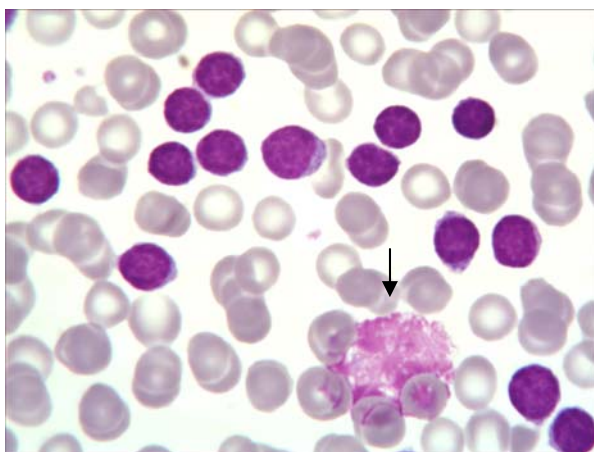


Figura 4 | Extensió de sang perifèrica d'un pacient amb LLC. Limfòcits petits, amb escàs citoplasma i cromatina agregada. També es pot observar una ombra de Grumpecht (fletxa). *Cortesia de Dra M Navarrete.*

L'afectació dels ganglis limfàtics segueix un patró nodular, format per unes zones centrals més clares de cèl·lules més grans que correspondrien als centres de proliferació (explicat amb més detall en el punt 2.3) envoltades per una zona perifèrica més fosca de

cèl·lules més petites. L'afectació estaria limitada a les zones interfol·liculars. L'activitat mitòtica és normalment baixa.

A la melsa, l'afectació de la polpa blanca sol ser predominant. També es poden observar els centres proliferatius tot i que de manera menys abundant.

L'afectació del moll de l'os pot ser nodular, intersticial i/o difusa. Els centres de proliferació també són menys abundants aquí que en els ganglis limfàtics³¹.

2.1.3. Immunofenotip

Les cèl·lules d'LLC coexpressen l'antigen de limfòcits T, CD5 i els antigens de limfòcits B, CD19, CD20 i CD23. Els nivells d'expressió de les Ig de superfície, de CD20 i de CD79b són característicament febles comparats amb els dels limfòcits B normals. El CD10 és negatiu. Cada clon de cèl·lules d'LLC presenta restricció d'expressió de les cadenes lleugeres kappa o lambda. En els teixits, es pot detectar expressió citoplasmàtica d'Ig i la ciclina D1 és negativa, de totes maneres, s'ha detectat ciclina D1 en algunes cèl·lules dels centres proliferatius. Alguns casos poden tenir un immunofenotip atípic sense expressió de CD5 o CD23, FMC7 o CD11c, forta expressió de les Ig o de CD79b³⁰.

2.2. Pronòstic

La supervivència mediana dels pacients amb LLC és d'aproximadament 10 anys, però el pronòstic individual és extremadament variable. Mentre alguns pacients tenen una elevada supervivència sense presentar símptomes relacionats amb la malaltia, en altres aquesta té un comportament agressiu i tenen una supervivència mitjana menor de 3 anys²⁶.

L'impredecible curs de la malaltia ha dirigit el desenvolupament de diversos sistemes d'estadiatge i de marcadors pronòstic. Els factors pronòstic són utilitzats per a entendre la biologia de la malaltia, per a l'estratificació del risc del pacient i per a predir la resposta a un fàrmac específic. Amb els anys, múltiples marcadors pronòstic biològics sofisticats han estat identificats; no obstant, l'estadiatge clínic (Rai i Binet) roman el més rellevant per predir l'evolució del pacient amb un nou diagnòstic d'LLC.

2.2.1. Sistemes d'estadiatge

El 1967 Dameshek va descriure l'LLC com una malaltia deguda a l'acumulació de limfòcits B immunològicament incompetents³². Uns anys més tard, el 1975, Rai ja va proposar el primer sistema d'estadiatge clínic³³, que va ser seguit el 1976 per un sistema d'estadiatge

INTRODUCCIÓ

francès presentat al congrès de la Société Française d'Hématologie a París. El 1981, Binet va presentar el seu propi sistema clínic per a una classificació pronòstica en el First International Workshop on CLL (IWCLL) a París³⁴. En aquell mateix any, a la segona reunió de l'IWCLL i gràcies a la informació recollida d'un estudi amb gran nombre de pacients (>900) diagnosticats d'LLC, van proposar un sistema d'estadiatge conjunt que és el que roman recomanat per les guies internacionals més importants en LLC³⁵.

El sistema d'estadiatge de Rai

El sistema de Rai (Taula 2) es basa en la premisa que en l'evolució de la malaltia hi ha una primera acumulació de cèl.lules neoplàsiques manifestat en un augment de la limfocitosi, aparició posterior d'adenopaties, esplenomegàlia i hepatomegàlia, i un reemplaçament final del moll de l'os amb el conseqüent desenvolupament d'anèmia i trombocitopènia³³.

Taula 2 Sistema d'estadiatge segons la classificació original de Rai³³

Estadi	Característiques clíniques
0	Limfocitosi*
I	Limfocitosi + adenopaties**
II	Limfocitosi + esplenomegàlia o hepatomegàlia (±adenopaties)
III	Limfocitosi + anèmia*** (±esplenomegàlia/hepatomegàlia ± adenopaties)
IV	Limfocitosi + plaquetopènia**** (±anèmia ±esplenomegàlia/hepatomegàlia ± adenopaties)

*Limfocitosi: Limfòcits B tumorals >15000/mm³ o >40% al MO. Segons la revisió de les guies per l'IWCLL al 2008, es considera quan limfòcits B tumorals >5000/mm³
**Tant les adenopaties com l'esplenomegàlia, segons exploració física
*** Anèmia: Hb<11g/dl
**** Plaquetopènia: Plaquetes<100x10⁹/L

El sistema de Binet

El sistema de Binet diferencia 3 grans subgrups segons la seva evolució clínic (Taula 3). Una de les diferències amb el sistema de Rai, és que aquest sistema té en compte el nombre d'àrees limfoides afectades i una altra és que considera anèmia quan l'hemoglobina és menor a 10g/dl.

Les 5 àrees limfoides considerades són:

- (1) Cap i coll, incloent l'anell de Waldeyer.
- (2) Aixelles. L'afectació de totes dues aixelles comptabilitza com una sola àrea.

(3) Inguinals, incloent la regió femoral superficial. Així com amb les aixelles, l'afectació de totes dues inguinals comptabilitza com una sola àrea.

(4) Esplenomegàlia palpable

(5) Hepatomegàlia palpable

Taula 3 Sistema d'estadiatge segons la classificació de Binet³⁴

Estadi	Característiques clíniques
A	<3 àrees limfoides afectades
B	3 àrees limfoides afectades
C	Anèmia o trombopènia (± limfadenopaties)

Actualment, en el moment del diagnòstic el 85% dels pacients estan en un estadi A, el 10% en estadi B, i el 5% restant en estadi C³⁶.

El sistema combinat de Rai i Binet

La iwCLL va recomanar el 1981 un nou sistema d'estadiatge integrat per ambdós mètodes (Taula 3)³⁵.

Taula 4 Sistema d'estadiatge combinat segons la iwCLL³⁵

Estadi	Binet (Rai)	Característiques clíniques
A	A(0), A(I), A(II)	<3 àrees limfoides afectades
B	B(I), B(II)	3 àrees limfoides afectades
C	C(III), C(IV)	Anèmia o trombopènia (± limfadenopaties)

Limitacions dels sistemes d'estadiatge clínic

L'estadiatge segons els mètodes de Rai i Binet es correlaciona amb la supervivència dels pacients; no obstant, dins de cada un dels estadis existeix una gran heterogeneïtat, limitant l'ús en solitari de l'estadiatge a l'hora de predir la supervivència. Especialment en estadis inicials es requereixen factors pronòstic addicionals. Els mètodes de Rai i Binet poden reflectir d'alguna manera l'evolució clínica de la malaltia, però moltes vegades el pacient es pot presentar amb esplenomegàlia però no presentar mai adenopaties o un increment en la limfocitosi; altres presentaran una elevada limfocitosi sense adenopaties o esplenomegàlia, i

INTRODUCCIÓ

també hi ha casos més semblants a limfomes, és a dir amb presència d'abundants adenopaties sense una elevada limfocitosi. Per tant, els criteris utilitzats per Rai i Binet no sempre es correlacionen amb la massa tumoral. A més a més, aquests sistemes tampoc distingeixen entre l'anèmia hemolítica autoimmune (AHAI) o la púrpura trombopènia idiopàtica (PTI) i la infiltració medul·lar causant d'anèmia o trombopènia, totes dues classificades per Binet com a estadi C o estadis III i IV per Rai, respectivament.

L'estadiatge es realitza per exploració física i resultats analítics, i per aquesta raó les guies internacionals no recomanen la tomografia computeritzada (TC) en el moment del diagnòstic. De totes maneres, en aquells pacients identificats d'alt risc de progressió, el TC aporta informació més acurada de la malaltia a nivell intrabdominal que no pas l'exploració física. Les adenopaties abdominals trobades per TC en el moment del diagnòstic en pacients amb estadi 0 de Rai, es correlaciona amb un menor temps a la progressió de la malaltia o al primer tractament³⁷.

2.2.2. Factors pronòstic

Donat que només amb els mètodes d'estadiatge clínics fins ara descrits no es pot predir de manera acurada la progressió de la malaltia, en els darrers anys han sorgit un gran nombre de factors que han mostrat rellevància pronòstica. Aquests factors inclouen tant característiques clíniques, com el temps de duplicació limfocitària (TDL), com biològiques (marcadors sèrics, l'estat mutacional de les immunoglobulines, l'expressió de ZAP-70 i CD38).

2.2.2.1. Temps de duplicació limfocitària

El TDL és un paràmetre molt senzill i útil que es calcula determinant el nombre de mesos fins a duplicar el recompte de limfòcits en SP³⁸, essent un factor predictor independent per a la supervivència lliure de malaltia (PFS, de l'anglès *progression-free survival*) i per a la supervivència global (OS, de l'anglès *overall survival*)³⁹. Per als pacients amb un estadi A de la malaltia segons Binet, la mediana de la PFS és de 20 mesos si el TDL és ≤ 12 mesos comparat amb els 72 mesos quan el TDL és > 12 mesos ($P=0.01$)³⁹. Un increment superior al 50% de la limfocitosi en 2 mesos, o un TDL inferior o igual a 6 mesos ha estat utilitzat com a criteri per a l'inici de tractament^{40,30}.

2.2.2.2. Marcadors sèrics

Lactat deshidrogenasa (LDH)

L'LDH està considerada un marcador de recanvi cel.lular i es troba freqüentment elevada en pacients amb desordres hematològics i altres neoplàsies. En els pacients amb LLC, uns nivells alts d'LDH s'associa amb una menor supervivència⁴¹ i amb altres factors pronòstic adversos com la del17p⁴², una elevada expressió de CD38 i de ZAP-70^{43,44}. Amb la introducció de la immunoquimioteràpia, uns nivells elevats d'LDH (≥ 2 cops per sobre dels nivells normals) mantenen la seva significància pronòstica independent⁴⁵.

β 2-microglobulina

La β 2-microglobulina és una proteïna de membrana associada a la cadena α del complex major d'histocompatibilitat de classe 1 (HLA-1). Nivells sèrics elevats de β 2-microglobulina es correlaciona amb l'estadi clínic, infiltració del moll de l'os i malaltia voluminosa⁴⁶. Altres estudis han demostrat el poder pronòstic d'ella mateixa⁴⁷ o en combinació amb altres factors pronòstic com el CD23⁴⁸. A més a més també s'associa amb l'expressió de CD38⁴³ i de ZAP-70⁴⁴.

Timidina quinasa (TK)

La TK és un enzim que intervé en la síntesi del DNA (de l'anglès, *deoxyribonucleic acid*) per tant, és considerada un marcador de proliferació cel.lular. Nivells sèrics elevats s'han associat a estadis avançats i a malaltia progressiva⁴⁹. Altres estudis confirmen el valor pronòstic en pacients amb LLC⁵⁰ i demostren el seu valor predictiu tenint en compte l'estat mutacional de l'IgVH⁵¹.

Altres marcadors sèrics

Els nivells de diverses proteïnes de membrana que poden trobar-se al plasma es poden utilitzar com a marcadors tumorals. Un exemple és el CD23 circulant, que en aquells pacients en estadi A té un valor predictiu de progressió de la malaltia⁵². També s'ha correlacionat amb una infiltració difusa del moll de l'os, menor TDL, nivells elevats de TK⁵³, de CD38⁵⁴ i ZAP-70 al moll de l'os⁵⁵.

La quantitat de CD20 circulant en el plasma dels pacients amb LLC s'ha correlacionat amb l'estadi clínic, els nivells de β 2-microglobulina, l'expressió de CD38 i l'OS⁵⁶. Tot i que el valor pronòstic encara no ha estat confirmat per altres grups, aquestes troballes poden ser importants perquè s'ha demostrat que el CD20 circulant podria interferir en la unió del rituximab a les cèl.lules d'LLC i per tant, podria tenir impacte en l'efectivitat dels agents anti-CD20⁵⁶.

INTRODUCCIÓ

El CD44 soluble s'ha correlacionat amb l'estadi clínic, els nivells de β 2-microglobulina, i l'LDH^{57,58}, a més a més es pot utilitzar per a refinar l'estratificació pronòstica en el subgrup de pacients de baix risc⁵⁹.

2.2.2.3. Estat mutacional de les immunoglobulines

Un dels paràmetres biològics més importants a l'hora d'avaluar el pronòstic dels malalts amb LLC és l'anàlisi de l'estat mutacional del segment V de la cadena pesada de les Igs (a partir d'ara referit com a *IGHV*). La resposta del limfòcit B a l'estimulació antigènica està mediada pel BCR tant en cèl·lules B normals com tumorals. Com s'ha explicat anteriorment, cada limfòcit B expressa un BCR diferent gràcies a les recombinacions dels gens dels segments V, D i J de la *IgH*, i V i J de les *IgL*. A més a més, la diversitat combinatòria dels diferents segments del BCR es veu incrementada amb la introducció de mutacions somàtiques a través del procés d'hipermutació somàtica²².

En funció de l'estat mutacional dels gens de les *IGHV* es descriuen dues formes clíniques d'LLC amb pronòstics marcadament diferents: la forma no mutada (a partir d'ara: U-CLL, de l'anglès *unmutated-chronic lymphocytic leukemia*) quan la clona d'LLC presenta una homologia mínima del 98% en els gens de les *IGHV* en relació amb la seqüència germinal, i la forma mutada (M-CLL, de l'anglès *mutated-chronic lymphocytic leukemia*). Utilitzem el terme *IGHV* perquè normalment només s'analitza l'estat mutacional de les *IGH* tot i que els gens de la regió variable de les *IgL* també estan mutats en els casos amb *IGHV*-mutades⁶⁰). Els pacients amb U-CLL tenen un curs clínic més agressiu i una evolució clarament desfavorable en comparació amb els pacients amb mutacions en les *IGHV*^{61,62}.

Tot i que els fenòmens biològics que condicionen aquesta diversitat clínica entre els pacients U-CLL i M-CLL encara no es coneix amb exactitud, s'han observat determinades diferències biològiques entre aquests subgrups: presenten diferents nivells d'expressió de les proteïnes ZAP-70 (de l'anglès, *zeta-associated protein 70*)^{63,64} i CD38⁶⁵, diferent activitat de les vies de senyalització derivades del BCR⁶⁶, diferent longitud dels telòmers⁶⁷ i també s'ha relacionat amb alteracions citogenètiques: mentre que l'absència de mutacions en les *IGHV* s'ha associat a trisomia 12, la seva presència s'ha associat a alteracions relacionades amb el cromosoma 13q14⁶⁸.

2.2.2.4. L'expressió de ZAP-70

La proteïna ZAP-70 (de l'anglès, *70kDa ζ-chain-associated protein*) és un membre de la família de tirosines quinases Syk-ZAP-70, que normalment s'expressa en els limfòcits T i cèl·lules natural killer (NK), on té un paper fonamental en l'inici de la senyalització derivada del TCR (de l'anglès *T cell receptor*). Es troba absent en limfòcits B madurs no tumorals, on la senyalització derivada del BCR utilitza la proteïna quinasa homòloga Syk. L'expressió de ZAP-70 en cèl·lules d'LLC es va detectar arrel de l'anàlisi dels perfils d'expressió gènica segons l'estat mutacional de les Igs, concretament, es va observar com una elevada expressió de ZAP-70 s'associava a una absència de mutacions en les *IGHV*⁶³. De manera consistent, l'expressió de la proteïna ZAP-70 mesurada per citometria de flux s'ha demostrat el millor marcador substitut de l'estat mutacional de les Igs⁶⁴. A més a més, utilitzant com a punt de tall el 20% de cèl·lules d'LLC, una elevada expressió de ZAP-70 es relaciona amb major probabilitat de progressió i pitjor supervivència, i es manté com a marcador pronòstic independent^{64,69}. L'expressió de ZAP-70 també es correlaciona amb altres marcadors pronòstic: amb una elevada expressió de CD38, nivells elevats de TK, estadi clínic avançat, nivells elevats d'LDH i amb el grau d'infiltració del moll de l'os⁷⁰. Els mecanismes biològics que explicarien aquest impacte pronòstic negatiu de l'expressió de ZAP-70 en l'LLC s'explicaran amb més detall més endavant.

2.2.2.5. L'expressió de CD38

El CD38 és una glicoproteïna de membrana tipus II de 45kDa que inicialment es va descriure com un antígen d'activació cel·lular, l'expressió del qual coincidia amb diferents estadis de diferenciació tant de limfòcits B com T. Actua simultàniament com a enzim de superfície cel·lular i com a receptor. Com a ectoenzim, el CD38 sintetitza ADP (de l'anglès, *adenosine diphosphate*) i NAADP (de l'anglès, *nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate*), components clau en la regulació dels nivells intracitoplasmàtics del calci. La unió del CD38 amb el seu lligand CD31 o amb anticossos agonistes específics, promou senyals d'activació i de diferenciació en limfòcits T, B i NK⁷¹. L'expressió de CD38 en els pacients amb LLC és heterogènia i pot variar durant l'evolució de la malaltia. Utilitzant com a punt de tall el 30% de cèl·lules d'LLC, es va observar com nivells elevats d'expressió de CD38 tenien un impacte pronòstic negatiu⁷². L'expressió de CD38 també va ser proposada com a marcador substitut per a l'estat mutacional de les *IGHV*⁶¹ però els resultats en estudis subseqüents no acaben sent prou concloents, tot i demostrar valor pronòstic independent^{73,74}.

2.2.3. Alteracions citogenètiques

A diferència d'altres neoplàsies hematològiques o tumors sòlids, l'LLC es caracteritza per un genoma relativament estable. L'anomalia cromosòmica més freqüent és la pèrdua de la regió 13q14.3, amb una prevalença del 40-60%^{42,75}, posteriorment la deleció 11q23 que es troba en el 5-20% dels pacients^{42,76,77}, la trisomia del cromosoma 12 amb una prevalença semblant, del 16%⁴² i la del17p, que s'ha descrit en el 3-8% dels pacients en el moment del diagnòstic^{42,78}. A més a més, aquestes alteracions cromosòmiques poden ser utilitzades com a factors pronòstic, és per això que rutinàriament es realitzen estudis citogenètics. La FISH (de l'anglès, *fluorescence in situ hybridization*) té major resolució que la citogenètica estàndard i a diferència d'aquesta, permet la detecció d'alteracions cromosòmiques independentment de la ràtio de cèl·lules en divisió. Amb aquesta tècnica es poden identificar alteracions en aproximadament un 80% dels pacients segons les sèries^{42,75,79,76}.

Deleció 13q14.3

La deleció de la regió 13q14.3, que es troba en més del 50% dels pacients diagnosticats d'LLC, és l'alteració citogenètica més freqüent i s'ha associat històricament amb bon pronòstic⁴². Darrerament, diversos estudis han revelat com alguns dels gens que es troben en aquesta regió podrien contribuir, en part, a la patogènesi de la malaltia. Els microRNAs miR-15a i miR16-1 es localitzen a la regió MDR (de l'anglès, *minimal deleted region*), i funcionarien com a supressors tumorals en l'LLC en col·laboració amb el gen *DLEU2* (de l'anglès, *deleted in lymphocytic leukemia*)⁸⁰. Malgrat presentar una elevada heterogeneïtat clínica i biològica, estudis recents que integren resultats citogenètics i moleculars continuen considerant aquells pacients amb deleció 13q aïllada en el grup de molt baix risc (Supervivència global als 10 anys del 69.3%)⁸¹.

Deleció 11q23

La deleció de la regió 11q23 es detecta en un 5-20% dels pacients amb LLC⁴² i s'ha associat a malaltia progressiva, menor TTFT (de l'anglès, *time to first treatment*), menor durada de les remissions i menor OS després de la primera línia de tractament⁸². Els pacients amb del11q es caracteritzen per presentar múltiples i grans adenopaties i s'ha associat amb l'absència de mutacions en les *IGHV*.

La regió MDR inclou les bandes 11q22.3-q23.1 incloent per tant, en gran part dels casos, el gen *ATM* (de l'anglès *ataxia telangiectasia mutated*). Les mutacions en aquest gen s'han trobat en un 8-30% dels pacients 11q-⁸³. Un altre gen implicat en aquest tipus d'anomalia cromosòmica és *BIRC3* (de l'anglès, *baculoviral IAP repeat containing 3*). No obstant, un estudi recent mostra com són les mutacions en el gen ATM, més que les mutacions o delecions del

gen *BIRC3*, les que tenen impacte en la OS o la PFS dels pacients amb deleció 11q tractats amb primera línia de tractament⁸⁴.

Trisomia 12

La trisomia del cromosoma 12 és la tercera alteració cromosòmica més freqüent en malalts amb LLC (10-20% dels casos) i sovint apareix com a una única alteració citogenètica (40-60% dels casos amb trisomia 12). A més a més, es pot associar a altres alteracions cromosòmiques com són les trisomies 18 i 19, delecions d'11q, 13q, 14q, o 17p i translocacions que inclouen la IGH⁴². Tot i que en el model proposat per Döhner *et al* l'any 2000, mitjançant el qual establia 5 categories de risc d'acord amb les alteracions cromosòmiques detectades, va ser considerada un marcador de risc intermedi (OS als 10 anys del 30% aproximadament), estudis recents tendeixen a incloure-la en grups de baix risc⁸¹. De totes maneres, això també es correspon a una entitat clínicament heterogènia.

Deleció 17p13

La deleció 17p13 es troba en un 3-8% de pacients amb LLC en el moment del diagnòstic. No obstant, es pot arribar a trobar en un 30% de pacients tractats amb quimioteràpia. La presència d'aquesta alteració citogenètica s'associa a una pitjor resposta al tractament quimioteràpic i supervivència, essent el marcador de pitjor pronòstic⁴². Estudis recents mostren com existeix una heterogeneïtat clínica en els pacients 17p- segons el moment d'aparèixer aquesta alteració durant el seu seguiment: com un esdeveniment "de novo" o més freqüentment, com a una alteració secundària. Els primers tindrien una mediana de supervivència més llarga (4-5 anys) mentre que aquells que adquireixen la deleció durant una evolució clonal, la seva supervivència quedaria disminuïda notablement (1-1.5 anys)⁷⁸. En un principi, el punt de tall del percentatge de nuclis amb del17p per tal de considerar un pacient portador de la del17p es va establir en el 3%⁸⁵, però més tard va ser incrementat fins al 25%⁸⁶. No obstant, s'ha demostrat recentment que la mida de la clona té impacte negatiu en la OS i en la resposta al tractament, no només a diferents punts de tall sinó com a variable contínua⁸⁷.

L'extensió de la deleció 17p13 normalment conté gairebé tot el braç curt del cromosoma 17 i està invariablement associada a la pèrdua del gen supressor de tumors *TP53* (que codifica per la proteïna p53). La pèrdua d'aquest gen explicaria el mecanisme molecular que confereix la mala resposta als agents alquilants i als anàlegs de purines. S'han detectat en aproximadament el 75% dels casos amb del17p mutacions en el gen *TP53* de l'al·lel no deleccionat. En canvi, mutacions de *TP53* sense del17p només s'observen en un 4.5% de pacients. La PFS i OS per als pacients amb del17p i per als pacients amb mutació de *TP53* en

INTRODUCCIÓ

absència de del17p, són similars (19.2 mesos vs. 23.3 mesos, 19.2 mesos vs. 30.2 mesos, respectivament). Per tant, les mutacions de *TP53* confereixen mal pronòstic, independentment de la presència de del17p⁸⁸.

Altres alteracions cromosòmiques

Arran del desenvolupament de la Hibridació Genòmica Comparada (CGH, de l'anglès *comparative genomic hybridization*) la qual permet, amb només una hibridació, un escanejat d'alta resolució de tot el genoma per detectar alteracions en el nombre de còpies de DNA i dels arrays d'SNP (de l'anglès, *single nucleotide polymorphism*) d'alta resolució, s'han pogut detectar noves alteracions cromosòmiques associades a l'LLC.

Entre aquestes, trobem la deleció del cromosoma 6q, que es troba aproximadament en un 6% dels pacients. En general, està considerada de risc intermedi perquè s'associa a major limfocitosi amb morfologia atípica, esplenomegàlia i elevada expressió de CD38. No s'ha trobat cap associació amb l'estat mutacional de les *IGHV*.⁸⁹

Altres alteracions descrites amb menor freqüència són la trisomia 3, 8, 18 o 19. Tot i que les translocacions balancejades són rares en l'LLC, les translocacions que inclouen els gens de les Igs són les més freqüents, observant-se en menys del 5% dels pacients, amb els gens *BCL2*, *BCL3*, *BCL11A* i *c-MYC*. Generalment, tenen un impacte pronòstic negatiu pel que fa a la resposta al tractament i a la supervivència.⁸⁹

2.2.4. Mutacions puntuals

Les tècniques de seqüenciació de nova generació (NGS, de l'anglès *next-generation sequencing*) han aportat un coneixement més ampli de la complexitat genètica i l'heterogeneïtat de l'LLC. Com a alternativa a la seqüenciació massiva del genoma sencer, la selectiva restricció de les lectures a les regions codificants mitjançant l'anomenada WES (de l'anglès, *whole-exome sequencing*) ha reduït dràsticament els costos de la seqüenciació per mostra. A més a més la WES ha facilitat la seqüenciació d'extenses cohorts de malalts el que, al seu torn, ha permès descriure associacions entre les alteracions genètiques i les característiques clíniques⁹⁰.

En LLC, aquests estudis han corroborat alteracions ja conegudes com són les mutacions en *TP53* i *ATM*, però de forma molt important han identificat canvis somàtics prèviament desconeguts. Aquestes alteracions somàtiques són presents en components crítics en diverses vies cel·lulars que inclouen reparació del DNA i control del cicle cel·lular (*POT1* i *BIRC3*), processament de l'mRNA (*XPO1* i *SF3B1*), senyalització de NOTCH (*NOTCH1*), vies inflammatòries (*MYD88*) i modificació de la cromatina (*CHD2*)^{91,92,93}.

NOTCH1

NOTCH1 és una proteïna transmembrana clau de la via de senyalització de Notch. El gen *NOTCH1* es troba en el cromosoma 9q34.3, la delecció de 2 parells de bases en el domini C-terminal del domini PEST (domini peptídic ric en prolina, àcid glutàmic, serina i treonina) dóna major estabilitat a la proteïna el que condueix a un canvi en els patrons d'expressió dels seus gens diana. Aquests canvis acaben provocant una activació de la via de senyalització, augment de la supervivència cel·lular i resistència a estímuls proapoptòtics⁹⁴. Mutacions en *NOTCH1* ja havien estat identificades anteriorment en pacients amb leucèmia limfoblàstica aguda T. En LLC, la senyalització derivada de Notch està implicada en la supervivència i la resistència a l'apoptosi de la cèl·lula d'LLC degut a la seva activació constitutiva. Aproximadament un 10% dels pacients presenten mutacions de *NOTCH1* en el moment del diagnòstic. Aquest percentatge augmenta en els casos de malaltia avançada i síndrome de Richter. S'ha observat una associació amb la trisomia 12, mutacions en *TP53* i *XPO1*, l'absència de mutacions de les *IGHV* i supervivència global significativament més curta. Tot i que en un inici el seu impacte pronòstic havia estat considerat independent a l'estat mutacional de les *IGHV*, estudis recents no ho han pogut confirmar^{91,95,96}.

SF3B1

SF3B1, localitzat en el cromosoma 2q33.1, codifica per la subunitat del centre catalític del complex de l'spliceosoma. Les seves mutacions es poden localitzar al llarg dels 900 parells de base de la regió C-terminal provocant una disfunció en els mecanismes d'splicing de l'RNA⁹³. Aquestes mutacions es troben en, aproximadament, un 10% dels pacients amb LLC en el moment del diagnòstic i en un 17% en els casos refractaris al tractament amb fludarabina⁹⁷. S'associen al sexe masculí, estadi clínic avançat, U-CLL i del11q. Les mutacions a nivell de *SF3B1* així com *TP53* tenen un impacte pronòstic negatiu, fins i tot en les U-CLL⁹⁶. Lesions en *SF3B1* sembla que són mútuament exclusives amb les mutacions de *MYD88*, *NOTCH1* i *TP53*⁹³.

BIRC3

BIRC3 es troba localitzat en el cromosoma 11q22. Mutacions en *BIRC3* tenen com a conseqüència una activació constitutiva de la via NF-κB (de l'anglès, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) donat que la proteïna codificada inhibeix aquesta senyalització. Recentment, s'han detectat mutacions en el gen *BIRC3* en el 2.5% dels pacients en el moment del diagnòstic i en el 24% en aquells pacients refractaris al tractament amb fludarabina⁹⁸. S'associen a estadi clínic avançat, U-CLL i, com hem comentat anteriorment, a del11q. També s'ha descrit una associació negativa amb els casos amb mutació de *TP53*, *NOTCH1* i *SF3B1*⁹⁶.

INTRODUCCIÓ

MYD88

Tot i que de forma menys freqüent (2% aproximadament), les mutacions en el gen *MYD88* també han estat detectades en pacients amb LLC gairebé exclusivament en la posició L265P que es troba localitzada en el domini d'unió al receptor d'IL-1-TLR (de l'anglès, *Toll-like receptors*). La proteïna codificada juga un paper clau en la senyalització derivada d'aquests receptors que participen de forma important en els mecanismes de la resposta immunològica. Cal destacar que aquesta mutació sembla trobar-se selectivament en neoplàsies de limfòcit B, predominantment en macroglobulinèmia de Waldenström i limfoma difús de cèl·lules grans⁹⁹. En l'LLC s'associen a factors biològics de pronòstic favorable, com són la presència de mutacions de les *IGHV*, una baixa expressió de ZAP-70 i CD38 i la deleció aïllada de 13q i també s'ha observat una associació a una millor OS tot i que sense valor pronòstic independent en l'estudi multivariant^{100,91}.

Evolució clonal

Estudis genòmics recents han evidenciat heterogeneïtat genètica entre mostres tumorals d'un mateix individu, és a dir poblacions cel·lulars intratumorals amb diferents alteracions genètiques. A partir de l'evidència d'aquestes subclones tumorals s'ha suggerit que els tumors probablement es desenvoluparien a través d'un procés de competició entre les diverses subclones de cèl·lules tumorals genèticament diferents. L'evolució clonal seria el resultat d'aquesta competició entre les diferents subclones i s'ha demostrat com és una característica clau de la progressió i recaiguda tumoral.¹⁰¹

En aquest sentit, en l'LLC hi ha pocs estudis que mostrin la freqüència, identitat i l'evolució de les alteracions genètiques subclonals i el seu impacte en el curs clínic. Recentment, Landau DA, et al¹⁰² van estudiar la heterogeneïtat intratumoral a l'LLC mitjançant la seqüenciació de l'exoma. Els resultats de l'estudi indiquen que la presència de determinades mutacions, inclús en una petita fracció de la població tumoral, prediuen un menor temps a la progressió després del tractament. A més a més, suggereixen que mutacions en determinats gens com *SF3B1* o *TP53* estarien presents a nivell subclonal al diagnòstic i el tractament quimioteràpic afavoriria la seva expansió durant el curs de la malaltia. D'altra banda, mutacions a nivell de *MYD88*, la trisomia 12 i la del13q es trobarien de forma preferentment clonal, el que suggereix que es tractin d'alteracions inicials en el curs de la malaltia. Amb això van identificar mutacions clonals o "driver mutations" i mutacions subclonals, que correspondrien, respectivament, a events primaris o secundaris en l'evolució de la malaltia.

Taula 5 Principals factors pronòstic

Categoria	Marcadors relacionats amb el pacient	Marcadors relacionats amb la malaltia		
Baix risc	Edat ≤ 60 anys	$\beta_2m \leq 3.5\text{mg/L}$	FISH normal o del13q	CD38 ≤ 30%
	ECOG 0	Estadi (Rai) 0-1	M-CLL	ZAP-70 ≤ 20%
	Dona	TK ≤ 10 U/L		
Alt risc	Edat ≥ 60 anys	$\beta_2m > 3.5\text{mg/L}$	del11q, del17p	CD38 > 30%
	ECOG > 0	Estadi (Rai) 2-4	U-CLL	ZAP-70 > 20%
	Home	TK > 10 U/L	Mutacions en <i>ATM</i> , <i>TP53</i> , <i>SF3B1</i> , <i>NOTCH1</i> i/o <i>BIRC</i>	

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group, β_2m : β_2 microglobulina, TK: timidina quinasa, M-CLL: de l'anglès mutated-chronic lymphocytic leukemia, U-CLL: de l'anglès unmutated-chronic lymphocytic leukemia. *Adaptat de Ciccone, M. Cancer Cell, 2014*¹⁰³.

2.3. Patogènesi

2.3.1. Origen cel·lular

L'origen cel·lular de l'LLC és un tema, encara ara, en debat. Les cèl·lules d'LLC es caracteritzen per l'expressió de CD23, CD19 i nivells baixos de CD20, CD79b i Igs de superfície, un patró d'expressió que no es troba en cap població de limfòcits B normal coneguda³¹. Inicialment, es pensava que les cèl·lules d'LLC derivaven de limfòcits B CD5⁺¹⁰⁴, però més endavant aquesta hipòtesi va ser qüestionada quan es va demostrar que aproximadament la meitat dels casos d'LLC presentaven mutacions en els gens de les IGHV⁶⁰, mentre que els limfòcits B CD5⁺ normals rarament en presenten¹⁰⁵.

Donat que es pensava que l'SHM estava restringida als limfòcits B que han passat per la reacció del GC, es va proposar que aquelles cèl·lules d'LLC que presentaven mutacions en els gens de les IGHV derivaven de limfòcits B postgerminals, és a dir, cèl·lules B de memòria post-GC (Figura 5). Diverses evidències recolzarien aquesta hipòtesi: la primera, aproximadament un terç dels casos d'LLC amb mutacions en els gens de les IGHV presenten alhora mutacions en el gen *BCL6* (de l'anglès, *B cell lymphoma 6*) que és un dels gens més importants implicats en la diferenciació dels limfòcits B en el GC¹⁰⁶. La freqüència dels casos M-CLL amb mutacions en *BCL6* és aproximadament la mateixa que en els limfòcits B post-GC (30%)¹⁰⁶. La segona, un subgrup d'LLC expressen IgG, indicant que aquests casos haurien patit commutació de l'isotip, per tant derivarien de limfòcits B post-GC¹⁰⁷. La tercera, s'ha demostrat clonalitat relacionada

INTRODUCCIÓ

entre els limfòcits B $IgM^+IgD^+CD27^+$ i els limfòcits B de memòria que han patit commutació de l'isotip, aquest fet demostraria que com a mínim una part dels casos M-CLL IgM^+IgD^+ derivarien de limfòcits B post-GC¹⁰⁸.

Pel que fa als casos U-CLL, hi ha evidències que demostren l'existència de limfòcits B de memòria sense mutacions en les *IGHV*. En aquest sentit, molts dels casos d'LLC sense mutacions en els gens de les *IGHV* expressen anticossos poli- i autoreactius i mostren un fenotip activat. Això potenciarà la hipòtesi que els casos U-CLL derivarien de limfòcits B que haurien estat en contacte amb antígens i adquiririen les característiques de limfòcits B de memòria sense haver passat la reacció del GC¹⁰⁹. El limfòcit B de la zona marginal esplènica també s'ha proposat com a homòleg de la cèl·lula d'LLC tant en els casos amb presència com amb absència de mutacions en els gens de les *IGHV* (Figura 5) perquè s'ha vist que comparteixen algunes característiques funcionals: primer, ambdues poden respondre a l'estimulació antigènica de forma depenent i independent dels limfòcits T; segon, poden expressar el BCR amb o sense mutacions en els gens de les *IGHV* i aquest pot ser tant auto-com polireactiu; i per últim, en alguns casos són capaços de proveir de protecció innata en front microorganismes¹¹⁰.

Un estudi recent va comparar el perfil d'expressió gènica de les cèl·lules d'LLC amb diferents subpoblacions de limfòcits B (naïf, de la zona marginal esplènica, $CD5^+$ madurs amb commutació de l'isotip i limfòcits B de memòria IgM^+) i van observar com tant la M-CLL com la U-CLL compartien uns perfils d'expressió gènica semblants amb els limfòcits B $CD5^+$ madurs. A més a més, van identificar dues subpoblacions de limfòcits B $CD5^+$ madurs, uns que expressaven CD27 ($CD5^+/CD27^+$) i amb mutacions en els gens de les *IGHV* i uns altres $CD5^+/CD27^-$ i sense mutacions en els gens de les *IGHV*. Aquests post-GC i pre-GC limfòcits B representarien les cèl·lules homòlogues fisiològiques de les M-CLL i U-CLL, respectivament¹¹¹.

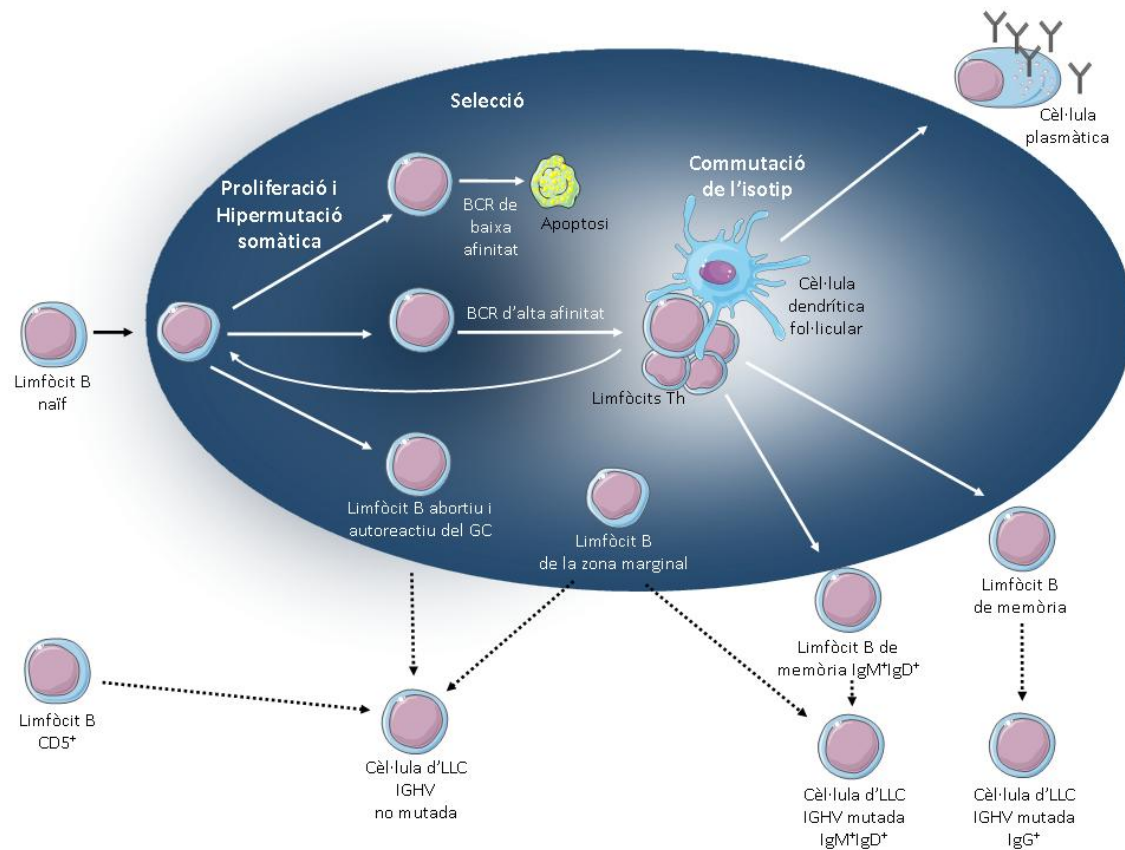


Figura 5 | Origen de la cèl·lula d'LLC. Representació esquemàtica del procés de maduració del limfòcit B en el centre germinal i les possibles cèl·lules B normals homòlogues de la cèl·lula d'LLC. BCR: de l'anglès B cell receptor; GC: de l'anglès germinal centre. *Adaptació de Zenz, T. Nat Rev Cancer, 2010¹⁰⁹.*

Un altre estudi recent, és el publicat per Kikushige Y, et al¹¹². En aquest estudi van observar com HSC purificades de pacients diagnosticats d'LLC eren capaces de produir clones de cèl·lules amb fenotip d'LLC i capacitat d'autorenovació preservada en el receptor xenogènic. Aquestes HSCs expressaven característicament factors de transcripció relacionats amb el desenvolupament limfoide en els estadis inicials com són IKAROS i E2A, a més a més no presentaven alteracions en el cariotip. Les cèl·lules amb fenotip d'LLC que apareixien en els ratolins tenien reordenaments oligoclonals dels segments V(D)J diferents a aquells que presentaven les cèl·lules d'LLC d'origen però mantenien alhora un alt grau d'homologia dels segments CDR3. Amb tot això, van suggerir que les HSCs d'LLC ja tindrien anomalies genètiques que afavoririen una expansió policlonal de cèl·lules d'LLC. Aquestes clones de cèl·lules B serien seleccionades en resposta a una senyalització derivada del BCR - presumiblement derivada de l'estimulació antigènica- pel que, en conseqüència, hi hauria una posterior expansió oligoclonal. Finalment, noves anomalies cromosòmiques o events oncogènics jugarien un paper important en la progressió i transformació cap a l'expansió final de cèl·lules d'LLC monoclonals.

2.3.2. El microambient

En els darrers anys, nombrosos estudis demostren com la interacció de les cèl·lules d'LLC amb el microambient tumoral juga un paper essencial en la patogènesi i manteniment de l'LLC. Microambient tumoral es considera el conjunt de cèl·lules no tumorals (cèl·lules estromals, del sistema immunològic i de l'endoteli vascular) i proteïnes produïdes per totes aquestes cèl·lules que participen en el desenvolupament i progressió del tumor. Pel que fa a l'LLC, el moll de l'os i els òrgans limfoides secundaris són els principals compartiments tissulars on les cèl·lules d'LLC troben el microambient tumoral favorable per proliferar. La principal diferència entre tots dos nínxols és que el moll de l'os conté BMSC enmig de cèl·lules vasculares mentres que en els òrgans limfoides secundaris són les cèl·lules dendrítiques fol·liculars juntament amb els limfòcits T les que acompanyen els limfòcits B tumorals¹¹³.

Històricament, l'LLC s'havia considerat una malaltia deguda a un defecte en l'apoptosi del limfòcit B tumoral i la seva conseqüent acumulació passiva. Aquesta visió es basava en que més d'un 98% de les cèl·lules d'LLC circulants en SP es troben en les fases G0/G1 del cicle cel·lular, sovint sobreexpressen proteïnes antiapoptòtiques, com Bcl2 i Mcl1 i, quan són cultivades *in vitro*, experimenten una apoptosi ràpida i espontània²⁶.

Fa aproximadament uns 10 anys, Messmer et al¹¹⁴ van avaluar la cinètica de les cèl·lules d'LLC a partir d'uns experiments en els que s'utilitzava aigua deuterada (²H₂O). Els pacients ingerien l'aigua deuterada a diari durant 84 dies. El deuteri s'incorporava en el DNA sintetitzat durant la fase S del cicle cel·lular i mitjançant espectrometria de masses es determinaven les taxes de "naixement" i mort de les cèl·lules. Tot i que s'observà una gran variabilitat entre pacients, les taxes de "naixements" de cèl·lules d'LLC eren del 0.11% al 1.76% per dia. A més a més, es va veure que aquells pacients amb més d'un 0.35% de naixements per dia tenien més probabilitat de presentar símptomes relacionats amb la malaltia. Per tant, aquestes troballes suggerien que l'LLC podria tenir una significativa capacitat proliferativa i que a més a més, aquesta podria estar relacionada amb l'activitat i progressió de la malaltia.

Estudis posteriors, utilitzant també ²H₂O, van aportar més informació sobre aquesta capacitat proliferativa de les cèl·lules d'LLC i la circulació d'aquestes entre els diferents compartiments tissulars. Concretament, Calissano et al¹¹⁵ van demostrar com la fracció de cèl·lules d'LLC CD38⁺ proliferava més que la CD38⁻. Prèviament ja s'havia observat que les cèl·lules CD38⁺ tenien una major expressió de Ki-67, ZAP-70 i telomerasa comparat amb les cèl·lules CD38⁻¹¹⁶. En un estudi més recent¹¹⁷, el mateix grup va demostrar com aquesta fracció proliferant de cèl·lules d'LLC tenien, a més a més, un immunofenotip singular: CD5^{high}CXCR4^{dim} (de l'anglès CXC *chemokine receptor 4*), mentre que les cèl·lules no proliferants (o "en repòs")

expressaven CD5^{dim}CXCR4^{high}. L'anàlisi dels GEP de les diferents fraccions va permetre observar com les cèl·lules del compartiment proliferant expressaven gens relacionats amb proliferació, activació i senyalització cel·lular, mentre que les cèl·lules "en repòs" expressaven gens relacionats amb apoptosi, mort cel·lular i migració. Aquests estudis, per tant, suggerien l'existència d'una circulació de les cèl·lules d'LLC entre la SP i els diferents compartiments tissulars: en SP les cèl·lules d'LLC entrarien en un estat de senescència, la sobreexpressió de CXCR4 promouria la migració i entrada als compartiments tissulars on trobarien un microambient tumoral favorable, s'activarien, proliferarien i internalitzarien el CXCR4 (arrel de la unió amb el seu lligand CXCL12), seria llavors quan, altre cop, serien alliberades cap a la SP reiniciant el cicle.

En aquests compartiments tissulars el microambient tumoral proveirà de senyals de supervivència i proliferació a les cèl·lules d'LLC, resultant en la formació dels anomenats "centres de proliferació" o "pseudofol·licles". Histològicament, aquests centres de proliferació es veuen com unes zones més pàl·lides formades per prolimfòcits i paraimmunoblasts enmig d'un fons més fosc format per limfòcits de mida més petita. Les cèl·lules d'LLC que es troben en aquests centres de proliferació tenen una expressió més elevada de marcadors associats a proliferació com són el Ki-67 i el CD71, co-expressió de survivina i Bcl2 i també una expressió més elevada de CD20, CD23 i MUM1/IRF-4. La presència de més centres de proliferació i més grans té importància clínica perquè identificaria un grup de pacients amb LLC "accelerada" caracteritzada per un curs clínic més agressiu¹¹⁸.

2.3.2.1. Les cèl·lules estromals del moll de l'os (BMSC)

Com hem explicat anteriorment, les BMSC són un important component del moll de l'os que dóna suport al manteniment de les HSC normals³. En l'LLC, les BMSC protegeixen els limfòcits B tumorals de l'apoptosi espontània i induïda per drogues¹¹⁹ i participen en el control de la migració i retenció de les cèl·lules d'LLC en aquest compartiment¹²⁰.

En els òrgans limfoides secundaris, principalment els ganglis limfàtics, s'han observat altres cèl·lules accessòries com les cèl·lules dendrítiques fol·liculars, macròfags i limfòcits T. Les NLC són cèl·lules estromals adherents que es poden originar *in vitro* a partir de monòcits CD14+ i que envoltarien i donarien suport a les cèl·lules d'LLC^{121,122}.

Hi ha diferents vies de senyalització implicades en la interacció de les BMSC amb les cèl·lules d'LLC. Una d'aquestes és l'activació de la senyalització de la via de Notch. Les BMSC expressen tant els receptors com els lligands de Notch (Figura 6). Aquests receptors són proteïnes transmembrana que pateixen una sèrie de canvis conformacionals i trencaments

INTRODUCCIÓ

després de la unió al seu lligand. Aquest trencament de la molècula allibera el domini NICD (de l'anglès, *Notch receptor intracellular domain*) que es transloca al nucli, s'uneix a la proteïna d'unio al DNA RBPJ, i regula l'expressió de gens diana. Principalment, activen mecanismes d'antiapoptosi com són la sobreexpressió del factor de transcripció c-MYC¹²³, de les proteïnes antiapoptòtiques Bfl1 i Bcl1-x1 i la supressió de PTEN que induiria l'activació de la via PI3K/Akt (de l'anglès, *phosphatidylinositol 3-kinase*)¹²⁴.

Un altre mecanisme responsable dels efectes antiapoptòtics induïts per les BMSC estaria relacionat amb interaccions bioquímiques entre els dos tipus cel·lulars. Les BMSC són capaces de secretar cisteïna al medi, la qual serà absorbida per les cèl·lules d'LLC que la utilitzaran per la síntesi de glutatió, necessari per a resistir l'estrés oxidatiu cel·lular. Un increment en els nivells de glutatió augmenta la supervivència de les cèl·lules tumorals i les protegeix dels efectes citotòxics prooxidatius de la quimioteràpia¹²⁵.

Les BMSC expressen un panell de quimioquines (CCL2, CCL4, CCL5, CCL20, CXCL12 i CXCL8) i receptors de quimioquines (CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 i CXCR6) que juguen un paper molt important en la regulació de la migració i retenció de les cèl·lules hematopoètiques en el moll de l'os, proveint-les, a més a més, de senyals de creixement i diferenciació cel·lular¹²⁶. Entre aquests, la unió CXCR4-CXCL12 és un dels principals mecanismes que provocarà la retenció de les cèl·lules d'LLC dins el nínxol de BMSC, la seva activació i la seva supervivència¹²⁷.

2.3.2.2. Les quimioquines i els seus receptors

Les quimioquines són una família de citoquines que s'encarreguen de dirigir la circulació i la localització de les cèl·lules hematopoètiques en els diferents compartiments tissulars a través de la quimiotaxi. Se'n poden distingir 2 subfamílies segons hi hagi o no un aminoàcid separant els 2 residus de cisteïna presents en qualsevol quimioquina, corresponent així a les quimioquines C-X-C o C-C¹²⁸. Les quimioquines s'uneixen als seus corresponents receptors, unes proteïnes transmembrana que conduiran senyals d'activació intracel·lular. Aquesta activació induirà la formació del segon missatger inositol trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG), resultant en la mobilització citoplasmàtica de calci i l'activació de múltiples cascades de senyalització com són PI3K/Akt i Ras/MAPK (de l'anglès, *mitogen-activated protein-kinase*, també anomenada ERK1/2)¹²⁹.

La circulació dels limfòcits entre la SP i els òrgans limfoides és un procés regulat per l'expressió diferencial de quimioquines segons el tipus de teixit. Els limfòcits circulants interaccionen de forma transitòria i reversible amb l'endoteli vascular a través de molècules

d'adhesió (selectines i integrines). Les quimioquines situades a nivell de la superfície de l'endoteli activen els seus corresponents receptors els quals, al seu torn, engeguen l'activació de les integrines. El resultat serà l'arrest, adhesió ferma, i migració transendotelial cap als teixits on els gradients de quimioquines conduiran i hi retindran aquestes cèl·lules. Hi ha força evidències que aquests mecanismes fisiològics de "reclutament" són també vàlids per als limfòcits tumorals com són les cèl·lules d'LLC¹²⁹.

Tres dels principals receptors de quimioquines que expressen les cèl·lules d'LLC són el CXCR4, CXCR5 i CCR7; CCL3 i CCL4, dues de les principals quimioquines (Figura 6).

CXCR4

Com hem mencionat anteriorment, el CXCR4 es troba expressat majoritàriament per les cèl·lules d'LLC que circulen per la SP. El seu lligand, la quimioquina CXCL12 es troba expressada constitutivament per les cèl·lules estromals com són les NLC i les BMSC. La unió CXCR4-CXCL12 provoca la internalització del receptor per endocitosi i l'activació de senyals intracel·lulars que acabaran permetent la quimiotaxi, la migració a través de l'endoteli, la polimerització de l'actina, la migració entre i per sota de les cèl·lules estromals i la inhibició de l'apoptosi de les cèl·lules d'LLC¹²⁹.

La resposta a CXCL12 pot estar modulada per altres senyals derivades del microambient de la cèl·lula d'LLC, com són la senyalització derivada del BCR i l'expressió de CD38, les quals augmenten la resposta de la cèl·lula d'LLC a l'estimulació del CXCR4¹²⁹.

L'expressió de ZAP-70 també s'ha relacionat amb un augment de la resposta a CXCL12. S'ha demostrat que les cèl·lules d'LLC que expressen ZAP-70 tenen una major capacitat de migració i supervivència en resposta a CXCL12¹³⁰, i això s'ha traduït *in vivo* en un increment de la infiltració dels limfòcits B tumorals al moll de l'os¹³¹.

CXCR5

Les cèl·lules d'LLC expressen nivells elevats de CXCR5. El seu lligand, la quimioquina CXCL13, és constitutivament secretada per les cèl·lules estromals dels teixits limfoides secundaris. L'activació de CXCR5 indueix també la seva endocitosi, la polimerització de l'actina, quimiotaxi i una activació perllongada de les kinases de les vies PI3K/Akt i MAPK¹²⁹.

CCR7

Les quimioquines CCL19 i CCL21 són els lligands del receptor CCR7 i es troben constitutivament expressades per les cèl·lules endotelials, les cèl·lules dendrítiques fol·liculars i cèl·lules de l'estroma de teixits limfoides secundaris. L'eix CCR7-CCL19/21 està implicat sobretot en el desenvolupament i circulació dels limfòcits T, tot i que en menor mesura també dels limfòcits B. Les cèl·lules d'LLC expressen nivells intermedis/alts de CCR7 i la seva expressió

INTRODUCCIÓ

s'ha vist relacionada amb el nombre d'adenopaties. En resposta a la seva estimulació per CCL19/21 les cèl·lules d'LLC migren a través de l'endoteli vascular¹²⁹.

L'expressió de CCR7 s'ha vist regulada també per la senyalització derivada del BCR. Un augment de la senyalització del BCR s'ha relacionat amb un augment d'expressió de CCR7, predominantment via ERK1/2, incrementant d'aquesta manera la resposta i migració cap a CCL21¹³². A més a més, s'ha demostrat que l'estimulació de CCR7 per CCL19/21 induïx major migració i polimerització de l'actina en les cèl·lules que expressen ZAP-70 que en aquelles que no l'expressen¹³⁰.

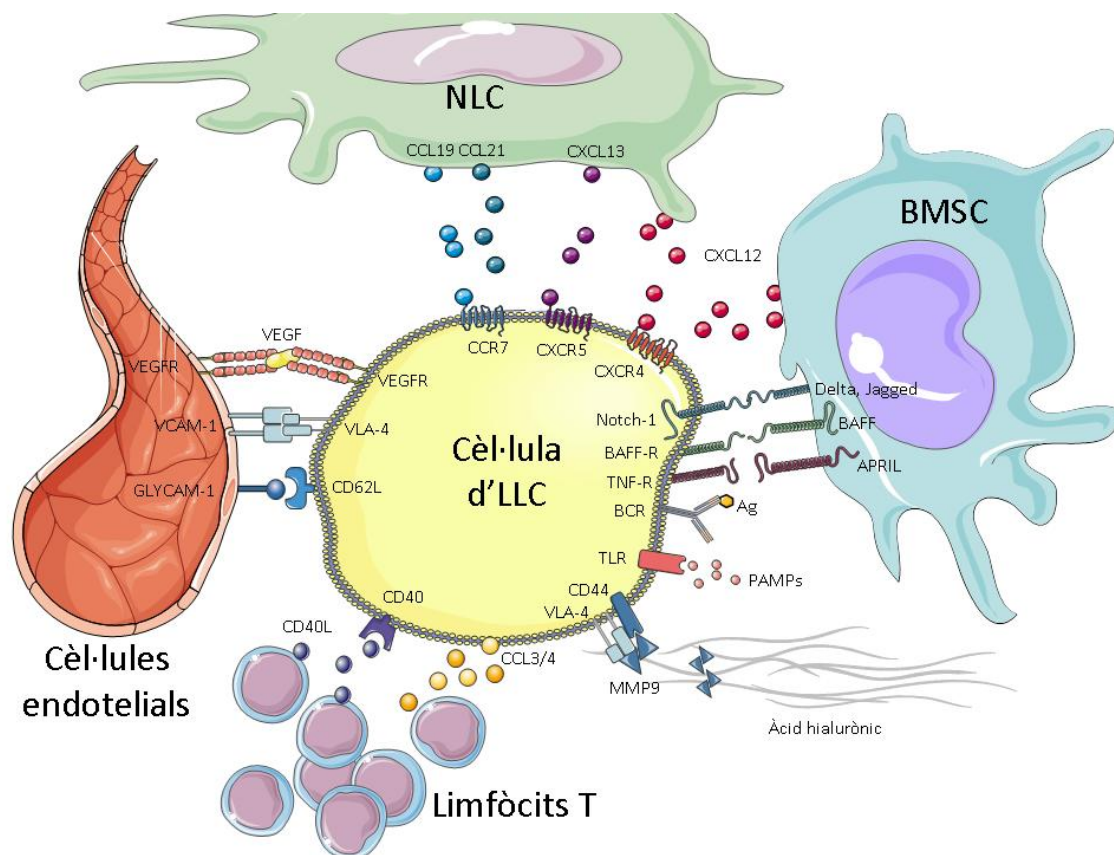


Figura 6 | Principals interaccions moleculars entre les cèl·lules d'LLC i el seu microambient.

CCL3 i CLL4

Anteriorment anomenades MIP-1 α , β (de l'anglès, *macrophage inflammatory protein-1 alpha and beta*), CCL3 i CCL4 són quimioquines secretades principalment per cèl·lules hematopoètiques implicades en la resposta immunològica adaptativa, com són: macròfags, cèl·lules dendrítiques i limfòcits T i B. CCL3 senyalitza a través dels receptors CCR1 i CCR5,

mentres que CCL4 només a través de CCR5. La seva secreció per part de les cèl·lules d'LLC induiria la circulació i retenció de cèl·lules accessòries, principalment limfòcits T, en el microambient tumoral. D'aquesta manera la cèl·lula d'LLC participaria també activament en la creació d'aquest microambient tumoral favorable, induïnt l'atracció dels limfòcits T els quals les proveïrien de senyals de supervivència i proliferació¹²⁷.

L'expressió de CCL3/4 per les cèl·lules d'LLC és induïda per l'estimulació del BCR i pel lligand del receptor CD40. A més a més, el co-cultiu de cèl·lules d'LLC amb NLC també induïx la sobreexpressió i augment de secreció d'aquestes quimioquines per part de les cèl·lules d'LLC¹²⁷.

2.3.2.3. Molècules d'adhesió

El perfil d'expressió de molècules d'adhesió per part de la cèl·lula d'LLC influeix i és un factor determinant en l'habilitat d'aquestes cèl·lules de respondre a quimioquines i d'interaccionar amb les cèl·lules accessòries. Aquestes molècules permeten el contacte directe entre les cèl·lules d'LLC i les estromals, contacte necessari per a mediar els senyals antiapoptòtics provinents de les cèl·lules estromals¹³³. Les molècules d'adhesió es poden dividir principalment entre integrines o selectines. Les primeres són receptors transmembrana que funcionen com a ponts d'unió entre cèl·lules o entre una cèl·lula i la matriu extracel·lular. A nivell de la cèl·lula d'LLC cal destacar l'integrina VLA-4 (de l'anglès, *very late antigen-4*)¹³⁴. Per una altra banda, les selectines són glicoproteïnes transmembrana que s'uneixen a polímers de glúcids per tal de facilitar l'adhesió de cèl·lules a teixits i resultar en l'activació d'integrines i l'alliberament de quimioquines. Aquest seria el cas de la selectina CD62L a nivell de la cèl·lula d'LLC, el lligand més important de la qual és GlyCAM-1¹⁵⁰.

VLA-4

La integrina VLA-4 és un heterodímer format per les subunitats: $\alpha 4$, també anomenada CD49d, i $\beta 1$ o CD29. Aquesta proteïna transmembrana participa en l'adhesió dels limfòcits a l'endoteli vascular mitjançant la unió a VCAM-1 (de l'anglès, *vascular cell adhesion protein 1*) durant el procés de migració transendotelial des de la circulació perifèrica als teixits limfoides¹³⁵. Una elevada expressió de VLA-4 s'ha relacionat amb major infiltració del moll de l'os i pitjor pronòstic clínic¹³⁴. A més a més, estudis recents han observat com l'expressió de CD49d és un predictor independent de supervivència¹³⁶, i que la seva expressió està associada a l'expressió de CXCR4, suggerint per tant, un paper coordinat d'ambdues molècules en el control de la circulació de les cèl·lules d'LLC cap als teixits limfoides¹³⁷. L'expressió de CD49d es

INTRODUCCIÓ

pot mesurar per citometria de flux i, donat el seu impacte pronòstic, s'està considerant la seva inclusió en els panells de rutina d'immunofenotipatge de l'LLC.

A més a més, també s'ha vist com el complex format per VLA-4 i la selectina CD44 serveix d'ancoratge per la forma activa de la molècula MMP-9 (de l'anglès, *matrix metalloprotease-9*) de manera específica en les cèl·lules d'LLC. La unió de MMP-9 amb el complex VLA-4/CD44 participa en la migració de les cèl·lules d'LLC i en la seva protecció enfront l'apoptosi espontània mitjançant l'activació de la via Lyn/STAT3 i la sobreexpressió de Mcl-1¹³⁸. Estudis recents han demostrat que MMP-9 també indueix quimioresistència a drogues com la fludarabina i triòxid d'arsènic¹³⁹ i que té un paper primordial en facilitar la migració de les cèl·lules d'LLC cap al moll de l'os i la melsa¹⁴⁰.

CD62L

CD62L és un membre de la família de selectines que juga un paper important en la circulació i retenció dels limfòcits al gangli limfàtic. CD62L s'uneix a diversos lligands involucrats en aquests processos com són GlyCAM-1 i MadCAM-1, molècules que es troben a l'endoteli vascular¹⁴¹. Nivells elevats de CD62L s'han relacionat amb augment de la capacitat de migració cap als ganglis limfàtics per part de les cèl·lules d'LLC¹⁴² i la seva inhibició provoca l'apoptosi de cèl·lules d'LLC, tot indicant que no només intervé en processos de migració sinó també de supervivència.

2.3.2.4. El receptor CD40

El CD40 és una glicoproteïna transmembrana de 45-50kDa que pertany a la família de factors de necrosi tumoral (TNF, de l'anglès *tumor necrosis factor*). Es troba expressada principalment per cèl·lules hematopoètiques, entre aquestes: limfòcits B, cèl·lules plasmàtiques, progenitors hematopoètics CD34⁺, monòcits i cèl·lules dendrítiques. Tot i que també es pot trobar en cèl·lules no hematopoètiques com són les cèl·lules endotelials, fibroblastes i cèl·lules epitelials. Tot i que la seva expressió és constitutiva en la major part d'aquests tipus cel·lulars, també pot ser induïda per citoquines com l'IFN- γ , IL-1/4, TNF- α i GM-CSF¹⁴³ i la seva funció principal és la de promoure la supervivència i diferenciació cel·lular.

El lligand del CD40 (CD40L) és un altre membre de la família de TNFs expressat pels limfòcits T (principalment CD4⁺ però també s'ha observat en limfòcits T CD8⁺, CD4⁻/CD8⁻ i Th0/1/2). L'activació del limfòcit T a través de l'estimulació del receptor TCR (de l'anglès, *T cell receptor*) comporta una elevada expressió de CD40L que pot ser incrementada amb la coestimulació amb CD3 i CD28. Altres inductors de l'expressió de CD40L són citoquines com les interleuquines IL-1 i IL-4.

S'ha observat un elevat nombre d'agregats de limfòcits CD3⁺ al voltant de les cèl·lules d'LLC dels centres proliferatius dels ganglis limfàtics, tot indicant el paper destacat dels limfòcits T en el microambient tumoral de la cèl·lula d'LLC. La unió CD40-CD40L és un dels principals mecanismes d'interacció de les cèl·lules d'LLC amb aquests limfòcits T. Aquesta unió indueix l'activació, proliferació i supervivència de la cèl·lula d'LLC.

Per una banda, s'ha descrit que l'estimulació del receptor CD40 pel CD40L indueix un augment d'expressió de marcadors de superfície d'activació com CD54, CD69, CD70, CD80 i CD95)¹⁴⁴.

A més a més, la lligació del CD40 també protegeix la cèl·lula d'LLC de l'apoptosi espontània i de l'induïda per fàrmacs. Aquesta quimioresistència s'associa a un augment de l'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl2, Mcl1 i Bcl_{XL} (a través de l'activació de la via JAK/STAT)¹⁴⁵, de l'inhibidor de caspases survivina, que es troba expressada de forma específica en els centres proliferatius¹⁴⁶ i dels factors de transcripció NF-κB/Rel¹⁴⁷. Per últim, també s'ha descrit una inducció de la proliferació en limfòcits B normals i en cèl·lules d'LLC^{144,148}, tot i que altres estudis no ho han pogut observar el mateix sense afegir altres factors estimulants, com les interleuquines IL-2 o IL-10¹⁴⁹.

Per aquests motius, tant el CD40L soluble com fibroblastes transfectats amb CD40L s'han utilitzat en sistemes de cultiu de cèl·lules d'LLC per tal de reproduir parcialment *in vitro* els senyals provinents del microambient^{149,150,151}.

2.3.2.5. Toll-like receptors (TLRs)

Els receptors Toll-like (TLR) pertanyen a la família de receptors PRR (de l'anglès, *pattern recognition receptors*), que es corresponen a un cert tipus de receptors primitius que tenen un paper essencial en la defensa més immediata de l'hoste contra patògens invasors. Són glicoproteïnes de membrana expressades per cèl·lules del sistema immunològic innat que identifiquen PAMPs (de l'anglès, *pathogen-associated molecular patterns*). Les PAMPs són petites molècules microbianes com és el cas dels lipopolisacàrids (LPS) i peptidoglicans bacterians, fragments d'RNA de doble cadena (normalment provinents de virus), o CpG oligodeoxinucleòtids (CpG ODN) (petits fragments de DNA de cadena simple molt abundants en diferents genomes microbians¹⁵²).

Els TLR tenen una regió citoplasmàtica anomenada domini TIR (de l'anglès, *Toll/IL-IR*) encarregada de la senyalització intracel·lular. El grau d'homologia entre els diferents tipus de TLR, pel que fa a la seqüència d'aminoàcids d'aquest domini, és d'un 20-30%. D'altra banda, el domini extracel·lular del receptor conté de 19 a 25 còpies en tàndem del fragment anomenat

INTRODUCCIÓ

LRR (de l'anglès, *leucine-rich repeats*) que estarà directament implicat en el reconeixement dels diferents patògens. Malgrat l'elevat grau d'homologia entre els diferents fragments LRR, diferents tipus de TLR poden arribar a reconèixer lligands estructuralment molt diferents. La localització cel·lular també canvia segons el tipus de TLR i es correlaciona, d'alguna manera, amb els perfils moleculars dels seus lligands. Per exemple, els receptors TLR1/2/4 es localitzen a la membrana cel·lular i són interioritzats mitjançant fagosomes un cop activats pels seus lligands, mentre que els receptors TLR3/7/9, que reconeixen estructures relacionades amb els àcids nucleics, no s'expressen a la superfície¹⁵².

Pel que fa al TLR9, recentment s'ha observat que es trobaria localitzat en el reticle endoplasmàtic¹⁵³. Els seus lligands, els CpG ODN són internalitzats ràpidament per la cèl·lula (limfòcit B, T, NK o cèl·lules presentadores d'antigen) per un mecanisme que podria incloure la quinasa PI3K i interaccionen amb el TLR9 present en vesícules endocítiques. Aquesta interacció engega una sèrie de senyals d'activació que s'inicien pel reclutament de la molècula MYD88 (de l'anglès, *myeloid differentiation primary response gene 88*) cap al domini TIR del TLR9 seguit d'una activació del complex IRAK-TRAF6 (de l'anglès, *IL-1 receptor-activated kinase i tumor-necrosis factor receptor-associated factor 6*). L'activació d'aquest complex provoca l'activació de la quinasa MAPK i del complex IKK (de l'anglès, *inhibitor of NF- κ B*) que culminarà amb la sobreexpressió de factors de la transcripció com l'NF- κ B i AP1 (de l'anglès, *activating protein 1*)¹⁵³ i la inducció de proliferació, maduració i producció d'anticossos per part del limfòcit B¹⁵⁴.

El repertori de TLR expressats per les cèl·lules d'LLC és altament similar a l'expressat pels limfòcits B normals, en concret pels limfòcits B de memòria. L'estimulació del TLR9 indueix un fenotip immunogènic en les cèl·lules d'LLC definit per l'expressió de molècules coestimuladores (CD40, CD58, CD80, CD86 i CD54) i citoquines específiques. Un estudi recent demostra com, a més, l'estimulació de la cèl·lula d'LLC amb CpG ODN i CD40L simultàniament provocaria la seva diferenciació a cèl·lules CD20⁺ secretores d'anticossos, patir la CSR i produir anticossos IgG o IgA poli i autoreactius¹⁵⁵. Però no només l'estimulació del TLR9 indueix l'activació de les cèl·lules d'LLC: també l'estimulació d'altres TLR com TLR1/2/6 indueix fosforilació d'IKK i augment de l'expressió de les molècules d'activació CD25 i CD86¹⁵⁴.

D'altra banda, s'ha observat que la resposta a l'estimulació dels TLRs pel fa a expressió gènica, funció i/o tolerància podria estar associada amb el BCR. Aquest seria el cas de l'estimulació del TLR9 per part dels CpG ODN que induiria proliferació preferentment en els casos amb absència de mutacions en les IGHV, mentre que en els casos amb mutacions en les IGHV induiria apoptosi^{156,157,158}. A més a més, aquells casos en què l'estimulació per CpG ODN

induïa proliferació resultà un criteri predictiu de resposta relacionat amb una pitjor PFS, TTT (de l'anglès, *time to treatment*) i OS¹⁵⁹.

2.3.3. El receptor de la cèl.lula B (BCR)

Entre els diversos estímuls que la cèl.lula d'LLC rep del microambient tumoral, l'activació i senyalització del BCR, particularment en els teixits limfoides, és un dels mecanismes patològics centrals, tot i que el mecanisme exacte d'estimulació del BCR i la pròpia natura de l'antigen estiguin encara per dilucidar¹⁶⁰.

Com hem dit anteriorment, aquesta la genètica d'aquesta Ig té rellevància clínica, els pacients que tenen absència de mutacions en els gens de les *IGVH* tenen pitjor pronòstic que aquells amb presència de mutacions^{61,62}. Un fet important és que la diversitat en el repertori d'*IGHV* en les cèl.lules d'LLC és restringida. La distribució de determinades *IGHV* en diferents clones de cèl.lules d'LLC difereix de les que es troben en limfòcits B normals, amb un increment de la freqüència d'*IGHV* 1-69, *IGHV* 4-34 i *IGHV* 3-07. Aquesta varietat restringida d'*IGHV* és el que s'anomena estereotípia. Més d'un 20% dels pacients tenen BCR estereotipats i aproximadament un 1% tenen Igs pràcticament idèntiques. Aquest fet implicaria que una fracció significativa de cèl.lules d'LLC hauria estat seleccionada per uns determinats epítops antigènics en algun punt del seu desenvolupament i/o derivarien de diferents subpoblacions de limfòcits B amb una diversitat limitada de les regions *IGHV*^{60,161,162,163,164,165,166}.

Hi ha una major proporció de casos U-CLL que tenen reordenaments estereotipats dels segments V, D i J amb una regió CDR3 molts similar entre pacients¹⁶⁷. En els casos U-CLL el BCR és freqüentment polireactiu a autoantígens derivats de proteïnes o lípids endògens o exògens generats per exemple, per estrès oxidatiu¹⁶⁸. Els casos M-CLL en canvi, mostren BCR oligo- o monoreactius, és a dir, que la seva unió a antigens és més restrictiva. Els casos de BCRs estereotipats també és menys freqüent¹⁶⁹.

El paper dels antigens en la patogènesi de l'LLC també es veu recolzat pel fet que la presència de BCRs estereotipats pot afectar al pronòstic de la malaltia. Aquest fet s'ha observat sobretot per un subgrup específic d'*IGHV*, el *IGHV* 3-21, que s'ha associat a un curs clínic agressiu de la malaltia amb independència de l'estat mutacional de les *IGHV*^{161,162,163,170,171}.

Tant els casos U-CLL com M-CLL sembla que experimenten la unió d'un antigen al BCR *in vivo*. Tot i que això com hem dit, s'ha deduït de l'expressió restringida dels reordenaments dels gens *IGHV* i de les seqüències estereotípiques IG V(D)J, la prova directa de la unió d'antigen només s'ha demostrat pel fet que les cèl.lules d'LLC poden recuperar l'expressió d'sIgM *in vitro*, després de la consistent internalització d'aquesta *in vivo*. És probable que

INTRODUCCIÓ

l'exposició *in vivo* a l'antígen comporti la senyalització mediada per la sIg així com la seva pèrdua d'expressió per endocitosi. Els limfòcits B normals que expressen sIg poden respondre a l'antígen tant amb activació, proliferació i diferenciació com amb inducció d'apoptosi. Tant pels casos U-CLL com M-CLL, la unió de l'antígen al BCR acaba promovent la proliferació i supervivència de la cèl·lula d'LLC. Seria en la modulació diferencial de l'expressió de les Ig el que probablement contribuiria al diferent comportament clínic d'aquests subgrups. Mentre que els casos U-CLL sembla que retenen capacitat de senyalització, portant a un increment en la seva proliferació i supervivència, els casos M-CLL estarien "anèrgics", sense aparent resposta després de la unió a la sIgM. La modulació diferencial de l'expressió de les sIgM sembla que estaria lligada a alteracions en l'estat de glicosilació de la cadena μ . L'endocitosi de l'sIgM provoca una modulació en la composició en glicans de la cadena μ amb pèrdua de la forma completament glicosilada a expenses de la forma manosilada immadura. Aquesta modulació és més evident en els casos U-CLL i podria estar relacionada amb diferents mecanismes d'interacció amb el microambient¹⁶⁰.

2.3.3.1. La senyalització derivada del BCR

La unió de l'antígen a la sIgM indueix l'agregació del BCR amb altres receptors com el CD19, el CD40 o el CD5 en determinades regions de la membrana plasmàtica riques en glicolipoproteïnes anomenades "*lipid rafts*". Aquests microdominis compartimentalitzen processos cel·lulars servint de centres organitzadors per a la unió de molècules de senyalització, canviant la fluidesa de la membrana i facilitant la comunicació entre les diferents proteïnes de membrana¹⁷².

L'estimulació de la sIgM indueix la fosforilació dels residus de tirosina dels ITAM (de l'anglès, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) per part de les quinases Lyn (de l'anglès, *Lck/yes novel tyrosine kinase*) i Syk (de l'anglès, *spleen tyrosine kinase*). Aquesta fosforilació indueix el reclutament del "signalosoma", un complex de quinases i proteïnes mediadores com Lyn, Syk, Btk (de l'anglès, *Bruton tyrosine kinase*) i Blnk (de l'anglès, *B cell linker protein*)¹⁷³.

La propagació de la senyalització del BCR inclou múltiples vies (Figura 7). Un cop es produeix el reclutament del "signalosoma", PLC γ 2 (de l'anglès, *phospholipase C-gamma*) és fosforilada per Btk i Syk i catalitzarà la formació dels segons missatgers DAG (de l'anglès, *diacylglycerol*) i IP3 a partir del lípid de membrana PIP2 (de l'anglès, *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*). El DAG és l'activador clàssic de la proteïna kinase C beta (PKC β), responsable de l'activació de la via de les MAPK i del factor de transcripció, NF- κ B. La generació d'IP3

promourà la mobilització del calci localitzat al reticle endoplasmàtic així com del compartiment extracel·lular. Aquesta mobilització del calci activa una sèrie de factors de la transcripció com són NFAT (de l'anglès, *nuclear factor of activated T cells*), NF- κ B i Jun, els quals acaben regulant la resposta immune, la proliferació i la supervivència de la cèl·lula¹⁷³.

L'activació del BCR també induirà l'activació de la via de PI3K. Aquesta kinasa és l'encarregada de fosforilar PIP2 per tal de generar PIP3 que induirà el reclutament de Btk i altres kinases a la membrana plasmàtica com Akt. Akt serà l'encarregada de promoure la supervivència de la cèl·lula mitjançant l'activació de la via canònica d'NF- κ B, la inhibició de proteïnes proapoptòtiques com Bad, l'activació de proteïnes antiapoptòtiques com Mcl-1 i Bcl-2 i augmentant l'acumulació intranuclear d'NFAT mitjançant la fosforilació d'GSK3 (de l'anglès, *glycogen synthase kinase 3*). L'activació de la proteïna mTOR és també, en part, un efecte de l'activació d'Akt que acaba promovent la síntesi de proteïnes relacionades amb el creixement, la proliferació, la supervivència i la migració cel·lular¹⁷³.

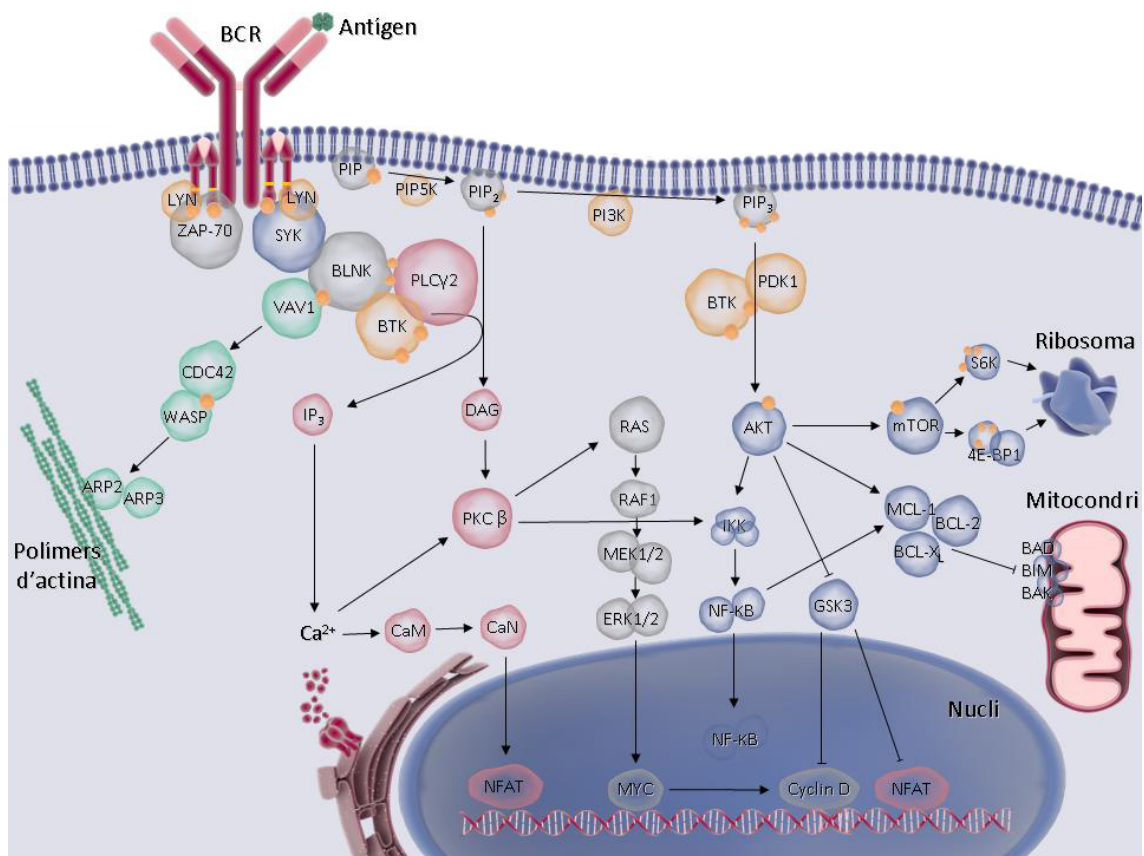


Figura 7 | Representació esquemàtica de la senyalització derivada del BCR en la cèl·lula d'LLC. BCR, B cell receptor; LYN, Lck/Yes novel tyrosine kinase; ZAP-70, zeta-associated protein 70; SYK, spleen tyrosine kinase; BLNK, B cell linker protein; BTK, Bruton tyrosine kinase; PLC γ 2, phospholipase C-gamma; PIP, phosphatidylinositol; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase; PDK1, pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1; CDC42, cell division control protein 42 homolog; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein; ARP2/3, actin-related proteins 2/3; IP $_3$, inositol-1,4,5-triphosphate; CaM, Calmodulin; CaN, Calcineurin; NFAT, nuclear factor of activated T cells; DAG, diacylglycerol; PKC β , protein kinase C beta;

INTRODUCCIÓ

Ras, rat sarcoma; MEK1/2, mitogen-activated protein kinase kinase 1/2; ERK1/2, mitogen-activated protein kinase 3/1; AKT, protein kinase B; IKK, inhibitor of kappa B kinase; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; GSK3, glycogen synthase kinase 3; MCL1, induced myeloid leukemia cell differentiation protein; BCL2, B cell lymphoma 2; BCL_{xL}, B cell lymphoma extra-large; BAD, BCL2-associated death promoter; BIM, BCL2-like protein 11; BAK, BCL2 homologous antagonist/killer; mTOR, mammalian target of rapamycin; S6K, ribosomal protein S6 kinase; 4E-BP1, 4E-binding protein 1.

A la cèl·lula d'LLC el que s'observa és una fosforilació constitutiva dels residus d'activació de certes quinases i una resposta variable a l'estimulació de l'IgM. Entre aquestes quinases, s'ha observat tant una sobreexpressió de Lyn i Syk com un augment de la seva activitat. També s'ha observat una activació aberrant de la via MAPK, específicament de les proteïnes antiapoptòtiques ERK1/2¹⁷⁴. També s'ha observat que tant la proteïna quinasa PI3K com Akt es troben constitutivament activades en les cèl·lules d'LLC^{175,176}. D'altra banda, la desregulació d'NF- κ B a nivell de la cèl·lula d'LLC implica una sobreexpressió de gens antiapoptòtics. L'estimulació in vitro del BCR indueix una variable però incrementada activitat d'NF- κ B que es correlaciona inversament amb l'apoptosi espontània. A més a més, l'activació constitutiva de PI3K i d'Akt també contribueix a la sobreexpressió d'NF- κ B¹⁷⁷.

2.3.3.2. La proteïna Syk

Syk és una proteïna tirosina-quinasa de 72kDa que conté dos dominis en tàndem Src Homology 2 (SH2) a l'extrem N-terminal, dos dominis d'unió (Interdomini A i B), i un domini quinasa al seu extrem C-terminal (Figura 8)¹⁷⁸.

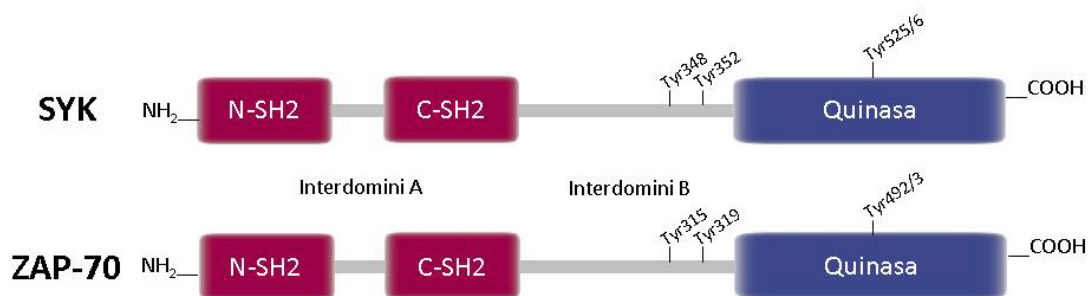


Figura 8 | Representació esquemàtica de les estructures moleculars de Syk i ZAP-70. Superposició de les estructures de Syk i ZAP-70. A través de la interacció entre els dominis SH2 i els ITAM fosforilats del BCR o TCR, s'inicia l'activació de les dues quinases: Syk i ZAP-70, respectivament. Els residus de tirosina Tyr348/Tyr352 de la proteïna Syk i Tyr315/Tyr319 de la proteïna ZAP-70 són fosforilats fet que incrementa l'activitat de Syk o ZAP-70 i genera un canvi conformacional que permet l'autofosforilació de les tirosines Tyr525/6 o Tyr492/3 localitzades en els dominis quinasa. Posteriorment, tant Syk com ZAP-

70 s'encarregaran de reclutar-hi altres tirosina quinases i activar-les, engegant així la senyalització posterior¹⁷⁹.

La proteïna Syk es troba expressada en totes les cèl·lules hematopoètiques. Inicialment es va pensar que era una quinasa específica d'aquest tipus cel·lular però més tard es va demostrar que també es trobava expressada en altres teixits com fibroblastes, cèl·lules epitelials, hepatòcits i cèl·lules endotelials¹⁸⁰. Els mamífers també expressen la proteïna homòloga ZAP-70, majoritàriament expressada als limfòcits T i NK. La via de senyalització de Syk es va restringir inicialment als immunoreceptors implicats en la resposta immunològica adaptativa. No obstant, altres estudis revelaren que Syk és també necessària per a diverses funcions del sistema immunològic innat i d'altres funcions no immunològiques, com la resorció òssia pels osteoclasts¹⁷⁹. A més a més, estudis posteriors demostraren que la glicoproteïna VI, un receptor de col·làgen expressat per les plaquetes, també senyalitzava mitjançant un mecanisme semblant i que l'aparició de petèquies en embrions deficientes en Syk era degut a un paper de Syk més enllà d'aquesta resposta immunològica adaptativa¹⁸¹.

En el desenvolupament dels limfòcits B, Syk participa en la transició de les cèl·lules pro-B a cèl·lules pre-B. La pèrdua de Syk per part de les cèl·lules pro-B juntament amb la presència d'altres factors de transformació contribuiria al desenvolupament de la leucèmia aguda limfoblàstica (LAL) pro-B, probablement pel bloqueig dels mecanismes de diferenciació¹⁸².

Un cop completats satisfactòriament els reordenaments dels gens de la IgH en el complex pre-BCR, Syk participaria en la senyalització de la supervivència i proliferació de les cèl·lules pre-B. En aquest cas, s'ha observat com tant una desregulació com una activació constitutiva de Syk afegits a algun event transformador, podrien provocar la transformació de les cèl·lules pre-B al desenvolupament d'una LAL pre-B¹⁸³. Syk també és requerida per dur a terme la maduració de les cèl·lules B immadures i la seva transició per la melsa, però encara no s'ha demostrat cap relació amb la transformació d'aquestes cèl·lules. Finalment, Syk també és necessària per a la supervivència de les cèl·lules B madures normals i tumorals com és el cas de limfomes de limfòcit B i LLC.

L'activació constitutiva de Syk a les cèl·lules d'LLC és responsable de la senyalització derivada del BCR i necessària per a la senyalització derivada de les cèl·lules estromals (com senyals d'adhesió o migració) independentment de la senyalització del BCR. S'ha observat un increment significatiu en l'expressió gènica de SYK en les cèl·lules d'LLC, essent aquesta sobreexpressió major en els casos U-CLL¹⁸⁴. Mirant de buscar una explicació a nivell molecular d'aquest increment en l'expressió gènica, fins ara no s'ha evidenciat cap mutació puntual en SYK, i calen més estudis per tal de saber si l'increment de la seva expressió a nivell d'mRNA és

INTRODUCCIÓ

causat per alguna variant d'SNP (de l'anglès, *singles nucleotide polymorphism*) o alguna modificació a nivell epigenètic¹⁶¹.

2.3.3.3. La proteïna ZAP-70

Syk i ZAP-70, els dos únics membres de la família de quinases Syk, són homòlegs tant estructuralment com funcional. Així com Syk, ZAP-70 està formada per dos dominis SH2 i un domini quinasa a l'extrem carboxi-terminal (Figura 8). A través de l'interdomini A, ZAP-70 s'uneix als segments ITAM fosforilats de les cadenes ζ del TCR, i a través de l'interdomini B es connecten els dominis SH2 amb el domini quinasa¹⁸⁵.

ZAP-70 es troba expressada als limfòcits T i és ben coneguda la seva participació en la senyalització derivada del TCR. Després de l'estimulació antigènica del TCR, la proteïna Lck, associada al coreceptor CD4, s'aproxima al complex del TCR i fosforila els segments ITAM del receptor. A través del contacte amb aquests segments ZAP-70 s'activa i és quan pot ser fosforilada per Lck (de l'anglès, *lymphocyte-specific protein kinase*), que activa l'activitat catalítica de ZAP-70 i la seva autofosforilació. La seva activació significarà la fosforilació de LAT (de l'anglès, *linker of activated T cells*) i SLP-76 (de l'anglès, *SH2 domain-containing leukocyte protein of 76kDa*) que promouran el reclutament d'altres molècules de senyalització que acabaran provocant l'activació, proliferació i diferenciació de la cèl·lula T¹⁸⁶.

Tot i que tant Syk com ZAP-70 es troben expressades durant el desenvolupament del limfòcit T, Syk es troba altament expressada en els estadis més immadurs (progenitors tímics CD4/CD8 negatius) i ZAP-70 es troba expressada a partir dels estadis finals del progenitor tímic CD4/CD8 fins al limfòcit T madur. De totes maneres, es pot trobar l'expressió d'ambdues proteïnes a la vegada en alguns estadis transicionals.

Com hem comentat a l'apartat 2.2.2.4., les cèl·lules d'LLC també poden expressar ZAP-70. Aproximadament un 50% dels pacients amb LLC tenen una elevada expressió de ZAP-70, segons les sèries^{64,130,187}. De fet, l'expressió de ZAP-70 s'ha demostrat el millor marcador substituït de l'estat mutacional de les Igs^{63,64}. Una elevada expressió de ZAP-70 es relaciona amb major probabilitat de progressió i pitjor supervivència, i es manté com a marcador pronòstic independent^{64,69}. Malgrat el valor pronòstic de l'expressió de ZAP-70 en l'LLC, la presència d'aquest gen considerat de progènie T en les cèl·lules d'LLC és considerada ectòpica. A nivell biològic, la seva expressió està associada a un increment de la senyalització derivada del BCR¹⁹⁰. ZAP-70 es pot unir al BCR i incrementar la fosforilació i activació de Syk així com d'altres events posteriors en les diverses vies de senyalització implicades¹⁸⁸. A més a més, ZAP-70 promou la senyalització del BCR independentment de la seva activitat quinasa, el que

suggereix que aquesta proteïna podria funcionar com una proteïna adaptadora per a facilitar la senyalització del BCR o bé competir amb algun regulador negatiu de Syk¹⁸⁹. De totes maneres, els mecanismes pels quals ZAP-70 incrementa l'activació de Syk són encara desconeguts. Sembla ser que facilitaria el reclutament de la quinasa Lyn cap al BCR en els "lipid rafts", donat que s'ha vist un augment de la fosforilació del BCR per Lyn en les cèl·lules ZAP-70¹⁹³.

A més a més, també s'ha demostrat el seu paper en la migració de les cèl·lules d'LLC cap als centres proliferatius. Estudis *in vitro* van demostrar que ZAP-70 promovia l'expressió de CCR7 després de l'estimulació del BCR. Aquest augment d'expressió de CCR7 es va traduir en un augment de la migració cap a la quimioquina CCL21¹³². Posteriorment, estudis *in vivo* van demostrar que ZAP-70 incrementava també la resposta a l'estimulació de CXCR4 promovent la seva senyalització i la infiltració cel·lular al moll de l'os¹³¹.

2.3.4. La proteïna survivina

La survivina, el membre més petit de la família de les proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAPs, de l'anglès *inhibitor of apoptosis protein*), és una proteïna de 16.5kDa formada per 142 aminoàcids que està codificada pel gen *BIRC5* (localitzat a la banda cromosòmica 17q25¹⁹⁰). La survivina es caracteritza per tenir un domini BIR (de l'anglès, *baculovirus IAP repeat*) a l'extrem N-terminal que és essencial per a la seva funció inhibidora de les caspases, i un domini alfa hèlix superenrotllada a l'extrem C-terminal^{195,191} a través del qual s'unirà al complexe passatger del cromosoma (CPC), bàsic per a la formació de l'aparell mitòtic (Figura 9)¹⁹².

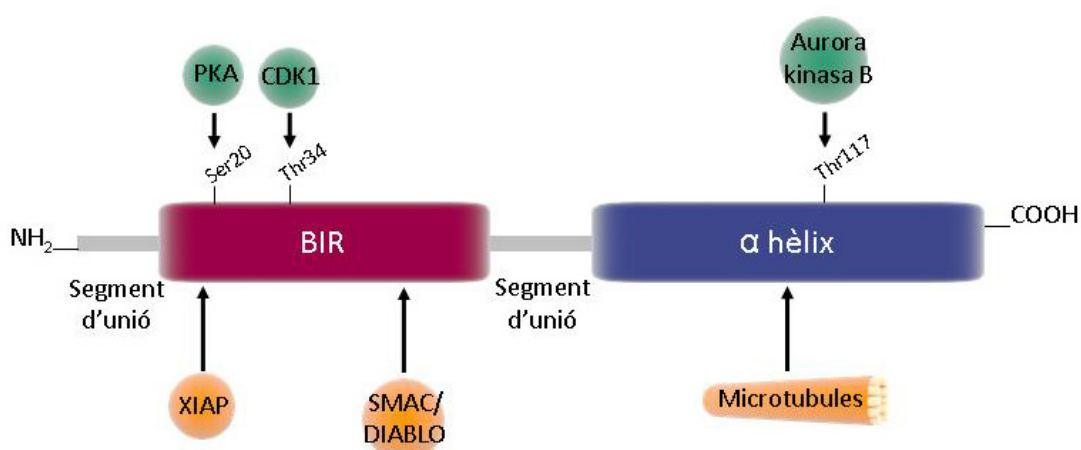


Figura 9 | Estructura esquemàtica i funció de la survivina. La proteïna survivina està formada pel domini BIR (*baculovirus IAP repeat*) a l'extrem NH₂ terminal a partir del qual s'unirà a determinades proteïnes relacionades amb els mecanismes d'apoptosi com XIAP (X-linked IAP) i SMAC/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI*), i pel domini α hèlix a

INTRODUCCIÓ

l'extrem COOH, a través del qual exercirà la seva funció en la mitosi. Els residus Ser20, Thr34 i Thr117 poden ser fosforilats per quinases com PKA (*protein kinase A*), CDK1 (*cyclin-dependent kinase 1*) i l'Aurora kinasa B, respectivament.

La seva expressió, estrictament dependent del cicle cel·lular, es restringeix a la mitosi tot i que en cèl·lules tumorals es pot trobar una elevada expressió en la interfase. Es pot trobar tant en el nucli (formant part de l'aparell mitòtic) com en el citoplasma i el mitocondri. Majoritàriament, es pot trobar en teixits embrionaris i fetals i és indetectable en la major part de teixits madurs, tot i que s'ha observat una baixa expressió en els progenitors hematopoiètics CD34⁺. En canvi, es troba característicament sobreexpressada en teixits tumorals, independentment de l'índex mitòtic, fet que la fa una de les molècules més específica de tumor¹⁹³.

La survivina té dues funcions principals: inhibició de l'apoptosi i regulació de la divisió cel·lular.

La inhibició de l'apoptosi

L'apoptosi (o mort cel·lular programada) està fermament regulada per un equilibri entre els factors proapoptòtics i antiapoptòtics. Un dels tipus de molècules que bloquegen l'apoptosi per unió directa a les caspases són les IAPs¹⁹⁴. Les IAPs constitueixen un conjunt de proteïnes reguladores amb 9 membres: X-linked IAP, cIAP1, cIAP2, proteïna inhibidora de l'apoptosi neuronal, melanoma IAP, IAP-like protein 2, livina, apollon, i survivina^{195,196,197}.

El paper de la survivina en la inhibició de l'apoptosi és complexe. Està regulada tant per múltiples vies de senyalització (que acaben regulant-ne la seva expressió gènica) com per la interacció proteïna-proteïna, com per regulació mitocondrial.

Mentre que molts gens supressors de tumors (*APC*, *TP53*, *FHIT*,...) provoquen el silenciament del promotor del gen *BIRC5*, s'ha observat com determinats oncogens (*TCF4*—catenin, *STAT3*,...) en promouen la seva transcripció. A nivell post-transcripcional, mTOR regula l'estabilitat i translació del pool citosòlic d'mRNA. La via de senyalització PI3K/Akt ha estat freqüentment associada a la modulació dels nivells de survivina i la quinasa CDK1 (de l'anglès, *cyclin dependent kinase 1*) promovent-ne la seva estabilitat durant la mitosi i la unió a xaperones¹⁹³.

D'altra banda, la survivina s'associa a la proteïna antiapoptòtica HBXIP (de l'anglès, *hepatitis B X-interacting protein*) per formar un complexe proteic que s'unirà a la caspasa 9 i acabarà inhibint els mecanismes mitocondrials d'apoptosi. També s'ha demostrat la seva unió amb XIAP, resultant amb l'estabilitat i la inhibició de la degradació proteasòmica d'aquesta molècula¹⁹⁸.

De totes maneres, una sobreexpressió de survivina sembla que provocaria, sobretot, una inhibició de l'apoptosi mitocondrial. Primer, seria transportada cap al mitocondri gràcies a la seva associació amb les xaperones AIP (de l'anglès, *aryl hydrocarbon receptor-interacting protein*) o HSP90 (de l'anglès, *heat shock protein 90*). Un cop al mitocondri s'uniria a Smac/DIABLO, una molècula que inhibint XIAP provoca la mort cel·lular¹⁹⁹. També s'ha demostrat la seva unió a la proteïna antiapoptòtica Bcl2²⁰⁰.

La regulació de la divisió cel·lular

La transcripció de la survivina està controlada per seqüències específiques de la regió promotora, augmentant durant la fase G1 i arribant a un pic a les fases G2-M²⁰¹. Durant la mitosi, la survivina forma part del CPC que inclou les proteïnes Aurora quinasa B, INCENP (de l'anglès, *inner centromere protein antigens*) i borealina. El CPC juga un paper principal en aquest procés, està implicat en la condensació dels cromosomes, la formació del fus mitòtic, la regulació de les interaccions cinetocor-microtúbuls per a la correcta alineació dels cromosomes i el correcte desenvolupament de la citoquinesi^{202,193}.

Recentment, s'ha descrit un subsistema en el procés mitòtic que implicaria també la survivina i la via Ran-GTP (de l'anglès, *Ras-related nuclear protein*). La survivina s'uniria a la molècula efectora de Ran, anomenada XPO1 (de l'anglès, *exportin 1*), que regularia la formació del cinetocor²⁰³.

A més a més, una fracció de la survivina mitòtica s'uneix directament als microtúbuls polimeritzats. En aquesta localització la survivina augmenta l'estabilitat dels microtúbuls a través de la supressió de la seva mobilització, la reducció de la seva nucleació des dels centrosomes, l'increment en el contingut de tubulina acetilada i en la resistència a la seva despolimerització²⁰⁴.

2.3.4.1. La survivina en la Leucèmia Limfàtica Crònica

En un gran nombre de tumors sòlids s'ha detectat una elevada expressió de survivina (entre aquests, esòfag, pulmó, ovaris, sistema nerviós central, mama, colo-rectal, melanoma, gàstric, etc.). Entre les neoplàsies hematològiques, s'ha detectat en limfomes de cèl·lules B, síndrome mielodisplàsica (SMD), leucèmia mieloide aguda (LMA), leucèmia mieloide crònica (LMC) i en LLC. La seva expressió s'ha relacionat amb la progressió metastàsica, la invasió tumoral, la quimioresistència i un pitjor pronòstic (Revisat en¹⁹¹).

A l'LLC, s'han observat uns nivells d'expressió superiors de les IAPs IAP1 i IAP2 en les cèl·lules d'LLC de SP respecte els limfòcits B de donants sans, i a més a més aquests nivells s'han relacionat amb una menor supervivència^{205,206}. Respecte a la survivina, la seva expressió

INTRODUCCIÓ

en cèl·lules d'LLC de SP és una qüestió controvertida. Fins a data d'avui, només un estudi demostra uns nivells d'expressió de survivina superiors en cèl·lules d'LLC respecte limfòcits B de donants sans, i la seva expressió s'ha relacionat amb malaltia progressiva²⁰⁵. Juntament amb l'expressió d'IAP1 també s'ha associat a un pitjor pronòstic²⁰⁵. On sí que s'ha detectat la seva expressió de forma repetida, en aquest cas a nivell d'mRNA és en el moll de l'os dels pacients amb LLC²⁰⁷, el que suggeriria que la seva expressió podria relacionada amb el microambient de la cèl·lula d'LLC. A partir de talls histològics de ganglis limfàtics i moll de l'os es va poder observar de forma molt interessant com l'expressió de survivina es limitava a les cèl·lules d'LLC residents en els centres proliferatius i que, a més a més, les cèl·lules amb survivina estaven proliferant, d'acord amb la positivitat per Ki-67¹⁴⁶. Aquestes troballes s'han confirmat posteriorment, i s'ha relacionat una elevada expressió de survivina en els centres proliferatius amb un estadi clínic més avançat i amb adenopaties bulky²⁰⁸. Per tal d'imitar el microambient de les cèl·lules d'LLC en els òrgans limfoides, Granziero et al van estimular *in vitro* les cèl·lules d'LLC amb el lligand del CD40 que com ja hem explicat anteriorment és un reconegut estímul provinent dels limfòcits T, i van veure com només les cèl·lules d'LLC estimulades eren capaces d'expressar la survivina, mentre l'expressió d'IAP1, IAP2, XIAP no es va modificar¹⁴⁶. Aquestes troballes estableixen, per tant, que la survivina juga un paper important en el conjunt de cèl·lules d'LLC proliferants i la seva expressió es pot veure modulada pels estímuls provinents del microambient.

2.3.4.2. L'antisurvivina (YM155)

El descobriment de l'YM155 o bromur de sepantroni es va donar lloc en els laboratoris de la companyia farmacèutica Astellas Pharma® al 2007²⁰⁹. L'YM155 bloqueja específicament l'activitat del promotor de *BIRC5* amb una IC₅₀ (de l'anglès, *inhibitory concentration*) de 0.54nM. Posteriorment, s'ha observat que l'YM155 s'uneix i bloqueja concretament el factor de transcripció SP1 (de l'anglès, *specificity protein 1*) i el complex ILF3-p54/nrb (de l'anglès, *interleukin enhancer-binding factor 3 - p54/nuclear RNA binding protein*) que s'associen al promotor de *BIRC5*^{210,211}.

No obstant, han estat publicats nous estudis que proclamen efectes biològics de l'YM155 no relacionats amb la inhibició de la expressió de la survivina. Entre aquests efectes s'ha demostrat com l'YM155 redueix tant la transcripció del gen *MCL1* com l'expressió de la proteïna anti-apoptòtica Mcl1 en diversos tipus tumorals com leucèmia promielocítica aguda o mieloma múltiple^{212,213,214}. Tot i que el mecanisme exacte pel qual l'YM155 inhibeix simultàniament la survivina i l'Mcl1 és desconegut, s'ha suggerit que podria estar relacionat

amb el bloqueig d'SP1 ja que totes dues el comparteixen per a la seva regulació transcripcional. Uns altres efectes biològics de l'YM155 que s'han descrit són la inhibició de PI3K, ERK i STAT3 en cèl·lules de tumor de pròstata, l'activació de la degradació proteasòmica de la survivina, XIAP i EGFR (de l'anglès, *epidermal growth factor receptor*) en adenocarcinoma de pàncrees i la inhibició de l'expressió de securina (molècula que regula la mitosi, l'apoptosi i pot actuar com a oncogen en segons quins tumors) en glioblastoma (Revisat en ²¹⁵). Estudis recents també han descrit com l'YM155 podria induir dany en el DNA independentment de la inhibició de la survivina. Concretament, demostren una inducció dosi-dependent de l'expressió de l'histona γ H2AX (resultat de l'alliberament de fragments de doble cadena de DNA produïts arrel del seu trencament) sense inhibició de l'expressió de la survivina en cèl·lules de tumor de pròstata²¹⁶; i també en retardaria la seva reparació després de l'acció de la radiació o quimioteràpia²¹⁷. Aquests resultats tindrien transcendència clínica perquè els agents que indueixen dany en el DNA promouen l'activació de p53, per tant, en aquells tumors on p53 no fos funcional hi hauria resistència al tractament amb YM155. En aquest sentit, experiments amb cèl·lules de càncer de pròstata demostren, justament el contrari, que l'YM155 suprimeix l'expressió de survivina de forma independentment de p53²⁰⁹, per tant, si els efectes anti-neoplàsics de l'YM155 depenen de la funcionalitat de p53 és encara ara una qüestió per resoldre.

S'ha demostrat activitat antitumoral de l'YM155 en una gran varietat de tumors tant *in vitro* com en models animals. Pel que fa a tumors hematològics l'YM155 s'ha testat en monoteràpia en línies cel·lulars i cèl·lules primàries de LLA, de limfoma no Hodgkin (LNH)²¹⁵ i de mieloma múltiple (MM)²¹⁴ i en combinació amb altres fàrmacs com l'alemtuzumab (o, anti-CD52) per al tractament de la LLA-T²¹⁸, i rituximab amb o sense bendamustina²¹⁹ per al tractament del LNH, demostrant-ne la seva eficàcia en induir l'apoptosi. Recentment, també ha estat testada la combinació de l'YM155 amb l'inhibidor d'STAT3 en cèl·lules de limfoma B difús de cèl·lules grans (LBDCG) de tipus ABC (de l'anglès, *activated B cell*). Aquest subtipus de tumor expressa una elevada activitat d'STAT3 i aquest, al seu torn és un inductor de l'expressió de *BIRC5*. La inhibició simultània d'STAT3 amb AG490 o STA-21 i de survivina amb l'YM155, mostraren un efecte sinèrgic a l'hora d'induir apoptosi en aquestes cèl·lules²²⁰.

L'YM155 també ha estat testat en un gran nombre d'assaigs clínics tant en pacients amb neoplàsies sòlides com amb tumors hematològics, entre aquests i principalment LBDCG. Cheson et al²²¹ van observar com, tot i que l'YM155 era ben tolerat i no induïa una toxicitat significativa, la seva activitat com a únic agent terapèutic era molt limitada; és per això, que actualment s'està duent a terme l'assaig clínic amb la combinació d'YM155 i rituximab per al

INTRODUCCIÓ

tractament de LBDCG en recaiguda o refractari (NCT01007292). A dia d'avui, no hi ha cap assaig clínic amb YM155 en pacients diagnosticats d'LLC.

Un últim aspecte a considerar respecte l'YM155 és la seva administració. L'YM155 s'administra per via endovenosa en infusió contínua de 168 hores (7 dies) per la seva eficàcia farmacològica temps-dependent i la ràpida eliminació plasmàtica. Per tal d'aconseguir una administració més convenient, per exemple en bolus setmanal, s'estan avaluant formulacions liposomals amb èxit²²².

2.4. Tractament

El diagnòstic d'LLC no implica necessàriament l'administració de tractament. Generalment, aquells pacients acabats de diagnosticar amb estadis inicials o intermedis (Rai 0-2, Binet A-B) s'han de monitoritzar sense rebre tractament fins que hi hagi evidència de malaltia activa, progressió o aparició de símptomes, definit per les guies de la iwCLL³⁰ (Taula 6).

Taula 6 Criteris de malaltia activa per a l'indicació d'inici de tractament segons la iwCLL³⁰

Fracàs medul·lar progressiu manifestat pel desenvolupament o empitjorament de l'anèmia i/o trombopènia
Esplenomegàlia simptomàtica, progressiva o massiva (≥ 6 cm per sota del marge costal esquerre)
Adenopaties simptomàtiques, progressives o massives (≥ 10 cm de diàmetre longitudinal)
Limfocitosi progressiva: increment $>50\%$ en 2 mesos o TDL <6 mesos, amb exclusió d'altres causes
Anèmia o trombopènia autoimmunes que no responen a tractament immunosupressor
Símptomes constitucionals definits per la presència de ≥ 1 dels símptomes o signes següents: <ul style="list-style-type: none">▪ Pèrdua de pes no justificada $<10\%$ en els últims 6 mesos▪ Astènia (ECOG/PS >2)▪ Febre $>38^{\circ}\text{C}$ durant més de 2 setmanes sense evidència d'infecció▪ Sudoració nocturna durant més d'1 mes sense evidència d'infecció

La limfocitosi aïllada o la hipogammaglobulinèmia sense infeccions de repetició no són criteris de tractament. Els pacients que presenten una elevada limfocitosi rarament presenten símptomes relacionats. De la mateixa manera, fins al moment, no hi ha consens en l'ús de marcadors genètics addicionals a l'hora de definir la indicació de tractament.

2.4.1. Tractaments convencionals

El tractament dels pacients amb LLC ha millorat molt durant les últimes dècades, hi ha hagut una transició de les teràpies basades en un sol agent alquilant als anàlegs de nucleòsids, a les combinacions amb ambdós agents i, més recentment, a la immunoquimioteràpia. Ara bé, a l'hora d'establir l'estratègia terapèutica del pacients amb LLC s'han de considerar diversos factors. En primer lloc, l'LLC segueix essent una malaltia incurable amb un curs caracteritzat per molts anys de tractaments i recaigudes, el que porta a que les estratègies de tractament han de dissenyar-se a llarg terme, tenint en compte que els pacients probablement necessitaran diverses línies de tractament. A més a més, aquesta malaltia afecta majoritàriament pacients d'edat avançada el que significa que poden presentar també malalties concomitants que podrien condicionar una major toxicitat associada al tractament. Finalment, algunes alteracions biològiques, especialment alteracions de *TP53*, s'associen a quimioresistència el que condicionarà també la nostra actitud terapèutica.

2.4.1.1. Tractament quimioteràpic

Agents citostàtics

Durant dècades, la monoteràpia amb agents alquilants han servit com a tractament de primera línia de l'LLC, en concret el **clorambucil**, que ha estat considerat el tractament "*Gold standard*" durant molts anys²²³. Fins i tot en l'actualitat, aquesta droga pot ser una opció apropiada, especialment en pacients grans amb comorbilitats no candidats a tractaments més intensius. Els avantatges del clorambucil són la seva baixa toxicitat, baix preu i administració via oral. El desavantatge més gran és la seva baixa o inexistent taxa de CRs i alguns efectes adversos que poden arribar a aparèixer si es pren durant molt de temps (citopènies, mielodisplàsia i leucèmia aguda secundària).

Tres anàlegs de purines s'estan utilitzant actualment per al tractament de l'LLC: la fludarabina, la pentostatina i la cladribina (2-CdA). La **fludarabina** és el component més extensament estudiat dels tres. Com a monoteràpia, la fludarabina produeix una més alta taxa d'OR (de l'anglès, *overall response*) que altres tractaments amb agents alquilants i corticoesteroides. Quan va ser comparada amb altres règims quimioteràpics com CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina i prednisona), CAP (ciclofosfamida, adriamicina i prednisona) o clorambucil induïa més CRs (7-40%) però no millorava l'OS quan era utilitzada en monoteràpia (Revisat en²²⁴).

INTRODUCCIÓ

Més recentment, la **bendamustina**, un altre agent alquilant, va ser comparada amb el clorambucil en un estudi randomitzat. La bendamustina millorava la taxa de respostes però amb una major toxicitat i sense aportar cap millora en l'OS²²⁵.

Quimioteràpia en combinació

Amb la finalitat de millorar els resultats de la monoteràpia, diversos estudis van avaluar la combinació de fludarabina amb altres agents quimioteràpics, principalment amb la ciclofosfamida. Aquesta combinació va obtenir unes taxes d'OR d'entre el 74% i el 94%, significativament millors que la fludarabina en monoteràpia, amb una PFS d'entre 32-48 mesos, segons l'estudi^{86,226,227}.

Tot i això, no es va observar millora en l'OS, respecte la fludarabina en monoteràpia, és per això que es va estudiar la combinació de fludarabina i ciclofosfamida afegint mitoxantrone, una antraquinona amb capacitat d'inhibir la topoisomerasa II. Tot i que no hi ha un estudi randomitzat que compari aquesta combinació amb FC o fludarabina en monoteràpia, es va observar com l'esquema FCM va resultar efectiu tant en pacients en primera línia de tractament com en aquells recaiguts o refractaris, amb negativització de la MMR^{228,229,230}.

Rituximab

El CD20 és una fosfoproteïna de membrana expressada pels limfòcits B madurs. La proteïna no té cap lligand natural conegut i la seva funció és, per ara, desconeguda. Es sospita que actuaria com a canal de calci de la membrana cel·lular. El rituximab és un anticòs monoclonal (mAb, de l'anglès *monoclonal antibody*) tipus IgG1 quimèric que indueix la mort de les cèl·lules d'LLC principalment per les anomenades citotoxicitats cel·lulars dependents d'anticòs i del complement (ADCC, de l'anglès *antibody-dependent cellular cytotoxicity* i CDC, *complement-dependent cytotoxicity*) després de la unió al CD20²³¹. Donat que el CD20 és expressat per la majoria de neoplàsies de limfòcit B, la introducció el 1998 de l'anticòs monoclonal anti-CD20, **rituximab**, va millorar el tractament dels NHL-CD20⁺, incloent l'LLC.

En aquest sentit, el rituximab és menys actiu en monoteràpia en l'LLC que en el limfoma fol·licular, a no ser que s'utilitzin unes dosis molt més elevades^{232,233}. En canvi, les combinacions de rituximab amb quimioteràpia han demostrat ser teràpies molt eficaces per a l'LLC, com es menciona posteriorment.

Alemtuzumab

L'anticòs monoclonal anti-CD52, **alemtuzumab**, està aprovat per al tractament de primera línia d'LLC i en pacients refractaris al tractament amb fludarabina²³⁹. Un estudi fase III va comparar l'alemtuzumab amb el clorambucil en pacients no tractats prèviament. Aquest

estudi va demostrar que el tractament amb alemtuzumab obtenia una taxa superior de OR i supervivència (OR 83% vs. 56%; $P < 0.001$ i CR 24% vs. 2%; $P < 0.001$)²³⁴.

2.4.1.2. Immunoquimioteràpia

Les combinacions d'anàlegs de purines, en general la fludarabina, amb agents alquilants i anticossos monoclonals han demostrat ser els tractaments que obtenen una major taxa de respostes i més perllongades. Estudis preclínic van demostrar que l'exposició de les cèl·lules d'LLC a fludarabina i ciclofosfamida induïa una citotoxicitat sinèrgica²³⁵. Posteriorment, aquesta sinergia també es va poder demostrar amb la combinació *in vitro* de rituximab i fludarabina²³⁶, fet que va promoure la recerca d'aquesta combinació en assaigs clínics.

RFC (rituximab, fludarabina i ciclofosfamida)

Diversos estudis aleatoritzats demostren que aquesta combinació és l'esquema de tractament més eficaç^{237,238}. El grup alemany GCLLSG va comparar l'esquema RFC amb FC, obtenint una taxa d'OR del 92.8% i 85.4% i de CR del 44.5% i 22.9%, respectivament. La PFS als 2 anys va resultar del 76.6% en el braç RFC vs. 62.3% en braç FC ($P < 0.01$). També van observar com l'efecte positiu de l'RFC aplicava per a tots els subgrups citogenètics de risc, excepte aquells pacients amb del17p²³⁷.

Donat que l'LLC sovint es dona en pacients grans amb comorbiditats, un nou esquema adaptat de l'RFC es va dissenyar per tal d'intentar mantenir l'eficàcia però amb menor toxicitat que l'RFC estàndard. Aquest règim reduïa les dosis dels citostàtics (fludarabina 20mg/m² i ciclofosfamida 150mg/m²) i incrementava la dosi del rituximab (dia 1 cicle 1 a 375mg/m²; dia 1 i 14 dels cicles 2-5 a 500 mg/m²). La taxa de CR va ser del 77% i la taxa d'OR del 100%. Neutropènia grau 3/4 va estar reportada en només el 13% dels cicles, el que és menys que l'observada amb l'RFC convencional²³⁹.

RFCM (rituximab, fludarabina, ciclofosfamida i mitoxantrone)

En un altre estudi es va combinar mitoxantrone amb l'FCR. La taxa d'OR, MMR negativa i CR, MMR positiva i CR, i PR (de l'anglès, *partial response*) van ser del 93%, 46%, 36% i 11%, respectivament²⁴⁰.

PCR (pentostatina, ciclofosfamida i rituximab)

Per tal de disminuir la mielotoxicitat derivada de la fludarabina, es va provar de substituir-la per la pentostatina. Un estudi randomitzat fase III va comparar FCR amb PCR va observar que no hi havia diferències pel que fa a la taxa de respostes i a la supervivència entre

INTRODUCCIÓ

els dos esquemes. A més a més, no es va poder demostrar una menor incidència d'infeccions a la branca de PCR²⁴¹.

BR (bendamustina i rituximab)

La combinació BR s'ha comparat amb l'esquema RFC pel grup alemany GCLLSG en l'assaig clínic fase III randomitzat CLL10. Segons els resultats provisionals de l'anàlisi, amb una mediana de seguiment de 27.9 mesos, l'esquema RFC sembla més eficaç que el BR com a primera línia de tractament amb una major taxa de CR i majors PFS i EFS (de l'anglès, *event-free survival*), tot i presentar més efectes adversos, particularment neutropènia i infeccions²⁴².

Combinacions amb Alemtuzumab

Dos estudis randomitzats fase III han comparat la combinació d'alemtuzumab amb fludarabina amb o sense ciclofosfamida. L'assaig clínic dut a terme pel grup francès, va comparar l'esquema FCA (fludarabina, ciclofosfamida i alemtuzumab) vs. FCR com a primera línia de tractament, però es va haver de tancar prematurament per l'elevada toxicitat i mortalitat relacionada amb el tractament observades amb la branca d'FCA²⁴³. L'altre assaig clínic va comparar la combinació FA (fludarabina, alemtuzumab) amb la fludarabina en monoteràpia tant per a pacients no tractats com per a refractaris o recaiguts. En aquest cas la supervivència tant PFS com OS van resultar superiors per a la branca FA (PFS 23.7 vs. 16.5 mesos i OS no aconseguida vs. 52.9 mesos, respectivament). Significament, els pacients en el grup FA tingueren més infeccions per citomegalovirus (CMV) i mielotoxicitat²⁴⁴.

2.4.2. Nous tractaments

El coneixement dels mecanismes biològics de l'LLC ha crescut considerablement en els últims anys, però només estem en els inicis de començar a utilitzar aquests coneixements a l'hora de decidir una nova aproximació terapèutica. De totes maneres, l'enorme quantitat de noves teràpies que actuen de manera diferent a la clàssica quimioteràpia són molt prometedores.

2.4.2.1. Nous anticossos monoclonals

Darrerament, diversos mAbs han estat investigats en assaigs clínics en pacients amb LLC. Entre aquests els mAbs anti-CD20 són els més importants, però altres mAbs dirigits a limfòcits B han estat desenvolupats i investigats en estudis preclínic i assaigs clínics. Aquests anticossos inclouen anti-CD37, anti-CD19 i anti-CD40 (Taula 7).

Taula 7 Nous anticossos monoclonals per al tractament de l'LLC²⁴⁵

mAb	Diana	Característiques de l'anticòs	Aplicació clínica / Assaigs clínics
Ofatumumab (HuMax-CD20; Azerra, Glaxo SmithKline)	CD20	Tipus I, 2a generació, IgG1 humà, unió a diferents epítops que el rituximab CDC més efectiva i menys ADCC, respecte el rituximab	Aprovat el 2009 per l'FDA per a pacients refractaris a fludarabina o alemtuzumab Aprovat el 2010 per l'EMA, amb indicació similar
Obinutuzumab (GA-101, F. Hoffmann-La Roche)	CD20	Tipus II, 3a generació, glico-enginyeria, humanitzat IgG1 ADCC i citotoxicitat directa més efectives que el rituximab	Aprovat el 2013 per l'FDA en combinació amb clorambucil en primera línia
Veltuzumab (IMMU-106, Immunomedics, Inc.)	CD20	Tipus I, 2a generació, humanitzat IgG1, unió a diferents epítops que el rituximab ADCC més efectiva i menys CDC, major afinitat per FcγRIIIa i RIIIa	Fase I/II en pacients naïf/prèviament tractats de neoplàsies CD20 ⁺²⁴⁶
BI 836826 (Mab 37.1; Boehringer Ingelheim)	CD37	IgG1 quimèric, enginyeria-Fc per a millorar ADCC i afinitat a FcγRIIIa	Fase I en pacients naïf (NCT01296932)
Otlertuzumab (TRU-016; Emergent BioSolutions Inc.)	CD37	Cadena única homodimèrica produïda per la plataforma de ADAPTIR TM	Fase I en pacients refractaris o recaiguts ²⁴⁷
MOR208 (XmAb5574; MorphoSys AG)	CD19	IgG1 humanitzada amb un fragment constant Fc dissenyat per a augmentar l'afinitat a FcγRIIIa	Fase II en pacients refractaris o recaiguts (NCT02005289)
Lumiliximab (Biogen Idec)	CD23	Quimèric macaco-humà anti-humà d'alta afinitat	Fase II/III en combinació amb FCR en primera línia ²⁴⁸
Lucatumumab (HCD122; Novartis Pharm.)	CD40	Humà, bloqueja les interaccions CD40/CD40L	Fase I pacients en recaiguts ²⁴⁹
Dacetuzumab (SGN-40, Seattle Genetics)	CD40	IgG1 humanitzat, agonista parcial	Fase I en pacients refractaris o recaiguts (NCT00283101)

2.4.2.2. Immunomoduladors

La lenalidomida és un agent immunomodulador anàleg de segona generació de la talidomida amb propietats antiangiogèniques i un que s'utilitza per al tractament del mieloma

INTRODUCCIÓ

múltiple i síndrome mielodisplàtica, i actualment està essent investigat per al tractament de l'LLC. Estudis amb lenalidomida com a únic agent en pacients amb LLC en recaiguda demostren una taxa d'OR del 32% al 58% segons l'estudi, observant una característica reacció "*tumor-flare*" (sensació de tumefacció en els ganglis limfàtics) en el 58% dels pacients^{250,251}.

Experiments amb models animals van permetre observar com el tractament amb lenalidomida està associat a l'expansió de cèl·lules immunitàries efectores i un increment en l'ADCC pel rituximab, aquestes observacions van conduir a testar la combinació d'aquest agent immunomodulador amb anticossos monoclonals en assaigs clínics. El grup CLL Research Consortium va realitzar un assaig clínic fase II per tal d'avaluar l'eficàcia i seguretat de la combinació lenalidomida i rituximab en pacients no tractats prèviament. La toxicitat grau III/IV més freqüent va ser neutropènia (58% dels pacients). El 74% dels pacients va patir "*tumor flare*". La taxa d'OR va ser del 88% incloent 16% de CR i 10% de PR nodul·lars. Amb una mediana de seguiment de 20 mesos, no es va poder calcular la mediana de PFS. Per tant, aquesta combinació semblaria una opció terapèutica eficaç i tolerable²⁵².

Actualment, també s'està avaluant l'eficàcia i seguretat del tractament amb lenalidomida en pacients d'alt risc en consolidació després de la primera línia de tractament²⁵³ (NCT01556776).

2.4.2.3. Inhibidors de tirosina quinases

Com hem comentat anteriorment, les cèl·lules d'LLC reben estímuls antiapoptòtics i proliferatius en el MO i GL. En els últims anys, la recerca de nous fàrmacs s'ha focalitzat en l'estudi del bloqueig d'aquests senyals provinents del microambient. Alguns dels principals nous agents que interfereixen amb les interaccions amb el microambient són els inhibidors de quinases implicades en la senyalització derivada del BCR com són Btk, PI3K i Syk (Figura 10).

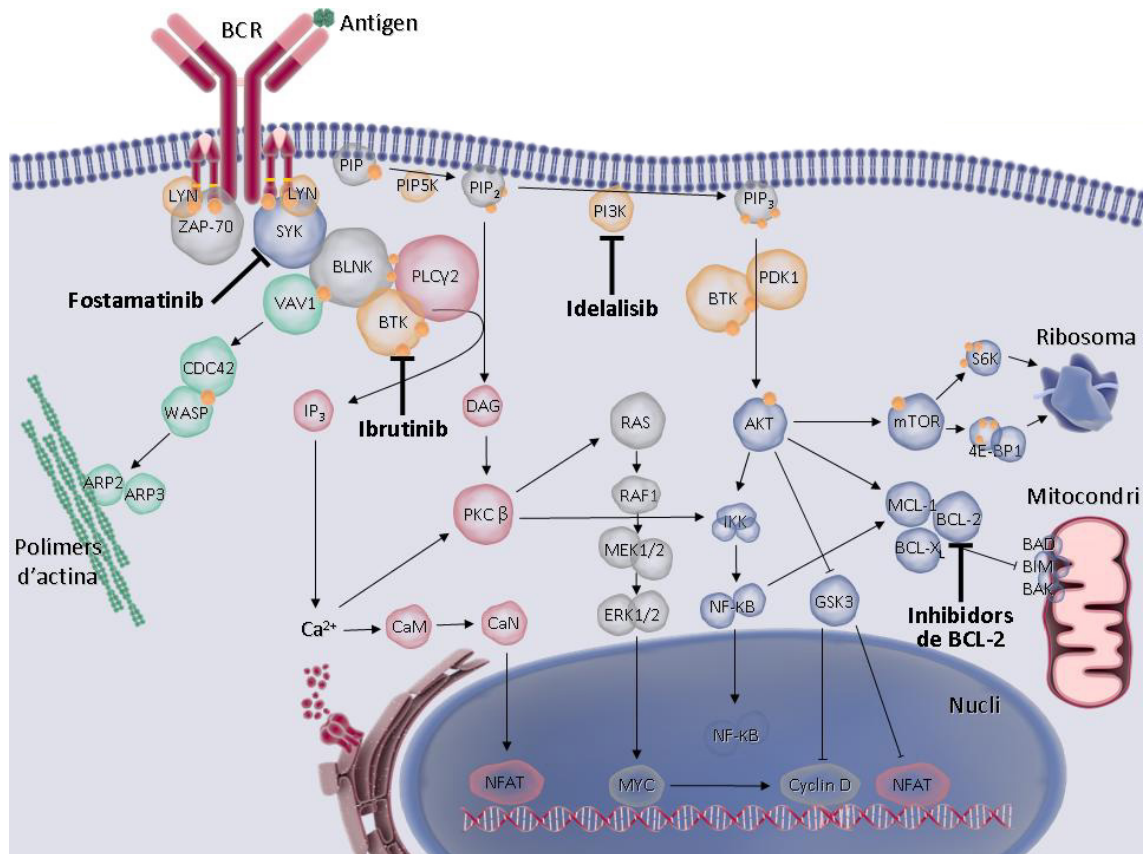


Figura 10 | Representació esquemàtica de la senyalització derivada del BCR i principals opcions terapèutiques. BCR, B cell receptor; LYN, Lck/Yes novel tyrosine kinase; ZAP-70, zeta-associated protein 70; SYK, spleen tyrosine kinase; BLNK, B cell linker protein; BTK, Bruton tyrosine kinase; PLCγ2, phospholipase C-gamma; PIP, phosphatidylinositol; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase; PDK1, pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 1; CDC42, cell division control protein 42 homolog; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein; ARP2/3, actin-related proteins 2/3; IP₃, inositol-1,4,5-triphosphate; Ca²⁺, Calmodulin; CaM, Calcineurin; NFAT, nuclear factor of activated T cells; DAG, diacylglycerol; PKCβ, protein kinase C beta; Ras, rat sarcoma; MEK1/2, mitogen-activated protein kinase kinase 1/2; ERK1/2, mitogen-activated protein kinase 3/1; AKT, protein kinase B; IKK, inhibitor of kappa B kinase; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; GSK3, glycogen synthase kinase 3; MCL1, induced myeloid leukemia cell differentiation protein; BCL2, B cell lymphoma 2; BCL-X_L, B cell lymphoma extra-large; BAD, BCL2-associated death promoter; BIM, BCL2-like protein 11; BAK, BCL2 homologous antagonist/killer; mTOR, mammalian target of rapamycin; S6K, ribosomal protein S6 kinase; 4E-BP1, 4E-binding protein 1.

Dasatinib

El dasatinib és un inhibidor reversible de quinases Src i Abl que va ser dissenyat com a inhibidor de segona generació per al tractament de la leucèmia mieloide crònica perquè inhibeix la quinasa quimèrica resultant de la t(9;22)(q34;q11.2) BCR-Abl. Experiments *in vitro* van demostrar que induïa apoptosi en cèl·lules d'LLC i que incrementava els efectes apoptòtics de diversos agents com la fludarabina, el clorambucil, el sorafenib, l'inhibidor d'HSP90 17-DMAG, la dexametasona o l'inhibidor de Bcl-2, ABT-737 (Revisat en²²⁴). Un estudi fase II va estudiar l'eficàcia de dasatinib en monoteràpia en 15 pacients refractaris o recaiguts. El 60% d'aquests pacients tenien característiques de mal pronòstic que incloïen del17p i del11q. La

INTRODUCCIÓ

major part de les respostes es van obtenir per reduir el tamany ganglionar més que els recomptes limfocitaris. 9 pacients van obtenir respostes ganglionars, però només 3 PR. Per tant, semblaria que el dasatinib és efectiu en la reducció de la massa tumoral ganglionar però menys en els limfòcits de SP²⁵⁴.

Ibrutinib

Btk és una tirosina quinasa intracitoplasmàtica de la família Tec, que és ràpidament activada per Lyn o Syk un cop estimulat el BCR, resultant en l'activació de la senyalització d'NFkB, proliferació i diferenciació (Figura 10). A més a més, Btk està implicada en la regulació de la migració i adhesió via CXCR4/CXCR5 i la senyalització derivada d'integrines²⁵⁵.

L'ibrutinib, també anomenat PCI-32765, és un inhibidor irreversible de la fosforilació i activació de Btk que va ser desenvolupat el 2007. Altres inhibidors de Btk que estan en fase de desenvolupament clínic són CC-292 (AVL-292, NCT01351935), ONO-4059 (NCT01659255) i ACP-196 (NCT02029443).

Experiments *in vitro* van demostrar que el tractament de cèl·lules d'LLC amb ibrutinib induïa mort cel·lular de forma variable i modesta. De fet, l'ibrutinib té poc efecte en la viabilitat de les cèl·lules d'LLC però en canvi és capaç de revertir els efectes protectors del CD40L, BAFF, TNF- α , IL-6, IL-4²⁵⁶ i de l'estimulació del BCR²⁵⁷. L'ibrutinib inhibeix la proliferació de les cèl·lules d'LLC, la quimiotaxi cap a CXCL12 i CXCL13, l'adhesió mediada per integrines i la secreció de les quimioquines CCL3 i CCL4 per part de la cèl·lula d'LLC^{257,258}. L'ibrutinib també s'ha mostrat eficaç en reduir la massa tumoral en models murins d'LLC²⁵⁹.

Tant en els models murins com en els assaigs clínics, típicament, els individus tractats tenen una resposta clínica inesperada després del tractament amb ibrutinib: una ràpida (en uns dies) i sostinguda reducció de les adenopaties que s'acompanya d'una limfocitosi transitòria. Aquesta resposta clínica reflexaria un bloqueig en la retenció de les cèl·lules d'LLC en el microambient tumoral per la inhibició dels mecanismes d'adhesió i migració mediats per les integrines i quimioquines com a resultat de l'estimulació del BCR. L'ibrutinib provocaria la sortida de les cèl·lules d'LLC dels GL i MO, augmentant temporalment el recompte dels limfòcits en SP. Un cop a la SP, les cèl·lules d'LLC es trobarien desprotegides de les interaccions amb el microambient pel que es veurien conduïdes a l'apoptosi espontània o induïda pel tractament.

Un estudi fase Ib/II en pacients recaiguts o refractaris amb LLC va demostrar com l'ibrutinib tenia uns efectes secundaris tolerables predominantment grau 1 o 2, sorprenentment, la taxa d'OR va ser del 71% i un 20% addicional tenia PR amb limfocitosi. La resposta va resultar comparable en els diferents grups de risc genòmic, incloent els pacients

amb del17p. Als 26 mesos de seguiment, la PFS era del 75% i l'OS del 83%²⁶⁰. Posteriorment, un altre estudi fase Ib/II va testar l'ibrutinib en primera línia de tractament en pacients majors de 65 anys. Després d'un seguiment de 22.1 mesos, 21 dels 31 pacients inclosos van aconseguir una resposta, el 13% CR, un pacient PR ganglionar i el 55% PR. Les taxes de PFS i OS van ser del 96%²⁶¹.

Actualment, múltiples estudis estan avaluant l'eficàcia de la combinació de l'ibrutinib amb altres agents. La combinació d'ibrutinib amb rituximab ha estat avaluada en un assaig fase II en pacients d'alt risc (50% del17p) i amb resultats molt encoratjadors. La taxa d'OR en aquells malalts amb del17p o mutació de *TP53* va ser del 90% (16 RP, 2 RC) i la PFS als 18 mesos va resultar del 72.4%²⁶². De fet, aquesta combinació s'està avaluant en estudis randomitzats fase III comparant-la amb l'esquema FCR (NCT02048813) o amb l'esquema BR o ibrutinib en monoteràpia (NCT01886872). L'addició de l'ibrutinib a l'esquema BR ha estat testada en un estudi fase Ib en pacients refractaris o recaiguts. Curiosament, la limfocitosi inicial i transitòria observada després del tractament amb ibrutinib en monoteràpia es va observar només en el 27% dels pacients. Amb una mediana de seguiment de 16 mesos, l'OR va ser del 93% i un pacient més va aconseguir PR amb limfocitosi. La resposta va resultar independent de les característiques d'alt risc i la toxicitat va ser tolerable. La PFS estimada als 12 mesos va ser del 90%²⁶³. Un altre assaig clínic fase Ib/2 està avaluant l'eficàcia i seguretat de la combinació ibrutinib i ofatumumab (NCT01217749). Els resultats preliminars indiquen que la combinació està ben tolerada amb una taxa d'OR del 83%²⁶⁴. Recentment, han estat publicats els resultats de l'estudi randomitzat que comparava ibrutinib vs. ofatumumab que demostren com l'ibrutinib millora significativament tant les respostes com la supervivència del pacients recaiguts o refractaris d'LLC respecte l'ofatumumab en monoteràpia²⁶⁵.

Idelalisib

Les quinases PI3K es subdivideixen en 3 classes. Les de classe I són p110 α , p110 β , p110 δ i p110 γ . Tant la p110 α com la p110 β estan presents en la majoria de teixits humans, en canvi les p110 δ i p110 γ es troben preferentment en els leucòcits. Mentre els ratolins p110 γ -/- mostren alteracions en els limfòcits T, els ratolins p110 δ -/- tenen menys limfòcits B madurs i la seva proliferació és menor. Donat que els limfòcits B per tant, són altament dependents de l'isoforma p110 δ es va considerar que seria una bona diana terapèutica²⁶⁶. A més a més, a nivell de l'LLC la via PI3K es troba activada constitutivament i dependent de p110 δ ²⁶⁷.

Els primers experiments *in vitro* amb l'inhibidor de PI3K δ anomenat GS-1101 o idelalisib, van mostrar com induïa apoptosi en cèl·lules primàries d'LLC sense fer-ho en limfòcits T o NK. A més a més, l'idelalisib inhibia la quimiotaxi envers CXCL12 i CXCL13, la

INTRODUCCIÓ

migració per sota de les cèl·lules estromals, o pseudoemperipolesi, la secreció de quimioquines induïda per l'estimulació del BCR i inhibia els senyals d'activació derivats del BCR o dels receptors de quimioquines²⁶⁸.

Un estudi fase I va avaluar l'eficàcia de l'idelalisib en pacients recaiguts o refractaris amb LLC. El 36% dels pacients tenien del17p. Les toxicitats grau ≥ 3 observades més freqüents van ser pneumònia (20%), febre neutropènica (11%) i diarrea (6%). La taxa d'OR va ser del 72% amb el 39% amb PR i un 33% amb PR i limfocitosi. La mediana de la PFS va ser de 15.8 mesos²⁶⁹.

La combinació d'idelalisib amb rituximab va ser avaluada en un assaig clínic fase III on es va comparar amb rituximab i placebo en pacients recaiguts o refractaris. La combinació de l'idelalisib amb rituximab va millorar significativament les taxes de resposta i la supervivència dels pacients respecte el grup control. La mediana de la PFS va ser de 5.5 mesos en el grup control mentre que no es va assolir en el grup de l'idelalisib ($P < 0.001$)²⁷⁰. Així com les combinacions d'ibrutinib, les combinacions amb idelalisib també està essent àmpliament estudiada. Un estudi fase I va comparar l'addició de l'idelalisib amb bendamustina, BR, fludarabina, clorambucil o CR (Clorambucil i rituximab). Després d'una mediana de temps de tractament amb idelalisib de 12.8 mesos la taxa d'OR va ser del 82% amb una taxa de CR del 10%. La taxa d'OR en els malalts amb del17p o mutació de TP53 va ser del 68% respecte el 87% en aquells malalts sense cap alteració genètica. La PFS estimada va ser del 57% als 24 mesos²⁷¹.

Fostamatinib

Com ja hem comentat anteriorment, la proteïna Syk pertany a la família de quinases no-receptores Syk/ZAP-70, i activa la senyalització derivada del BCR, de receptors de quimioquines i integrines, el que suggereix que Syk té un paper important en la migració i retenció dels limfòcits B en els teixits limfoides (Figura 10).

El fostamatinib (R788) és un inhibidor de Syk que s'administra via oral i és ràpidament processat a la seva forma bioactiva anomenada R406²⁷². Experiments *in vitro* van mostrar com l'R406 inhibia la migració, la secreció de quimioquines, la senyalització derivada del BCR i induïa apoptosi en les cèl·lules d'LLC revertint els efectes protectors de les cèl·lules estromals^{273,267,274,275}. La inhibició de Syk amb l'R788 també es va investigar en el model transgènic murí d'LLC, E μ -TCL1, i van observar com l'R788 era capaç d'inhibir la senyalització del BCR *in vivo*, reduint la proliferació i la supervivència de les cèl·lules tumorals i incrementant significativament la supervivència dels ratolins. L'efecte de l'R788 va ser selectiu en les cèl·lules tumorals donat que la producció de limfòcits B normals es va mantenir inalterada²⁷⁶.

Clínicament, el fostamatinib ha estat testat en un assaig clínic fase I/II en pacients diagnosticats d'LLC entre d'altres síndromes limfoproliferatives B. D'11 pacients amb LLC tractats amb fostamatinib, 6 van obtenir PR, 2 malaltia estable i 3 van progressar. La PFS va resultar de 6.4 mesos (intervall de confiança del 95%, 2.2-7.1)^{277,278}. No hi ha nous assaigs clínics en LLC amb aquest fàrmac, fins ara la recerca s'ha centrat en l'artritis reumatoide.

Altres inhibidor de Syk estan sota desenvolupament preclínic demostrant gran eficàcia en inhibir la senyalització derivada del BCR i induint apoptosi en cèl·lules d'LLC^{267,279,280,281}. El GS-9973 o entospletinib, també ha estat testat clínicament en un assaig clínic fase II en pacients recaiguts o refractaris amb LLC i LNH-B. Es van incloure 42 pacients amb LLC, l'OR en aquest subgrup de pacients va ser del 61%, 25 pacients van obtenir PR i cap pacient va assolir CR, i la mediana de la PFS va ser de 6.4 mesos²⁸².

2.4.2.4. Inhibidors de BCL-2

BCL-2 és una proteïna antiapoptòtica clau que inhibeix la via intrínscica mitocondrial de l'apoptosi i es troba sobreexpressada a l'LLC^{283,284}. Per aquest motiu, va ser considerada una adient diana terapèutica en aquesta malaltia. La primera generació d'inhibidors de BCL-2, com el navitoclax (ABT-263), tot i que van obtenir una eficàcia antileucèmica important els pacients presentaven greu trombopènia per la inhibició simultània de la proteïna Bcl-XL²⁸⁵. Més recentment, s'han desenvolupat nous i més selectius inhibidors de BCL-2, el més important dels quals és l'ABT-199.

Estudis preclínic mostren com l'ABT-199 és 100 cops més selectiu per a BCL-2 que Bcl-XL. Aquesta selectivitat és consistent amb els resultats preliminars de l'assaig clínic fase I on es demostren altes taxes de resposta en pacients refractaris o recaiguts amb LLC sense evidència de trombopènia²⁹⁹.

Actualment, s'estan duent a terme nombrosos assaigs clínics amb ABT-199 en pacients amb LLC, tant en monoteràpia^{286,287}, com en combinació amb rituximab²⁸⁸, obinutuzumab²⁸⁹ i bendamustina i rituximab²⁹⁰.

2.4.2.5. CARs

Els CARs (de l'anglès, *chimeric antigen receptors*) són proteïnes de fusió que incorporen un domini de reconeixement a un antígen i un altre d'activació de cèl·lules T²⁹¹. Les cèl·lules T poden ser genèticament modificades per a expressar CARs i ser transferides als pacients^{292,293}. Els CARs dirigits a l'antígen de limfòcits B, CD19, són els que han estat investigats més àmpliament^{292,294}. Diversos grups, estan realitzant assaigs clínics amb CARs de

INTRODUCCIÓ

cèl·lules T anti-CD19 autòlogues en pacients amb LLC resultats encoratjadors, s'han observat unes taxes de CR considerables i sostingudes tot i que el nombre de pacients analitzats és baix i la durada de seguiment limitada^{295,296,297}.

2.4.3. El trasplantament de progenitors hematopoètics

2.4.3.1. El trasplantament autòleg de progenitors hematopoètics

Estudis randomitzats avaluant l'eficàcia del trasplantament autòleg en front del tractament immunoquimioteràpic van observar com, tot i que el trasplantament oferia una PFS més llarga, això no es traduïa en una major OS. A més a més, la presència d'alteracions genètiques de mal pronòstic com és la del17p mantenien el seu valor pronòstic desfavorable^{298,299}. Per tant, tot i que el trasplantament autòleg pot oferir respostes més llargues, sembla no oferir cap benefici en l'OS respecte l'immunoquimioteràpia.

2.4.3.2. El trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics

El trasplantament al·logènic de progenitors hematopoètics (Al·lo-TPH) és considerat el tractament d'elecció en els pacients amb LLC d'alt risc que compleixin els següents criteris: refractarietat a anàlegs de purina, recaiguda en menys de 2 anys després d'un tractament de combinació amb un anàleg de purina i/o del17p o mutacions en *TP53*³⁰⁰.

La base teòrica per a l'ús de l'al·lo-TPH és l'activitat "empelt vs. leucèmia" (GVL, de l'anglès *graft vs. leukemia*). S'ha vist que la presència de malaltia de l'empelt contra l'hoste crònica (GVHD, de l'anglès *graft vs. host disease*) s'associa a manteniment de la MMR negativa i menor risc de recaiguda. A més a més, factors de mal pronòstic com U-CLL, del17p o mutacions en *TP53* i refractarietat al tractament amb fludarabina no afecten adversament a la PFS i OS després de al·lo-TPH³⁰¹. Per tal d'aconseguir l'efecte GVL, majoritàriament s'utilitza l'acondicionament d'intensitat reduïda (TIR) que és molt menys tòxic que els tradicionals règims d'acondicionament mieloablatiu i permet oferir aquest procediment a pacients d'edat avançada o amb comorbilitats. La mortalitat no relacionada amb la recaiguda després de l'al·lo-TIR en malalts amb LLC és d'un 15-30% durant els primers 2 anys després del trasplantament, i principalment és deguda a complicacions de GVHD aguda i crònica. L'impacte de la GVHD crònica va més enllà de la mortalitat no relacionada amb la recaiguda, és el major determinant d'afectació de la qualitat de vida després de l'al·lo-TPH (revisat a³⁰²).

La influència negativa de marcadors de mal pronòstic com del17p o mutacions en *TP53* no ha estat validada en estudis randomitzats. De totes maneres, un sistemàtic metaanàlisi usant el model de Markov va trobar avantatges per a l'al·lo-TPH³⁰³.

Amb l'aparició dels nous fàrmacs (preferentment, inhibidors de tirosina quinases) els criteris tradicionals que defineixen l'LLC d'alt risc poden deixar de ser vàlids en els propers anys. Encara no hi ha cap informació respecte l'impacte potencial de les noves drogues en el pronòstic d'un al·lo-TPH posterior, com tampoc no hi ha informació validada respecte l'eficàcia a llarg terme d'aquestes noves drogues en els pacients d'alt risc. Fins ara només l'al·lo-TPH s'ha demostrat una teràpia curativa en l'LLC, per tant és necessari sempre contrastar noves evidències per tal d'adaptar els algorismes de maneig de l'LLC al progrés científic.

2.4.4. La malaltia mínima residual (MMR)

L'erradicació completa de la leucèmia és l'objectiu desitjat de tota aproximació terapèutica. Noves tècniques més sensibles de detecció de la malaltia, com són la citometria de flux multicolor o la RT qPCR (de l'anglès, *real time quantitative polymerase chain reaction*), han permès determinar que pacients que havien aconseguit una CR segons les Guies del NCI-WG (de l'anglès, *National Cancer Institute-sponsored Working Group*) del 1996, poden tenir en realitat MMR detectable³⁰.

Amb una sensibilitat d'una cèl·lula d'LLC per cada 100.000 leucòcits (10^{-5}) l'RT qPCR és generalment considerada la tècnica quantitativa més sensible, mentre que amb la citometria de flux de quatre colors és de 10^{-4} . De totes maneres, tant la citometria de flux com l'RT qPCR van resultar igualment efectives a l'hora de quantificar l'MMR en pacients tractats amb rituximab utilitzant com a llindar el valor de 10^{-4} .³⁰⁴ Amb aquests resultats i donat que la citometria de flux és una tècnica més àmpliament disponible i ràpida que l'RT qPCR, es recomana el seu ús utilitzant protocols estandaritzats per mesurar l'MMR³⁰. D'aquesta manera, després del tractament la remissió de la malaltia amb MMR negativa es defineix com la presència de menys d'una cèl·lula d'LLC per 10000 leucòcits³⁰.

La quantificació de la MMR després del tractament ha esdevingut un factor predictor de resposta i de supervivència clau^{305,306,307}. L'anàlisi de l'MMR en l'assaig clínic randomitzat GCLLSG CLL8 que comparava els esquemes de tractament FC vs FCR en pacients d'LLC sense tractar prèviament, va demostrar que uns nivells baixos d'MMR ($<10^{-4}$) mesurats durant i després del tractament s'associaven a una PFS i OS més llargues. La mediana estimada de la PFS va resultar de 68.7 vs. 15.4 mesos per un nivells baixos i alts d'MMR ($>10^{-2}$), respectivament ($P<0.0001$), mentre que la mediana de l'OS va resultar de 48.4 mesos per a uns nivells alts d'MMR i no es va arribar a assolir en el grup d'MMR $<10^{-4}$. L'MMR va romandre com

INTRODUCCIÓ

a factor predictiu de PFS i OS després de l'anàlisi multivariant que incloïa la resposta clínica, l'ECOG PS, l'estat mutacional de l'IGHV, la TK i el nombre de cicles de tractament. L'únic factor que juntament amb l'MMR va romandre predictiu de resposta i supervivència va ser la presència de del17p³⁰⁸.

Tot i això, l'avaluació de la MMR en la pràctica clínica habitual no està encara ben establerta. Hi ha encara alguns aspectes per determinar, un d'aquests si la MMR s'ha de determinar a partir de la SP o del MO, especialment en aquells malalts tractats amb anticossos monoclonals com el rituximab, fàrmacs més efectius en eliminar la malaltia de SP²²⁴. En aquest sentit, l'estudi realitzat per Böttcher *et al*³⁰⁴ en malalts tractats amb rituximab, va mostrar com l'MMR detectada en sang perifèrica es correlacionava amb la detectada en moll d'os i no va observar diferències significatives a l'hora de predir la resposta i la supervivència dels pacients.

Un altre aspecte per determinar és com els nous tractaments amb inhibidors del BCR poden canviar el maneig dels pacients d'acord amb l'MMR. Com ja hem comentat, la majoria de pacients tractats amb antagonistes de la senyalització derivada del BCR assoleixen remissions duradores però que no superen les PR, CR s'observen rarament després del tractament amb aquests agents en monoteràpia. Sorprenentment, s'observen remissions estables fins i tot en aquells pacients que mai acaben de resoldre la limfocitosi en SP. Així doncs, la durada de la resposta no correlaciona necessàriament amb la profunditat de la resposta després del tractament amb inhibidors de quinases. Aquestes observacions han portat a replantejar els criteris consensuats per a determinar el pronòstic i a l'hora el maneig d'aquests pacients^{30,309}.

**II. HIPÒTESI DE TREBALL I
OBJECTIUS**

HIPÒTESI DE TREBALL

En els últims anys s'ha produït un progrés important en el tractament dels pacients amb LLC sobretot amb l'arribada de la immunoquimioteràpia. Desafortunadament, més tard o més d'hora la malaltia acabarà progressant inevitablement en tots els pacients.

Nombroses evidències clíniques i biològiques reconeixen el paper fonamental que té la persistència de malaltia residual després del tractament en el curs d'aquesta malaltia.

Clínicament, la quantificació de la malaltia mínima residual ha esdevingut un important factor predictor de resposta i de supervivència. Aquells pacients amb persistència de malaltia residual després del tractament presenten una significativa pitjor supervivència amb independència d'altres factors de risc.

Biològicament, nombrosos estudis demostren que les cèl·lules d'LLC que resideixen al moll de l'os i en els teixits limfoides secundaris reben senyals de supervivència, proliferació i quimioresistència del microambient, fet que suggeriria que aquest compartiment de cèl·lules d'LLC seria el responsable de la persistència de malaltia residual després del tractament.

Una millor caracterització de les cèl·lules d'LLC que es troben en els centres proliferatius pot facilitar el descobriment i l'estudi de noves dianes terapèutiques específicament expressades en aquest compartiment proliferant i quimioresistent de cèl·lules d'LLC, ajudant finalment a erradicar la malaltia residual.

En aquest sentit, estudis previs demostren l'expressió preferent de la proteïna survivina en les cèl·lules d'LLC que es troben en els centres de proliferació del moll de l'os i ganglis limfàtics, per això vam hipotetitzar que inhibint la seva expressió mitjançant l'inhibidor de survivina, YM155, podríem tractar específicament les cèl·lules d'LLC proliferants i quimioresistents residents en els centres de proliferació.

OBJECTIUS

1. Desenvolupar un sistema de co-cultiu de cèl·lules primàries d'LLC en condicions que recreen el microambient dels centres proliferatius.

- Caracteritzar cèl·lules primàries d'LLC cultivades *in vitro* en diferents condicions que recreen el microambient dels centres proliferatius
- Comparar fenotípicament aquestes cèl·lules d'LLC cultivades *in vitro* amb el compartiment proliferant de cèl·lules d'LLC de sang perifèrica de pacients diagnosticats d'LLC
- Analitzar la quimioresistència adquirida de les cèl·lules primàries d'LLC en aquest sistema de co-cultiu

2. Analitzar els efectes de l'antisurvivina (YM155) en les cèl·lules d'LLC co-cultivades en condicions que recreen el microambient dels centres proliferatius

- Analitzar els efectes del co-cultiu en l'expressió de survivina
- Estudiar l'eficàcia de l'YM155 en inducció d'apoptosi i inhibició de proliferació
- Estudiar els mecanismes biològics citotòxics de l'YM155
- Analitzar els efectes citotòxics de l'YM155 en combinació amb fludarabina i bendamustina

III. RESULTATS

Article 1

El co-cultiu de cèl·lules primàries de leucèmia limfàtica crònica (LLC) amb cèl·lules mesenquimals del moll d'òs, lligand del CD40 i oligonucleòtids promou la proliferació de cèl·lules d'LLC quimioresistents fenotípicament comparables a aquelles activament proliferants *in vivo*

La leucèmia limfàtica crònica (LLC) es caracteritza per l'acumulació i proliferació monoclonal de limfòcits B CD5 positius a la sang perifèrica, ganglis limfàtics (GL) i moll de l'os (MO). El microambient dels ganglis limfàtics i moll de l'os induïx la proliferació de cèl·lules d'LLC i les protegeix de l'apoptosi espontània i induïda per la quimioteràpia, resultant en la persistència de malaltia residual després del tractament.

En aquest estudi vam caracteritzar cèl·lules primàries d'LLC cultivades amb cèl·lules estromals del moll de l'os, lligand del receptor CD40 i oligonucleòtids (CpG ODN) per tal de reproduir parcialment *in vitro* el microambient dels centres proliferatius, i posteriorment vam comparar les seves característiques fenotípiques amb les cèl·lules proliferants d'LLC de sang perifèrica.

Vam observar com aquest sistema de co-cultiu induïa proliferació i quimioresistència en les cèl·lules primàries d'LLC. A més a més, aquestes cèl·lules d'LLC en co-cultiu adquirien diverses característiques fenotípiques que resultaren comparables a les de les cèl·lules d'LLC proliferants circulants en sang perifèrica. Entre aquestes característiques cal destacar la sobreexpressió de la proteïna ZAP-70, el receptor CD38 i les integrines CD49d i CD62L, el que justificaria un augment de l'activació, agressivitat i capacitat d'interaccionar amb les cèl·lules de l'entorn per part de les cèl·lules d'LLC. D'altra banda, vam observar una disminució dels nivells del receptor de quimioquines CXCR4, tot indicant una probable internalització del receptor en resposta a l'estimulació de la quimioquina CXCL12 provinent de les cèl·lules estromals del moll de l'os.

Per últim, aquest sistema de co-cultiu induí una elevada quimioresistència de les cèl·lules d'LLC al tractament amb fàrmacs estàndard per al tractament dels pacients amb LLC com són la fludarabina i la bendamustina.

Per tant, aquest estudi aporta un model per a un sistema de co-cultiu que podria servir com a base per a l'estudi dels mecanismes biològics de les cèl·lules d'LLC proliferants i quimioresistents, així com per al descobriment de noves molècules que potencialment podrien arribar a ser noves dianes terapèutiques i per al desenvolupament de nous fàrmacs dirigits a aquestes molècules.

Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating *in vivo*

Noelia Purroy¹, Pau Abrisqueta¹, Júlia Carabia¹, Cecilia Carpio¹, Carles Palacio¹, Francesc Bosch^{1,*} and Marta Crespo^{1,*}

¹ Laboratory of Experimental Hematology, Department of Hematology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

* These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Marta Crespo, **email:** macrespo@vhebron.net

Keywords: CLL, co-culture, proliferation, immunophenotype, chemoresistance, ZAP-70

Received: September 19, 2014

Accepted: December 02, 2014

Published: December 03, 2014

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells residing in the bone marrow (BM) and in secondary lymphoid tissues receive survival and proliferative signals from the microenvironment, resulting in persistence of residual disease after treatment. In this study, we characterized primary CLL cells cultured with BM stromal cells, CD40 ligand and CpG ODN to partially mimic the microenvironment in the proliferative centers. This co-culture system induced proliferation and chemoresistance in primary CLL cells. Importantly, co-cultured primary CLL cells shared many phenotypical features with circulating proliferative CLL cells, such as upregulation of ZAP-70 and CD38 and higher CD49d and CD62L expression. This indicates aggressiveness and capability to interact with surrounding cells, respectively. In addition, levels of CXCR4 were decreased due to CXCR4 internalization after CXCL12 stimulation by BM stromal cells. We suggest that this co-culture system can be used to test drugs and their combinations that target the proliferative and drug resistant CLL cells.

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most prevalent B-cell malignancy in adults in Western countries, is characterized by the expansion of monoclonal mature B cells expressing CD5 and CD23 in peripheral blood (PB), secondary lymphoid tissues, and the bone marrow (BM)[1]. CLL cells had been described to accumulate as a result of a defective apoptosis, rather than of an increased proliferation[1]. This hypothesis was mainly based on the fact that most of the circulating cells are arrested in the G₀/G₁ phase of the cell cycle[2]. However, it was later shown that a distinct fraction of CLL cells are proliferating, being the cell birth rate 0.1% to 1% of the CLL clone per day[3]. CLL cells mainly receive proliferative signals in tissue compartments, such as lymph nodes (LN) and BM, where CLL cells form aggregates of activated, proliferating cells called “proliferation centers” or “pseudofollicles”[4].

Within this tissue microenvironment, CLL cells receive advantageous signals from accessory cells such as T cells[5], mesenchymal stromal cells[6] and nurse-like cells[7]. These signals are propagated through diverse receptors, such as CD40[8], Toll-like receptors (TLR)[9], CXCR4[10] and the B cell receptor (BCR)[11], which activate downstream signaling pathways that ultimately promote proliferation, modulate cell adhesion and chemotaxis and protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis. Residual leukemic cells residing in these protective niches after treatment are therefore potentially contributing to minimal residual disease (MRD) persistence and to the disease relapse virtually observed in all patients after chemotherapy even after achievement of complete remission[12],[13]. Further characterization of primary CLL cells found in the proliferative niches can facilitate the discovery and study of new therapeutic targets specifically expressed by

this proliferative and chemoresistant subset of CLL cells, which could ultimately help to eradicate MRD.

With the aim of better defining proliferating primary CLL cells, we characterized primary CLL cells cultured *ex vivo* in conditions mimicking the microenvironment found in the proliferative centers and compared them to proliferating subclones of CLL cells found in PB from patients with active disease, which likely represent cells that have been stimulated in the proliferation centers while residing in the LN or BM before becoming quiescent again in PB [14]. The herein described *ex-vivo* culture system induced proliferation of primary CLL cells that shared physiologic and immunophenotypic characteristics with those proliferating CLL cells found *in vivo*, providing an easily reproducible system for the *ex vivo* testing of new drugs specifically targeting this clinically relevant compartment of CLL cells.

RESULTS

Effects of BMSC, CD40 and CpG ODN in proliferation, cell cycle and viability of primary CLL cells

With the aim of partially *ex vivo* mimicking the microenvironment found in the proliferative centers, we cultured primary CLL cells in 5 different culture conditions: in suspension, co-cultured with the BMSC cell line UE6E7T-2, with soluble CD40L, with CpG ODN and with the combination of all elements: BMSC, CD40L and CpG ODN. Next, we analyzed the effects in terms of proliferation and survival after 24, 48 and 72 hours of culture. In this setting, proliferative responses, measured as increase in expression of Ki-67, were significantly observed after 48 hours in CLL cells cultured with BMSC, CD40L and CpG ODN (Figure 1A) (mean % Ki-67 positive cells: 4.41 ± 1.41 cultured with BMSC, CD40L and CpG ODN vs. 0.42 ± 0.10 in suspension, $P < 0.01$) and were

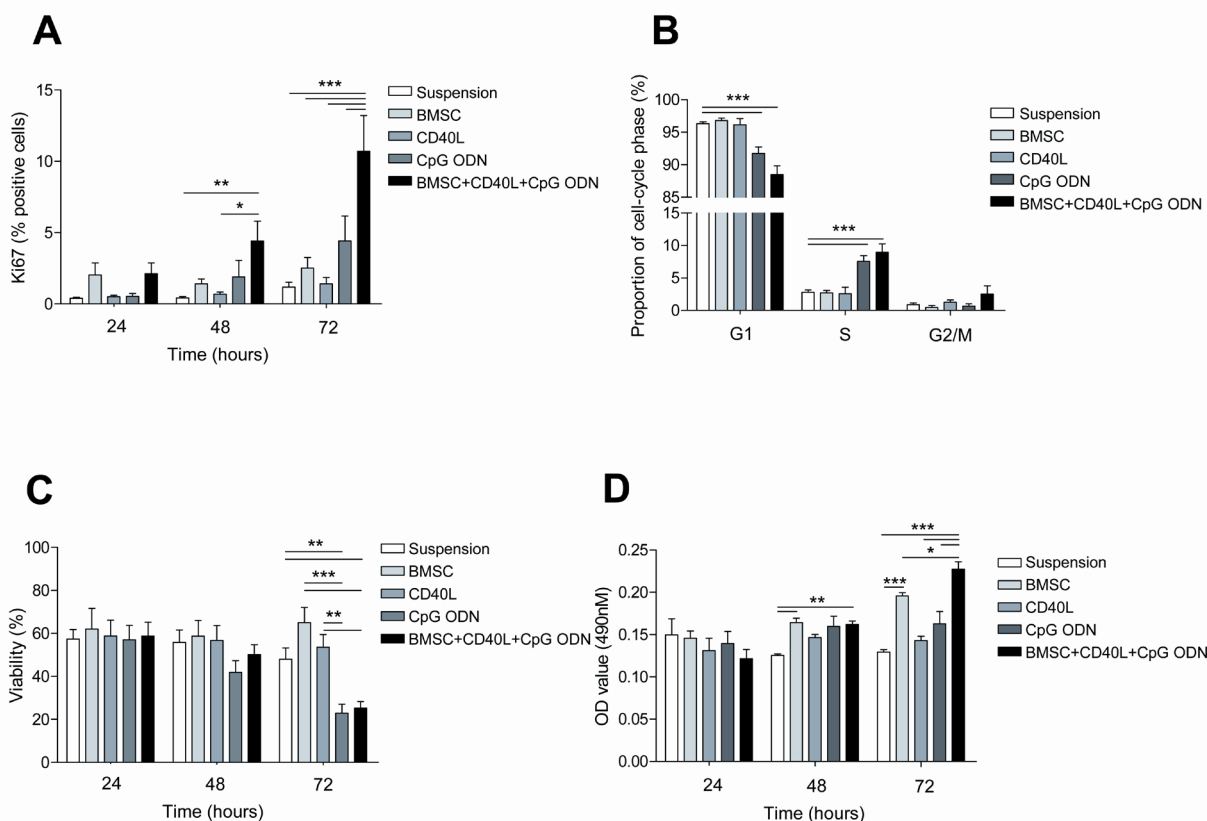


Figure 1: The co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN induces proliferation of CLL cells. Primary CLL cells were cultured with BMSC, with CD40L, with CpG ODN or with BMSC, CD40L and CpG ODN. Cellular analyses were performed after 24, 48 and 72 hours of culture. (A) Mean % of Ki-67-positive cells from 8 patients was analyzed by flow cytometry. (B) Cell cycle distribution was assessed in primary CLL cells from 8 patients by PI staining by FC. (C) Viability was assessed in primary CLL cells from 8 patients by Annexin V and PI staining (D) MTS assay of co-cultured CLL cells. The mean optical density (OD) values at 490nm \pm SEM from triplicates from 4 patients are depicted in the graph.

Table 1: Ki-67 expression and viability relative to suspension according to clinical and biological parameters.

		Ki-67 expression relative to suspension			Viability relative to suspension		
		Fold change	N	T-test p value	%	N	T-test p value
Stage	A	11.05±2.42	13	0.430	62.24±11.59	12	0.673
	B+C	7.23±4.76	5		45.54±4.44	6	
CD38 expression	≤30%	9.70±2.46	13	0.767	54.81±9.95	14	0.222
	>30%	10.75±4.85	5		63.19±10.01	4	
ZAP-70 expression	≤20%	12.13±3.34	10	0.315	53.29±10.56	12	0.325
	>20%	7.32±2.34	8		63.44±11.98	6	
IGHV status	mutated	5.08±3.21	3	0.811	61.08±28.15	2	0.727
	unmutated	7.74±2.95	10		65.78±13.26	9	

even higher after 72 hours when, as we had previously observed [15], the co-culture with BMSC, CD40L and CpG ODN induced a Ki-67 expression of 10.71% ± 2.51% vs. 1.18%±0.34% in suspension ($P<0.001$). Interestingly, when we analyzed the effect of every stimulus independently we observed that none of them increased Ki-67 expression significantly (mean % Ki-67 positive cells: 1.18±0.34 cultured in suspension vs. 2.52±0.74 cultured with BMSC vs. 1.41±0.44 cultured with CD40L vs. 4.42±1.75 cultured with CpG ODN, $P=n.s.$).

Furthermore we analyzed the ratio of CLL cells in G₁, S and G₂/M phases after 72 hours of culture in the above described different culture conditions. Cell cycle analysis showed that the addition of CpG ODN to CLL cells culture induced an entry into S/G₂/M phase, this increasing with the addition of BMSC and CD40L (Figure 1B) (mean % cells in S phase with CpG ODN vs. suspension: 7.56±0.89 vs. 2.81±0.38, $P<0.001$; mean % cells in S phase with BMSC+CD40L+CpG ODN vs. suspension: 8.99±1.26 vs. 2.81±0.38, $P<0.001$; mean % cells in G₂/M phase with BMSC+CD40L+CpG ODN vs. suspension: 2.54±1.27 vs. 0.89±0.28, $P=n.s.$).

Viability assays showed that none of the analyzed co-culture conditions induced significant changes in CLL cells viability until 72 hours. At this time point, both BMSC and CD40L alone protected primary CLL cells from spontaneous apoptosis although statistical significance was not reached (Figure 1C) (mean % of viable cells in suspension vs. co-cultured with BMSC vs. with CD40L: 47.95±5.27 vs. 65.05±7.02 vs. 53.53±5.95, $P=n.s.$). In contrast, the addition of CpG ODN induced a significant decrease in the percentage of viable cells which was not restored with the addition of BMSC and CD40L (mean % of viable cells in suspension vs. with CpG ODN: 47.95±5.27 vs. 22.88±4.26, $P<0.01$; mean % of viable cells in suspension vs. BMSC+CD40L+CpG ODN: 47.95±5.27 vs. 25.22±3.11, $P<0.01$). Since we observed the higher proliferation rate concomitant with the lower percentage of alive cells, especially after 72

hours of culture, we measured metabolic activity using an MTS-based cell assay. We observed that the results were comparable to Ki-67 analysis, being the co-culture with BMSC, CD40L and CpG ODN the condition inducing the highest degree of proliferation after 72 hours. These results strongly suggest that the lower percentage of viable cells simultaneously observed with an increase in Ki-67-positive cells and metabolic activity is probably caused by exhaustion of nutrients in the culture media due to a rapid CLL cell turnover.

Finally, we did not observe any significant correlation between the induction of proliferation or survival by the co-culture with BMSC, CD40L and CpG ODN and clinical stage, CD38, ZAP-70 expression or the mutational status of IGHV genes (Table 1).

Immunophenotypical differences between resting and proliferative primary CLL cells from PB

With the aim of comparing primary CLL cells cultured *ex vivo* in conditions mimicking the microenvironment found in the proliferative centers with proliferating subclones of CLL cells found in PB from patients with active disease, we initially analyzed proliferating CLL cells from 40 patients diagnosed with CLL. For this, we analyzed by FC the differential expression of CD38, CD49d, CD62L and the chemokine receptors CXCR4, CXCR5 and CCR7 in Ki-67 positive vs. Ki-67 negative CLL cells (Figure 2A). Mean percentage of Ki-67 expression in CLL samples was 1.40±0.26 (range, 0.05-7.41). Ki-67-positive CLL cells showed higher expression levels of CD38 (mean MFI of CD38 expression in Ki-67 positive cells vs. Ki-67 negative cells: 57.46±8.43 vs. 25.41±3.83, $P<0.001$). The expression levels of integrin CD49d and selectin CD62L were also higher in Ki-67 positive CLL cells than in Ki-67 negative cells (mean MFI of CD49d expression in Ki-67 positive cells vs. Ki-67 negative cells: 44.92±10.15 vs. 39.53±10.43, $P<0.01$; mean MFI of CD62L expression in Ki-67 positive

cells vs. Ki-67 negative cells: 37.87 ± 10.03 vs. 31.48 ± 9.41 , $P < 0.05$) while the expression levels of all the chemokine receptors analyzed were significantly lower (mean MFI of CXCR4 expression in Ki-67 positive cells vs. Ki-67 negative cells: 172.3 ± 20.03 vs. 223.2 ± 22.35 , $P < 0.001$; mean MFI of CXCR5 expression in Ki-67 positive cells vs. Ki-67 negative cells: 343.4 ± 31.37 vs. 428.7 ± 38.18 , $P < 0.001$; mean MFI of CCR7 expression in Ki-67 positive cells vs. Ki-67 negative cells: 110.1 ± 8.07 vs. 149.2 ± 10.65 , $P < 0.001$) (Figure 2A).

The co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN promotes an immunophenotype comparable to that from proliferating CLL cells found in PB

As described above, we observed that the co-culture of primary CLL cells in conditions mimicking the microenvironment of the proliferative centers induced the proliferation of CLL cells in terms of Ki-67 expression, MTS-based cell proliferation assay and cell cycle entry. In order to compare the immunophenotype of proliferating CLL cells found *in vivo* with the ex-vivo stimulated CLL cells, we analyzed the modulation of the expression of CD38, CD49d, CD62L, CXCR4, CXCR5 and CCR7 in primary CLL cells after 48 hours of co-culture as compared to CLL cells in suspension (Figure 2B). Primary CLL cells in co-culture showed an increase in the expression of CD38, CD49d and CD62L (mean MFI of CD38 expression in co-culture vs. in suspension: 151.9 ± 42.56 vs. 60.16 ± 4.79 , $P < 0.05$; mean MFI of CD49d expression in co-culture vs. in suspension: 202.8 ± 22.8 vs. 184.3 ± 22.48 , $P < 0.05$; mean MFI of CD62L expression in co-culture vs. in suspension: 993.9 ± 123.7 vs. 626.0 ± 76.49 , $P = \text{n.s.}$). In addition, co-culture of CLL cells induced a downregulation of the expression level of CXCR4 (mean MFI of CXCR4 expression in co-culture vs. in suspension: 247.6 ± 41.23 vs. 741.0 ± 160.3 , $P < 0.001$) while CXCR5 and CCR7 expression levels were not significantly modulated (mean MFI of CXCR5 expression in co-culture vs. in suspension: 1122 ± 121.0 vs. 906.6 ± 94.32 , $P = \text{n.s.}$; mean MFI of CCR7 expression in co-culture vs. in suspension: 221.4 ± 13.79 vs. 225.0 ± 23.43 , $P = \text{n.s.}$).

To determine whether the co-culture of PBMC from patients with CLL with BMSC, CD40L and TLR9L also stimulated T cells we analyzed the expression of Ki-67, CD38 and CD69 expression in CD3+ mononucleated cells (Figure 2C). Taking into account that only samples with at least 85% of CLL cells were included in our study, we observed a mean percentage of T cells of 4.02 ± 0.84 at baseline, which was not significantly altered after 48 hours in co-culture. However, the co-culture did significantly increase Ki-67, CD38 and CD69 expression in T cells (Figure 2C) indicating that T cells were also activated under these co-culture conditions.

The co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN preferentially increases the proliferative CXCR4^{dim}CD5^{br} compartment

We also characterized the proliferative and resting compartments of CLL cells found in PB using differences in the expression of CD5 and CXCR4 by FC as previously defined by Calissano, C et al [16] (Figure 3A). The percentage of CLL cells falling into each compartment was similar to the previously observed distribution [16] (Figure 3B) (mean % CLL cells: 4.52 ± 0.82 in CXCR4^{dim}CD5^{bright} fraction vs. 75.78 ± 2.05 in CXCR4^{int}CD5^{int} fraction vs. 13.83 ± 1.53 in CXCR4^{bright}CD5^{dim} fraction, $P < 0.001$). As expected, the proliferative compartment defined as the CXCR4^{dim}CD5^{bright} fraction was significantly enriched in Ki-67 positive cells (Figure 3C) (mean % Ki-67 positive cells: 3.28 ± 1.12 in CXCR4^{dim}CD5^{bright} fraction vs. 2.63 ± 0.85 in CXCR4^{int}CD5^{int} fraction, $P = \text{n.s.}$; vs. 0.36 ± 0.21 in CXCR4^{bright}CD5^{dim} fraction, $P < 0.01$). As we previously reported [15], co-culturing CLL cells for 48 hours induced an increase in the percentage of CLL cells within the CXCR4^{dim}CD5^{bright} compartment (Figure 3D) whereas the proportion of CXCR4^{int}CD5^{int} and CXCR4^{bright}CD5^{dim} cells was not significantly affected (mean % CXCR4^{dim}CD5^{bright} cells: 23.16 ± 7.25 in co-culture vs. 5.67 ± 2.52 in suspension, $P < 0.05$).

The co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN induces ZAP-70 expression

Among the diverse molecular pathways of crosstalk between CLL cells and their microenvironment, BCR signaling has been recognized as one of the most important [17][18]. The expression of the protein tyrosine kinase ZAP-70 has been associated with increased BCR signaling in CLL [19] which translated into increased proliferation and migrative capacity of ZAP-70 positive subclones, based on *in vitro* and *in vivo* data [20],[21],[22],[23]. Clinically, ZAP-70 expression has been correlated with IgVH mutational status, disease progression and survival [24]. Therefore, we hypothesized that ZAP-70 expression could be upregulated in proliferating CLL subclones. In order to test this, we assessed ZAP-70 expression in CLL cells from PB according to Ki-67 expression and subsequently in primary CLL cells co-cultured in proliferative conditions. Firstly, we observed that the Ki-67 positive fraction of CLL cells from the PB was significantly enriched in ZAP-70 positive cells (Figure 4A) (mean % of ZAP-70 expression: 83.93 ± 2.40 in Ki-67 positive cells vs. 29.22 ± 4.20 in Ki-67 negative cells, $P < 0.001$). We also determined ZAP-70 expression according to CXCR4 and CD5 expression and interestingly, we observed that the proliferative CXCR4^{dim}CD5^{bright} fraction was also enriched in ZAP-70 positive cells (Figure 4B) (mean % ZAP-70

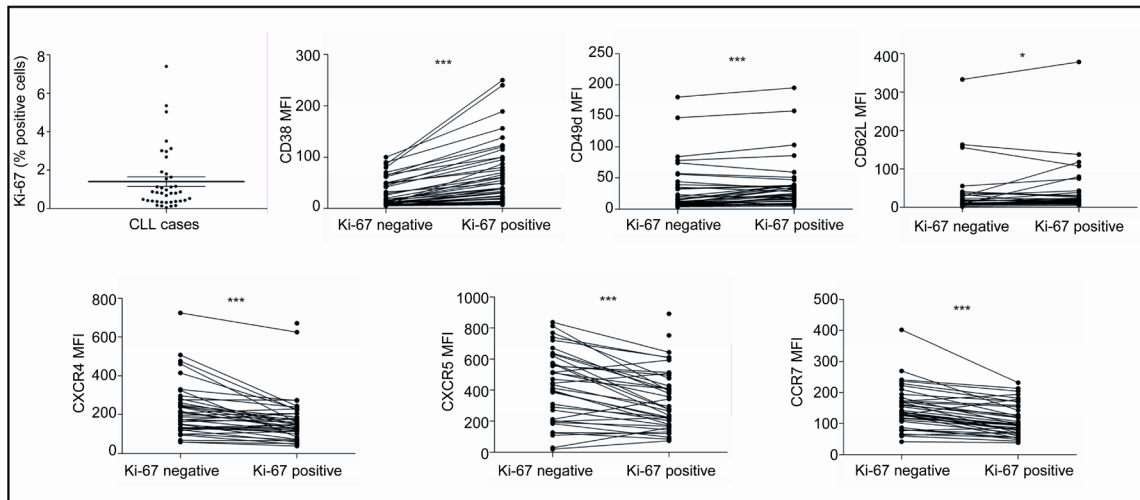
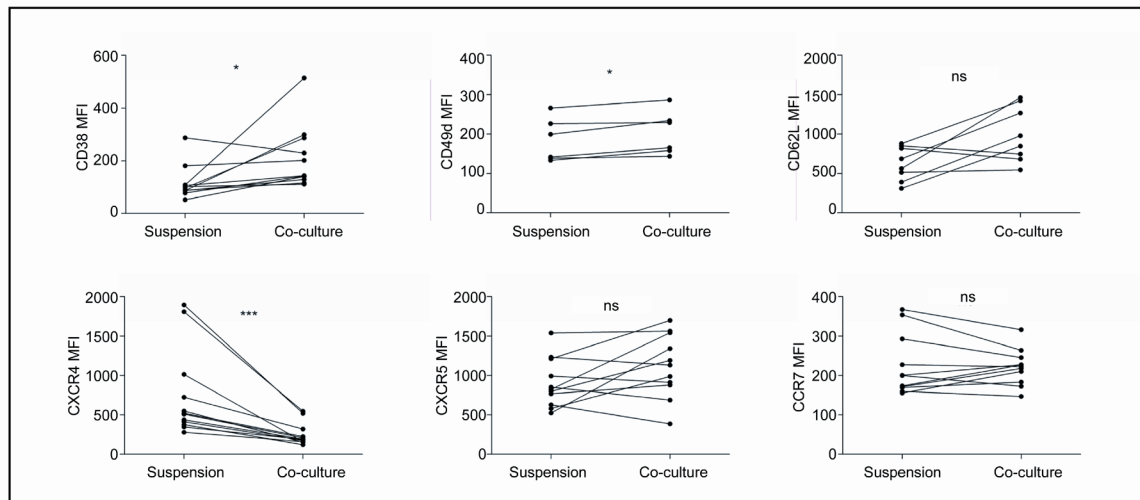
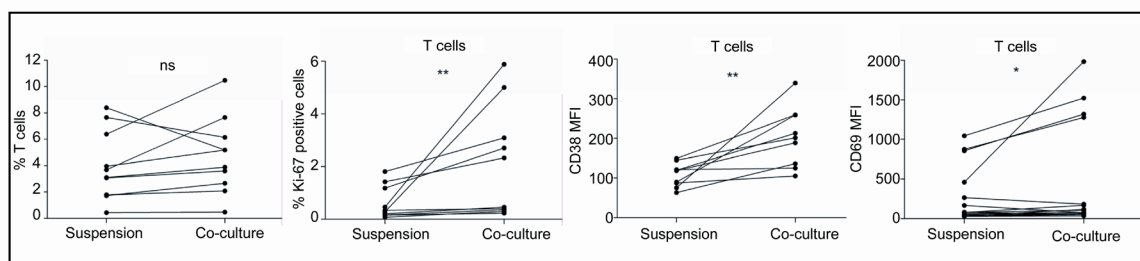
A**Ki-67 negative vs Ki-67 positive primary CLL from the PB****B****Primary CLL cells in suspension vs in co-culture****C****Primary T cells in suspension vs in co-culture**

Figure 2: The co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN promotes an immunophenotype comparable to that from proliferating CLL cells found in PB. (A) PBMC from 40 patients diagnosed with CLL were used to analyze by FC the differential expression of CD38, CD49d, CD62L, CXCR4, CXCR5 and CCR7 in Ki-67-negative vs. positive CLL cells. (B) Primary CLL cells from 12 patients were cultured in suspension or in co-culture with BMSC, CD40L and CpG ODN for 48 hours and the expression of CD38, CD49d, CD62L, CXCR4, CXCR5 and CCR7 were analyzed. (C) PBMC from 10 patients diagnosed with CLL were cultured in suspension or in co-culture with BMSC, CD40L and CpG ODN for 48 hours and the percentage of T cells and their expression levels of Ki-67, CD38 and CD69 were analyzed. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: non significant, paired T-test).

positive cells: 67.35 ± 3.66 in $CXCR4^{dim}CD5^{bright}$ fraction vs. 38.71 ± 3.87 in $CXCR4^{int}CD5^{int}$ fraction, $P < 0.001$; vs. 19.29 ± 3.04 in $CXCR4^{bright}CD5^{dim}$ fraction, $P < 0.001$). In order to elucidate if signals from the microenvironment could directly modulate the expression of ZAP-70, we cultured primary CLL cells in suspension or co-cultured with BMSC, CD40L and CpG ODN for 48 hours and observed that the percentage of ZAP-70 positive cells was significantly increased (Figure 4C and 4D) (mean % ZAP-70 positive cells: 61.50 ± 7.33 in co-culture vs. 16.91 ± 4.23 in suspension, $P < 0.01$). This was further confirmed by western blot, where we also observed ZAP-70 up-regulation in primary CLL cells co-cultured with BMSC, CD40L and CpG ODN for 48 hours. To clarify which of these stimuli contributed to ZAP-70 up-regulation, we cultured primary CLL cells with BMSC, CD40L or CpG ODN separately, and assessed ZAP-70 expression by western blot. We observed a marked ZAP-70 up-regulation as a consequence of either CD40 or TLR9 stimulation alone (Figure 4E).

Primary CLL cells in co-culture develop marked chemoresistance to treatment with fludarabine and bendamustine

The microenvironment found in the proliferative centers has been shown to provide direct pro-survival signals and to protect CLL cells from the effect of chemotherapeutic agents [7],[25]. Consequently, this proliferative and chemoresistant compartment of CLL cells has been hypothesized to be potentially responsible for MRD persistence and disease relapse. In this regard, to evaluate the role of co-culture on the chemoresistance of primary CLL cells, we co-cultured primary CLL cells for 48 hours and subsequently treated them with increasing doses of fludarabine or bendamustine for additional 24 hours. Interestingly, as we previously described [15], the co-culture of CLL cells in these conditions inhibited at such extent the capacity of fludarabine to induce apoptosis that it was not possible to calculate its LD_{50} , whereas LD_{50} of fludarabine in CLL cells in suspension was $416 \mu M$

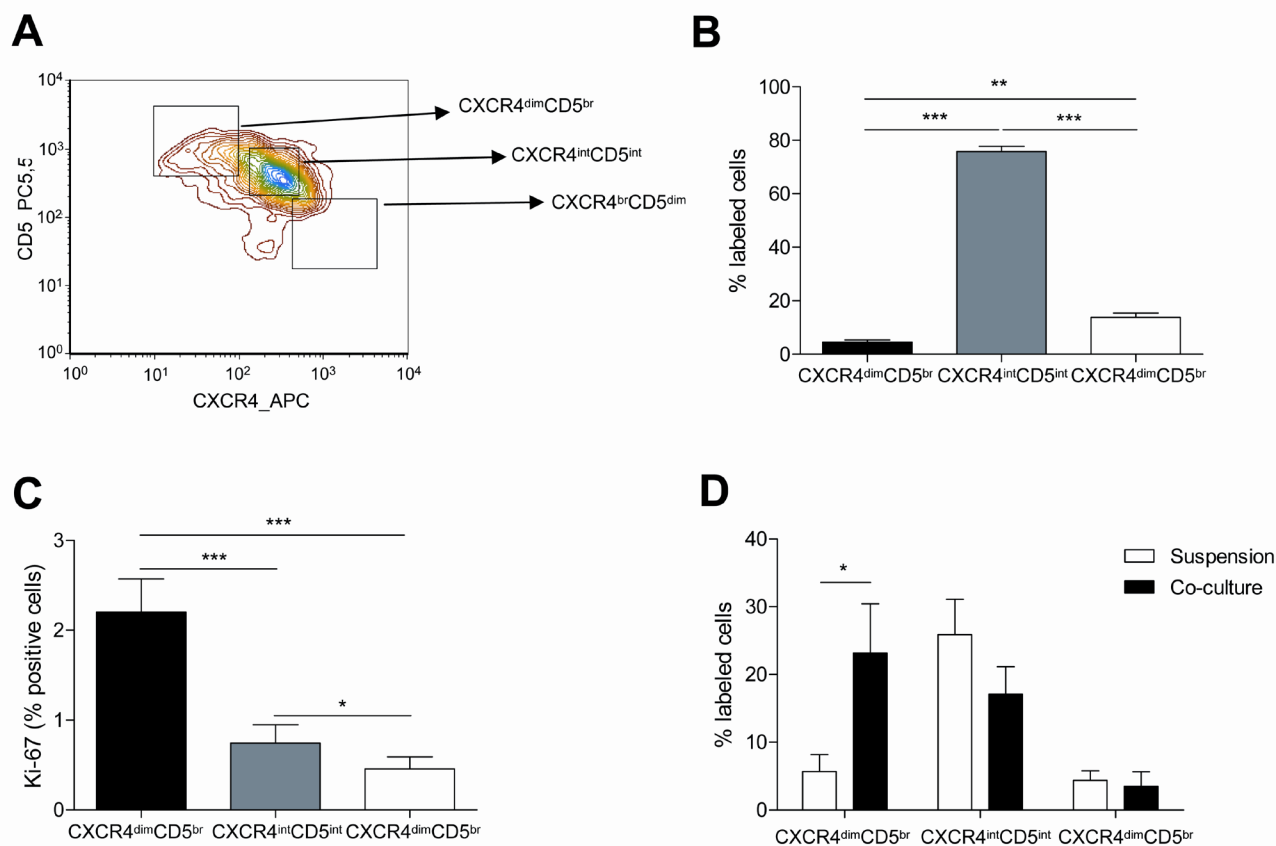


Figure 3: The proliferative $CXCR4^{dim}CD5^{br}$ compartment of CLL cells is promoted by the co-culture with BMSC, CD40L and CpG ODN. PBMC from 40 patients diagnosed with CLL were used to analyze the expression of CXCR4 and CD5 by FC. (A) Representative contour plot of CXCR4 and CD5 expression by CLL cells from one patient. (B) Mean percentage \pm SEM of CLL cells in the three compartments defined by CXCR4 and CD5 densities are depicted in the graph (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, one-way ANOVA). (C) Mean percentage \pm SEM of Ki-67 expression in the three compartments (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, one-way ANOVA). (D) Primary CLL cells from 7 patients cultured in suspension or in co-culture with BMSC, CD40L and CpG ODN for 48 hours were used to analyze the expression of CXCR4 and CD5. (* $P < 0.05$, two-way ANOVA, Bonferroni's post-test. Graph shows mean \pm SEM).

(95% CI 125.5-1379) (Figure 5A). For CLL cells treated with bendamustine, LD₅₀ of CLL cells in proliferative conditions was 5.18 times higher than for CLL cells in suspension (Figure 5B).

To determine the molecular mechanisms related to this co-culture-induced chemoresistance we analyzed the expression of the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2, which are up-regulated in CLL cells and provide them with protection against apoptosis induced by chemotherapy[26],[27]. After 48 hours of co-culture only the expression of Mcl-1 was significantly increased (Figures 5C, 5D and 5E), further highlighting its role in CLL resistance to chemotherapy.

DISCUSSION

Compelling evidence suggests that the crosstalk between CLL cells and accessory cells in the BM and/or lymphoid tissue microenvironments plays a relevant role in the natural history of CLL by promoting tumoral cell survival, proliferation and drug resistance (Reviewed in Burger et al[4]). Therefore, further characterization of the different cells and stimuli participating in this process is of great interest in order to define new therapeutic targets aimed at interfering with this favorable condition. Based on these considerations, the aim of this study was to further characterize this proliferative and chemoresistant CLL compartment by firstly studying the phenotypic

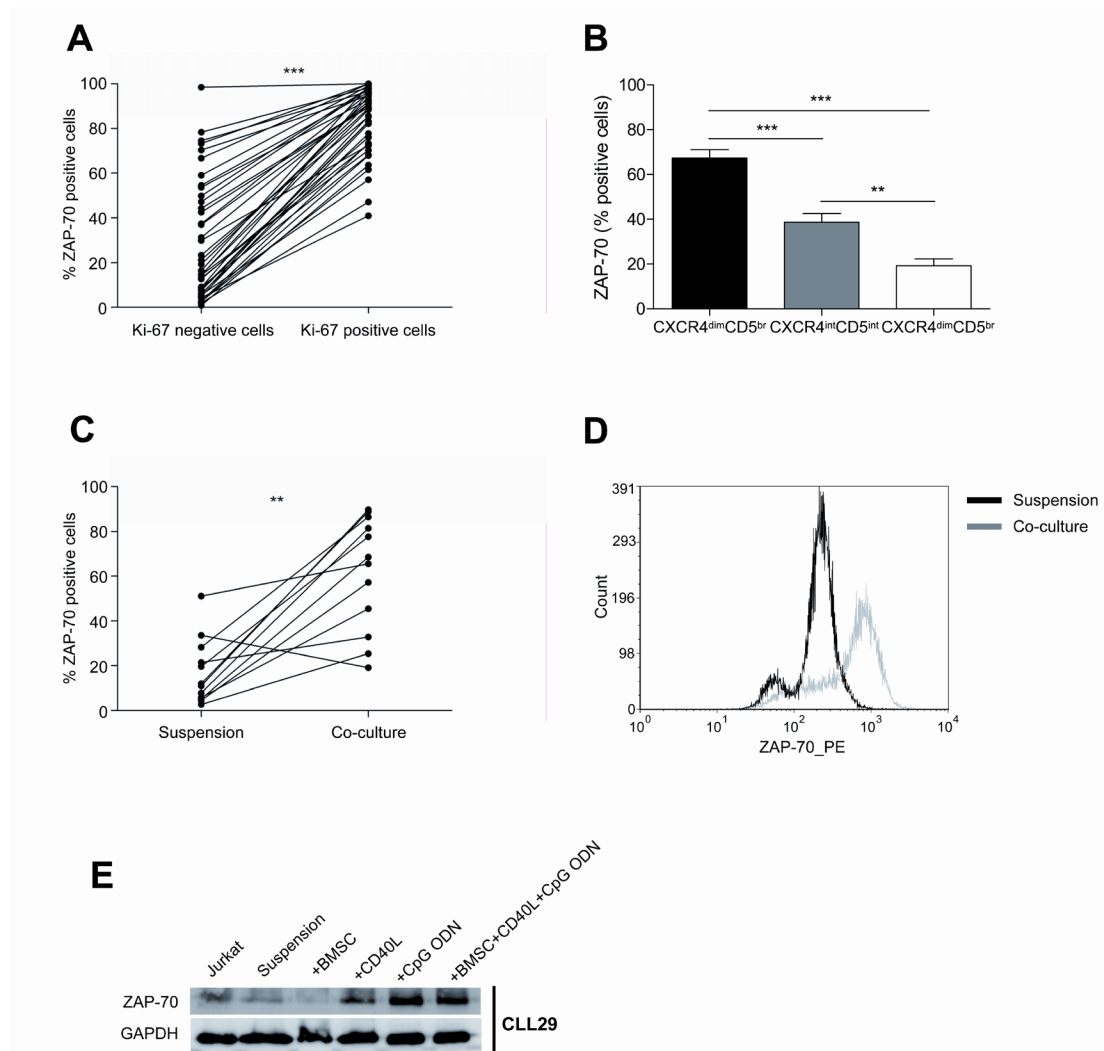


Figure 4: The co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN markedly enhances ZAP-70 expression. (A) PBMC from 40 patients diagnosed with CLL were used to analyze ZAP-70 expression in Ki-67 negative vs. positive CLL cells (**P<0.001, paired T-test). (B) ZAP-70 expression in CXCR4 and CD5 compartments of CLL cells from PBMC from 40 patients. (**P<0.01, ***P<0.001, one-way ANOVA. Graph shows mean ± SEM). (C) Primary CLL cells from 12 patients were cultured in suspension or in co-culture with BMSC, CD40L and CpG ODN for 48 hours and the expression level of ZAP-70 was analyzed by FC (**P<0.01, paired T-test). (D) One representative histogram of primary CLL cells from one patient after 48 hours in suspension or in co-culture. (E) One representative immunoblot analysis of ZAP-70 expression.

characteristics of proliferating CLL cells found in the PB of patients. Subsequently, we compared their features with those found after co-culture in conditions partially mimicking the microenvironment from the proliferation centers. This allowed us to describe an easily reproducible *ex vivo* system that will facilitate the study of this crucial CLL cell compartment and consequently, the discovery of new therapeutic targets.

We co-cultured primary CLL cells with BMSC since they have been demonstrated to support the survival of CLL cells from both spontaneous and drug-induced apoptosis [6],[7],[28],[29]. Moreover, it has been found that BMSC can activate resting CLL cells to

increase their expression of CD38, as well as promote activation of CD71, CD69, CD25 and CD70[30]. Based on evidences from *in vitro* experiments with CD40L that indicate the importance of T cells with regards to CLL cell proliferation and survival[31],[32],[33][8],[34],[5], we added soluble CD40L to our co-culture system. Finally, we used the TLR9 agonists CpG ODN to stimulate primary CLL cells. Toll-like receptors have been described as potent activators of CLL cell proliferation, cytokine production and upregulation of costimulatory molecules involved in B cell-T cell interaction such as CD40, CD80, CD86, CD54 MHC class I and CD58[35][36] [37]. Simultaneous stimulation with CD40/CpG ODN has

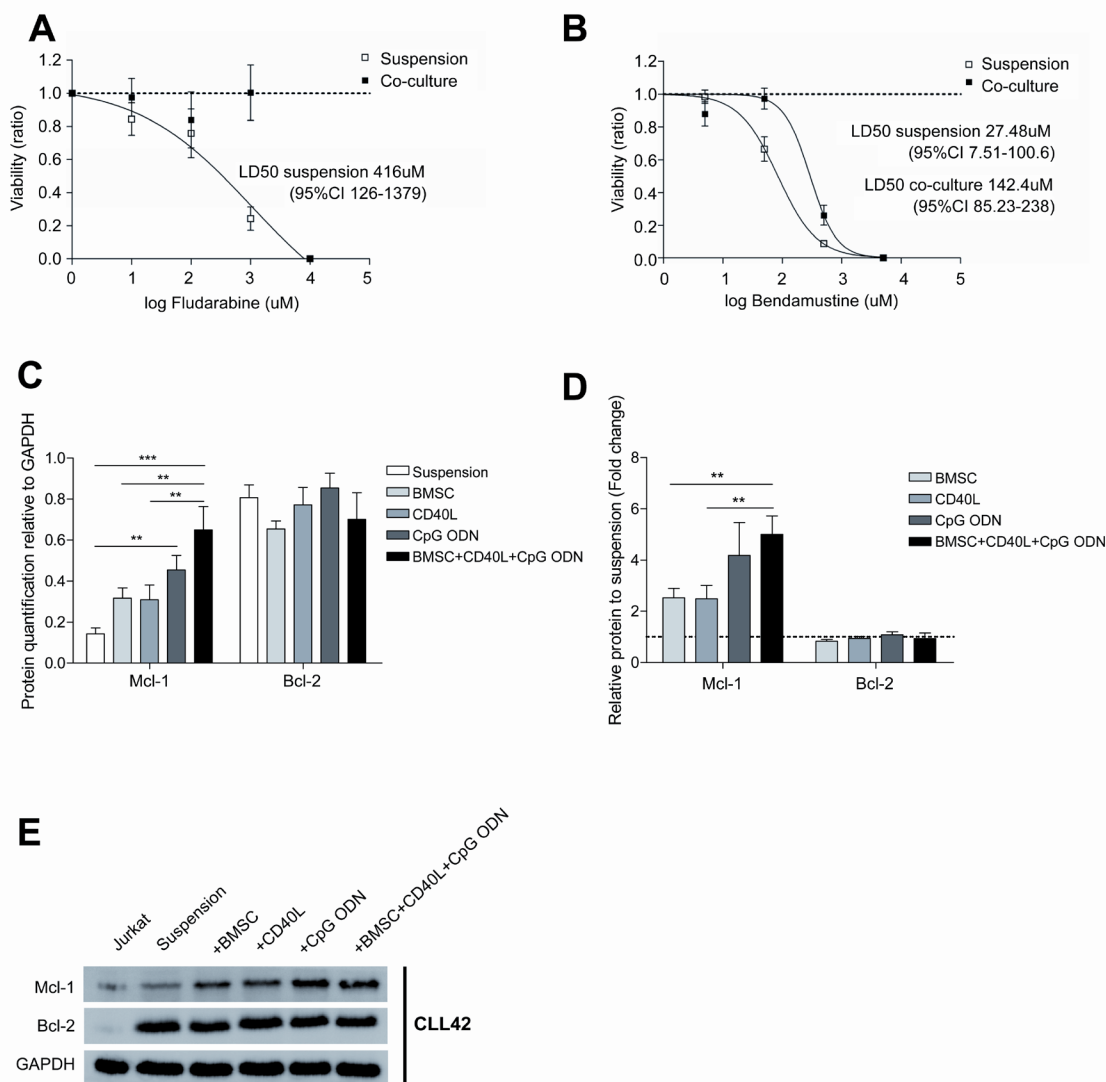


Figure 5: Co-cultured CLL cells display a marked chemoresistance to fludarabine and bendamustine treatment. Primary CLL cells from 7 patients were cultured for 48 hours in suspension or in co-culture with BMSC, CD40L and CpG ODN; subsequently, increasing doses of fludarabine and bendamustine were added for additional 24 hours. LD50 curves for fludarabine (A) and bendamustine (B) are plotted on a logarithmic scale. (C) Quantification of Mcl-1 and Bcl-2 expression analyzed by western blot relative to GAPDH. Each bar represents the mean \pm SEM from 7 patients (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, two-way ANOVA, Bonferroni's post-test). (D) Mcl-1 and Bcl-2 expression relative to primary CLL cells in suspension. Each bar represents the mean \pm SEM from 7 patients (** $P < 0.01$, two-way ANOVA, Bonferroni's post-test). (E) One representative immunoblot analysis of Mcl-1 and Bcl-2 expression.

been studied previously in CLL cells, observing enhanced immunogenicity[35] and distinctive proliferation in IGHV unmutated CLL cells correlating with the development of drug resistance[36].

In addition, we observed a modulation of the immunophenotype of CLL cells that was remarkably comparable to that from proliferating CLL cells found in PB of patients. These phenotypical changes indicate that these CLL cells become activated and consequently, more aggressive as shown by enhanced CD38 and ZAP-70 expression, and more likely to interact with other cells as shown by enhanced CD49d and CD62L expression. Regarding chemokine receptors, we observed downregulation of CXCR4, CXCR5 and CCR7 in proliferating CLL cells from the PB, probably indicating a recent recirculation from BM or lymphoid tissue. In the ex vivo co-culture system this was partially reproduced: CXCR4 expression was downregulated, while CXCR5 and CCR7 expression remained otherwise stable. This might be explained by the fact that our co-culture system included BMSC which produce the CXCR4 ligand CXCL12[38], but not MSC from secondary lymphoid tissues which are the responsible for CXCL13 and CCL19 production, ligands for CXCR5 and CCR7 respectively[39],[40],[41]. Additionally, the co-culture also resulted in stimulation of T cells from patients with CLL, which probably contributed to the activation of CLL cells. Besides its prognostic value, ZAP-70 expression is linked to activation of CLL cells[19],[22],[42] and its expression correlates with that of Ki-67 in CLL patients[21]. ZAP-70 expression has been clinically and biologically linked to aggressive features in CLL, but its regulation is still largely unknown; interestingly, we showed that the proliferative fraction of CLL cells from the PB was markedly enriched in ZAP-70 positive cells, and that the herein described co-culture system induced the expression of ZAP-70 in proliferating cells. Both CD40 and TLR9 stimulation independently were able to provoke an increase in the expression of ZAP-70, although CD40L alone was not enough to induce proliferation. Functionally, we observed that this co-culture system promoted the proliferation of chemoresistant CLL cells, as shown in fludarabine and bendamustine-treated primary CLL cells, and that was accompanied by the induction of the expression of the anti-apoptotic proteins Mcl-1. This is in line with previous studies using not only stromal cells [28],[29],[43] but also CD40 [8],[44] and TLR9 [9] stimulation in CLL cells culture systems[15]. In summary, our findings demonstrate that the co-culture of CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN promotes the proliferation of chemoresistant primary CLL cells with a phenotype comparable to that from the circulating proliferative CLL cell. CLL therapy is heading towards targeted therapies as new and more effective drugs are emerging. This co-culture system has already been used for testing the survivin inhibitor YM155 which resulted

specifically active to target the proliferative and drug resistant CLL cell compartment[15]. Therefore, this study provides a model for a co-culture system which might serve as a basis for testing these new drugs, particularly in combination, to better select the most active treatment for this disease.

METHODS

Isolation and culture of primary CLL cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 64 patients diagnosed with CLL were obtained by Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) density gradient and subsequently cryopreserved until analysis. Only samples with $\geq 85\%$ of CLL cells (CD19⁺/CD5⁺ cells, as assessed by flow cytometry (FC)) were included in the study. Written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki and the study was approved by the local clinical investigation ethical committee.

Cell lines

The UE6E7T-2 human bone marrow stromal cells (BMSC) cell line was obtained from Riken Cell Bank (Ibaraki, Japan). Cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 2mM L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 50µg/mL penicillin/streptomycin. The T cell acute lymphoblastic leukemia cell line Jurkat was obtained from ATCC and was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2mM L-glutamine, 10% heat-inactivated FBS and 50µg/mL penicillin/streptomycin.

Co-culture conditions

BMSC were seeded at a concentration of 1.5×10^4 cells/mL in 24-well plates and incubated for 24 hours to allow cells to adhere. CLL cells were cultured at a ratio of 100:1 (1.5×10^6 cells/mL) on confluent layers of BMSC in RPMI medium. Cells were stimulated with 1µg/mL CD40L (Peprotech, London, United Kingdom) and/or 1.5µg/mL CpG ODN (ODN2006; Invivogen, San Diego, CA, USA) when indicated. CLL cells were harvested by gently washing off, leaving the adherent stromal cell layer intact.

Flow cytometry

Intracellular staining of Ki-67 was performed using a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled antibody

against Ki-67 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) after fixation and permeabilization using the BD Intrasure kit (Becton Dickinson) following the manufacturer's instructions. Surface staining of cells was performed using the following monoclonal antibodies conjugated with the indicated fluorochrome: CD19-phycoerythrin (PE) and CD5-allophycocyanine (APC) (Becton Dickinson). To characterize the phenotype of proliferative and resting compartments of CLL cells, we used the following antibodies: CD19-energy coupled dye (ECD), CD5-phycoerythrin-cyanine 5.5 (PC5.5) (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CD3-PE-cyanine 7 (Cy7), CXCR4-APC, CXCR5-APC, CCR7-APC, CD49d-APC, CD62L-APC, Ki-67-FITC (Becton Dickinson), and CD38-PE (EBioscience, San Diego, CA, USA). The rates of T cell activation and proliferation were analyzed by determining the expression of Ki-67, CD69 and CD38 in CD3⁺ cells using the following antibodies: Ki-67-FITC, CD38-PE (EBioscience), CD5-PC5.5 (Beckman Coulter), CD3-PE-Cy7 and CD69-APC (Becton Dickinson). Cells were acquired in a NaviosTM cytometer (Beckman Coulter) and the results were analyzed using the FCS Express 4 software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

Cell proliferation assay

Cell proliferation was measured using the CellTiter96TM Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) which uses the cellular conversion of MTS tetrazolium compound into a colored formazan product. A total of 7.5×10^4 CLL cells per well were seeded in a 96-well plate in 100 μ L of RPMI and 20 μ L of MTS. Plates were incubated for 1 hour at 37°C and absorbance was measured in a plate reader at 490nm.

Cell cycle analysis

Propidium iodide (PI) was used to determine each phase of the cell cycle according to the DNA content of CLL cells. For this, cells were resuspended in ice-cold 70% ethanol and incubated at -20°C for 30 minutes. Cells were then washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in PBS containing 38nM sodium citrate, 10mg/mL ribonuclease A and 1 μ g/ μ L PI. Cells were finally incubated at 37°C for 30 minutes and subsequently analyzed by FC.

Western blot analysis

Whole cell protein extracts were prepared from 4.5×10^6 cells using 50 μ L lysis buffer containing 20mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) pH 7.4, 1mM EDTA, 140mM NaCl, 1% NP-40 supplemented with 2mM sodium vanadate and protease inhibitor cocktail (Sigma-

Aldrich, San Louis, MO, USA) for 1 hour at 4°C. Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of denatured protein were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Membranes were blocked for 1 hour at room temperature (RT) in 5% milk/TBS-T. Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against ZAP-70, Mcl-1 and Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA), and GAPDH (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Immunodetection was done with the corresponding IgG HRP-linked secondary antibodies (Dako North America, Glostrup, Denmark), and the ECL chemiluminescence detection system (GE Healthcare). Chemiluminescent images were acquired with the LAS-4000 system (Buckinghamshire, United Kingdom). Protein expression was subsequently quantified using the Image J 1.46r software (National Institutes of Health).

Reagents

Fludarabine and bendamustine (Sigma, St Louis, MO, USA) were dissolved in DMSO and stored at -20°C.

Assessment of apoptosis

Apoptosis was assessed by analyzing the binding of annexin V-FITC and the incorporation of PI by FC. Annexin V/PI double negative cells were considered viable cells. Staining was performed according to the manufacturer's instructions using the annexin V-FITC apoptosis detection kit (Bender Medsystems, Vienna, Austria).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments. The statistically significant difference between groups was analyzed using the Mann-Whitney test or one or two-way ANOVA (*t* test), and $P < 0.05$ was considered significant. Lethal dose 50 (LD₅₀) values were calculated with GraphPad Prism software version 5.0 (San Diego, CA, USA). Analyses were performed using the biostatistics software package SPSS version 17 (IBM, Chicago, IL, USA). Results were graphed with GraphPad Prism software.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research funding from the Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI11/00792, F.B and PI13/00279, M.C). N.P.

is a recipient of a PhD fellowship granted by Institut de Recerca Vall d'Hebron. C.C. is supported by a grant from Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH). M.C. holds a contract from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (RYC-2012-12018).

REFERENCES

1. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005; 352: 804–815.
2. Reed JC Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood.* 2008; 111: 3322–3330.
3. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, et al. *In vivo* measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest.* 2005; 115: 755–764.
4. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood.* 2009; 114: 3367–3375.
5. Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F, Ruffing N, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol.* 2002; 32: 1403–1413.
6. 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.
7. 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.
8. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1999; 106: 995–1004.
9. Jahrsdörfer B, Jox R, Mühlhoff L, Tschoep K, Krug A, Rothenfusser S, Meinhardt G, Emmerich B, Endres S, Hartmann G Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J Leukoc Biol.* 2002; 72: 83–92.
10. Burger M, Hartmann T, Krome M, Rawluk J, Tamamura H, Fujii N, Kipps TJ, Burger JA Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2005; 106: 1824–1830.
11. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, Leone G, Efremov DG Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2005; 105: 4820–4827.
12. Mudry RE, Fortney JE, York T, Hall BM, Gibson LF Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood.* 2000; 96: 1926–1932.
13. Burger JA Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol.* 2010; 20: 424–430.
14. Ponzoni M, Doglioni C, Caligaris-Cappio F Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymph node microenvironment. *Semin Diagn Pathol.* 2011; 28: 161–166.
15. Purroy N, Abrisqueta P, Carabia J, Carpio C, Calpe E, Palacio C, Castellví J, Crespo M, Bosch F Targeting the proliferative and chemoresistant compartment in chronic lymphocytic leukemia by inhibiting survivin protein. *Leukemia.* 2014; 28: 1993–2004.
16. Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan X-J, Yancopoulos S, et al. Intracлонаl complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med Camb Mass.* 2011; 17: 1374–1382.
17. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011; 118: 4313–4320.
18. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011; 117: 563–574.
19. Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002; 100: 4609–4614.
20. Damle RN, Temburni S, Calissano C, Yancopoulos S, Banapour T, Sison C, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood.* 2007; 110: 3352–3359.
21. Šoljić V, Perak RB, Vukojević K, Saraga-Babić M, Bubalo P, Karan D, Todorović J, Batinić D ZAP-70 expression and proliferative activity in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2013; 54: 1171–1176.
22. Calpe E, Codony C, Baptista MJ, Abrisqueta P, Carpio C, Purroy N, Bosch F, Crespo M ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood.* 2011; 118: 4401–4410.
23. Calpe E, Purroy N, Carpio C, Abrisqueta P, Carabia J, Palacio C, Castellví J, Crespo M, Bosch F ZAP-70 promotes the infiltration of malignant B-lymphocytes into the bone marrow by enhancing signaling and migration

- after CXCR4 stimulation. *PLoS One*. 2013; 8: e81221.
24. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003; 348: 1764–1775.
 25. Ghia P, Circosta P, Scielzo C, Vallario A, Camporeale A, Granziero L, Caligaris-Cappio F Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 294: 135–145.
 26. Pepper C, Hoy T, Bentley P Elevated Bcl-2/Bax are a consistent feature of apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and are correlated with *in vivo* chemoresistance. *Leuk Lymphoma*. 1998; 28: 355–361.
 27. Kitada S, Andersen J, Akar S, Zapata JM, Takayama S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *In vitro* and *In vivo* chemoresponses. *Blood*. 1998; 91: 3379–3389.
 28. Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*. 2009; 114: 4441–4450.
 29. Kay NE, Shanafelt TD, Strega AK, Lee YK, Bone ND, Raza A Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an “angiogenic switch.” *Leuk Res*. 2007; 31: 899–906.
 30. Ding W, Nowakowski GS, Knox TR, Boysen JC, Maas ML, et al. Bi-directional activation between mesenchymal stem cells and CLL B-cells: implication for CLL disease progression. *Br J Haematol*. 2009; 147: 471–483.
 31. Fluckiger AC, Rossi JF, Bussel A, Bryon P, Banchereau J, Defrance T Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood*. 1992; 80: 3173–3181.
 32. Ranheim EA, Kipps TJ Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med*. 1993; 177: 925–935.
 33. Buske C, Gogowski G, Schreiber K, Rave-Fränk M, Hiddemann W, Wörmann B Stimulation of B-chronic lymphocytic leukemia cells by murine fibroblasts, IL-4, anti-CD40 antibodies, and the soluble CD40 ligand. *Exp Hematol*. 1997; 25: 329–337.
 34. Grzybowska-Izydorczyk O, Cebula B, Robak T, Smolewski P Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2010; 46: 800–810.
 35. Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000; 95: 999–1006.
 36. Tromp JM, Tonino SH, Elias JA, Jaspers A, Luijckx DM, Kater AP, van Lier RAW, van Oers MHJ, Eldering E Dichotomy in NF-kappaB signaling and chemoresistance in immunoglobulin variable heavy-chain-mutated versus unmutated CLL cells upon CD40/TLR9 triggering. *Oncogene*. 2010; 29: 5071–5082.
 37. Jahrsdörfer B, Hartmann G, Racila E, Jackson W, Mühlhoff L, Meinhardt G, Endres S, Link BK, Krieg AM, Weiner GJ CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol*. 2001; 69: 81–88.
 38. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 1996; 184: 1101–1109.
 39. Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med*. 1998; 187: 655–660.
 40. Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M, Nishimura M, Kakizaki M, Nomiyama H, Yoshie O Molecular cloning of a novel human CC chemokine EB11-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EB11, CCR7. *J Biol Chem*. 1997; 272: 13803–13809.
 41. Ohl L, Henning G, Krautwald S, Lipp M, Hardtke S, Bernhardt G, Pabst O, Förster R Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J Exp Med*. 2003; 197: 1199–1204.
 42. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, Gardiner A, Mould S, Oscier D, Copplestone JA, Prentice AG 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.
 43. 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.
 44. Willimott S, Baou M, Huf S, Deaglio S, Wagner SD Regulation of CD38 in proliferating chronic lymphocytic leukemia cells stimulated with CD154 and interleukin-4. *Haematologica*. 2007; 92: 1359–1366.

Article 2

Tractament dirigit al compartiment proliferant i quimioresistent de Leucèmia Limfàtica Crònica mitjançant la inhibició de la proteïna survivina

Les cèl·lules d'LLC que resideixen en els centres proliferatius del moll de l'os i ganglis limfàtics es troben estimulades constantment per cèl·lules accessòries com limfòcits T i cèl·lules estromals, que els donen senyals de supervivència i proliferació i potencien la resistència de les cèl·lules d'LLC al tractament quimioteràpic.

En aquest estudi, vam dissenyar una estratègia experimental amb l'objectiu de reproduir el microambient que les cèl·lules d'LLC troben en els centres proliferatius per tal de testar un tractament específicament dirigit a les cèl·lules d'LLC proliferants. Per a això, vam co-cultivar cèl·lules primàries d'LLC amb cèl·lules estromals del moll de l'os i l'estimulació simultània dels receptors CD40 i TLR9.

Vam observar com aquest sistema de co-cultiu induïa proliferació, activació del cicle cel·lular i una marcada quimioresistència al tractament amb fludarabina i bendamustina de les cèl·lules d'LLC. Aquestes cèl·lules morfològicament mostraven unes característiques típiques de limfòcit B activat i expressaven la proteïna survivina. La proteïna survivina és un membre de la família de proteïnes inhibidores de l'apoptosi que és expressada principalment per les cèl·lules d'LLC dels centres proliferatius.

Per tal de tractar específicament les cèl·lules d'LLC proliferants i quimioresistents, vam estudiar els efectes del tractament amb YM155, un inhibidor de la proteïna survivina. I el que vam observar va ser que l'YM155 suprimia l'expressió induïda pel co-cultiu de la survivina, i això va ser suficient per inhibir la proliferació i induir eficaçment l'apoptosi del compartiment proliferant de cèl·lules d'LLC. A més a més, cal subratllar que la sensibilitat al tractament amb YM155 va resultar independent a l'existència de marcadors de mal pronòstic, incloent la delecció del cromosoma 17p.

Per tant, aquests resultats demostren per primer cop l'eficàcia *in vitro* de l'YM155 en les cèl·lules d'LLC proliferants el que dóna suport al desenvolupament clínic d'aquest fàrmac en pacients diagnosticats de LLC.

ORIGINAL ARTICLE

Targeting the proliferative and chemoresistant compartment in chronic lymphocytic leukemia by inhibiting survivin protein

N Purroy¹, P Abrisqueta¹, J Carabia¹, C Carpio¹, E Calpe¹, C Palacio¹, J Castellví², M Crespo^{1,3} and F Bosch^{1,3}

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells located in proliferation centers are constantly stimulated by accessory cells, which provide them with survival and proliferative signals and mediate chemotherapy resistance. Herein, we designed an experimental strategy with the aim of mimicking the microenvironment found in the proliferative centers to specifically target actively proliferating CLL cells. For this, we co-cultured CLL cells and bone marrow stromal cells with concomitant CD40 and Toll-like receptor 9 stimulation. This co-culture system induced proliferation, cell-cycle entry and marked resistance to treatment with fludarabine and bendamustine. Proliferating CLL cells clustered together showed a typical morphology of activated B cells and expressed survivin protein, a member of the inhibitor of apoptosis family that is mainly expressed by CLL cells in the proliferation centers. With the aim of specifically targeting actively proliferating and chemoresistant CLL cells, we investigated the effects of treatment with YM155, a small-molecule survivin inhibitor. YM155 treatment suppressed the co-culture-induced survivin expression and that was sufficient to inhibit proliferation and effectively induce apoptosis particularly in the proliferative subset of CLL cells. Interestingly, sensitivity to YM155 was independent from common prognostic markers, including 17p13.1 deletion. Altogether, these findings provide a rationale for clinical development of YM155 in CLL.

Leukemia advance online publication, 25 April 2014; doi:10.1038/leu.2014.96

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most common type of leukemia in western countries, is characterized by the accumulation and proliferation of monoclonal CD5+ mature B cells in peripheral blood, lymph nodes and bone marrow.¹ Despite that CLL has been historically considered as a non-proliferative disease,² the relevance of proliferation in the pathogenesis and natural history of this disease is currently highlighted by several recent studies.³ CLL cells receive the strongest proliferative signals in the so-called 'pseudofollicles' found in lymphoid organs;⁴ moreover, a higher degree of proliferation is related to a more aggressive clinical behavior.^{3,5} CLL cells are dependent on different survival and proliferative signals from the microenvironment, which is mainly evidenced by the rapid apoptosis that they undergo *ex vivo*. *In vivo*, CLL cells are nurtured by different accessory cells such as monocyte-derived nurse-like cells,⁶ follicular dendritic cells,⁷ bone marrow stromal cells (BMSCs)⁸ and T lymphocytes.^{9–11} BMSCs are known to support proliferation and to attract and protect CLL cells from spontaneous and chemotherapy-induced apoptosis.¹² These proliferative and chemoresistant CLL cells are probably accounting for the minimal residual disease persistence,^{8,13} which is related to shorter progression-free and overall survival,¹⁴ and for relapses observed in all patients after treatment, except in some patients that undergo allogeneic stem cell transplant. CLL cells in the proliferation centers are also stimulated by T cells through the CD40 receptor,^{10,15} which gives strong anti-apoptotic signals and can also mediate chemotherapy resistance.^{16–18} However, CD40 stimulation does not induce a significant proliferation.¹⁹ Concerning proliferative stimuli, previous reports showed that stimulating the Toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN)

induces proliferation, cytokine production and an immunogenic phenotype in CLL cells;^{20,21} moreover, its role in chemoresistance by upregulating LTA/TNF- β , NOL3 and CD40 genes has been recently proved.²²

Survivin protein is a member of the inhibitor of apoptosis protein family²³ that is sharply differentially expressed in many cancer cells compared with their normal counterparts.^{24–26} In CLL, survivin is mainly expressed by actively proliferating cells located in the proliferation centers.^{9,27,28} In addition, survivin expression in peripheral blood of patients with CLL has been related to a worse response to treatment.²⁹ YM155 is a small-molecule survivin suppressant that inhibits the transcription from the promoter of the survivin gene. YM155 has demonstrated antitumoral activity in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models, in both solid^{30–32} and hematologic malignancies.^{33–37} In the clinical setting, YM155 is currently under evaluation in B-cell lymphomas^{38,39} and a variety of solid tumors.^{40,41} In the present study, we hypothesized that suppression of survivin expression by YM155 could specifically target the actively proliferating CLL cells, which are usually resistant to conventional treatments. To ascertain the therapeutic potential of survivin inhibition in patients with CLL, we analyzed the effect of YM155 on primary CLL cells cultured in conditions that recreate the microenvironment found in the proliferative niches.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and culture of primary CLL cells

Peripheral blood mononuclear cells from 27 patients diagnosed with CLL were obtained by Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) density gradient and stored in liquid nitrogen until analysis. Only samples

¹Laboratory of Experimental Hematology, Department of Hematology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain and ²Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr F Bosch, Department of Hematology, Vall d'Hebron University Hospital, Pg de la Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain.

E-mail: fbosch@vhebron.net

³These authors contributed equally to this work.

Received 18 October 2013; revised 20 February 2014; accepted 4 March 2014; accepted article preview online 12 March 2014

with $\geq 85\%$ of CLL cells (CD19+/CD5+ cells, as assessed by flow cytometry (FC)) were included in the study. Cytogenetic alterations (17p13.1, 11q22.3 and 13q14.3 deletions and trisomy 12) were determined by fluorescent *in situ* hybridization. The characteristics of the patients are listed in Table 1. Written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki and the study was approved by the local clinical investigation ethical committee.

Cell lines

The UE6E7T-2 human BMSC cell line was obtained from Riken Cell Bank (Ibaraki, Japan). Cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 50 µg/ml penicillin/streptomycin. The T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line Jurkat was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 50 µg/ml penicillin/streptomycin.

Co-culture conditions

BMSCs were seeded at a concentration of 1.5×10^4 cells/ml in 24-well plates and incubated for 24 h to allow cells to adhere. CLL cells were cultured at a ratio of 100:1 (1.5×10^6 cells/ml) on confluent layers of BMSC in supplemented RPMI with 1 µg/ml CD40L (Peprotech, London, UK) and 1.5 µg/ml CpG ODN (ODN2006; Invivogen, San Diego, CA, USA). At the indicated time points, CLL cells were harvested by gently washing off, leaving the adherent stromal cell layer intact.

Proliferation assays

The rate of proliferation was analyzed by determining the expression of Ki-67 by FC. Intracellular staining was performed using a fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled antibody against Ki-67 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) after fixation and permeabilization using the BD Intrasure kit (Becton Dickinson) following the manufacturer's instructions. Surface staining of cells was performed using the following monoclonal

antibodies conjugated with the indicated fluorochrome: CD19-phycoerythrin (PE) and CD5-allophycocyanine (Becton Dickinson). To characterize the proliferative and resting compartments of CLL cells defined by Calissano *et al.*,⁴² CLL cells were stained with the following antibodies: CD19-energy coupled dye, CD5-phycoerythrin-cyanine 5.5 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CD3- phycoerythrin-cyanine 7, CXCR4-allophycocyanine and Ki-67-FITC (Becton Dickinson). Cells were acquired in a Navios cytometer (Beckman Coulter) and the results were analyzed using the FCS Express 4 software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA). The rates of T-cell activation and proliferation were analyzed by determining the expression of Ki-67, CD69 and CD38 by FC in CD3+ cells. Intracellular staining of Ki-67 was performed as mentioned above. Surface staining of T cells was performed using the following antibodies: CD38-phycoerythrin (EBioscience, San Diego, CA, USA), CD5-phycoerythrin-cyanine 5.5 (Beckman Coulter), CD3-phycoerythrin-cyanine 7 and CD69-allophycocyanine (Becton Dickinson).

Cell-cycle analysis

Propidium iodide (PI) was used to determine each phase of the cell cycle according to the DNA content of CLL cells. For this, cells were resuspended in ice-cold 70% ethanol and incubated at -20 °C for at least 30 min. Cells were then washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in PBS containing 38 mM sodium citrate, 10 mg/ml ribonuclease A and 1 µg/µl PI. Cells were finally incubated at 37 °C for 30 min and subsequently analyzed by FC.

Western blot analysis

Whole-cell protein extracts were prepared from 3×10^6 cells using 100 µl lysis buffer containing 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) pH 7.4, 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 1% NP-40 supplemented with 2 mM sodium vanadate and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 30 min at 4 °C. Protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of denatured protein were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Membranes were blocked for

Table 1. Clinico-biological characteristics of the series of patients with CLL

Patient id	Age (years)	Gender	Stage Binet/ Rai	ZAP70 (%)	CD38 (%)	del17p (%)	Other cytogenetic alterations	Previous therapy	Response	Time since last therapy (months)
CLL01	67	M	A1	90	0	0	12	R-B	PR	6
CLL03	54	M	B2	1	33	14	None	None	n.a.	—
CLL04	75	F	A0	81	0	42	del13q	None	n.a.	—
CLL05	72	M	A1	33	0	0	12	None	n.a.	—
CLL06	53	F	A0	85	0	0	None	None	n.a.	—
CLL07	66	M	A0	11	36	24	del13q	None	n.a.	—
CLL08	64	M	A0	34	6	0	None	None	n.a.	—
CLL10	70	M	A0	8	0	0	None	None	n.a.	—
CLL11	78	F	B1	2	55	0	None	R-Cib	CR	12
CLL12	65	M	B2	59	25	0	None	R-FC	CR	26
CLL13	72	F	A0	8	66	0	None	R-Cib	PR	4
CLL14	42	M	A0	86	0	0	None	None	n.a.	—
CLL15	77	M	C4	2	12	0	del13q	None	n.a.	—
CLL18	63	M	B1	52	0	0	del13q	None	n.a.	—
CLL19	71	M	B1	1	56	17	del11q	R-FC	CR	35
CLL20	50	M	A1	2	0	0	None	None	n.a.	—
CLL21	77	M	A0	9	24	0	None	None	n.a.	—
CLL22	81	F	A0	77	0	0	del13q	None	n.a.	—
CLL25	85	F	B1	57	0	17	None	R-PC	CR	48
CLL26	86	M	A0	4	0	74	12	None	n.a.	—
CLL27	60	M	A0	27	25	0	None	None	n.a.	—
CLL28	44	M	A0	57	32	0	None	None	n.a.	—
CLL29	76	M	A0	28	18	0	None	None	n.a.	—
CLL30	85	F	C4	0	19	0	None	R-Cib	PD	1
CLL31	60	M	A0	1	0	0	None	None	n.a.	—
CLL33	78	F	A1	2	0	0	12	None	n.a.	—
CLL34	67	M	B2	50	0	0	None	None	n.a.	—

Abbreviations: B, Bendamustine; C, Cyclophosphamide; Cib, Chlorambucil; F, female; F, Fludarabine; M, male; n.a., not applicable; n.d., not determined; P, Pentostatin; R, Rituximab.

1 h at room temperature in 5% milk/TBS-T. Membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against survivin (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), PARP (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), Mcl-1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Bcl-2, tubulin, GAPDH and α -actin (Abcam, Cambridge, UK). Immunodetection was done with the corresponding IgG HRP-linked secondary antibodies (Dako North America, Glostrup, Denmark), and the ECL chemiluminescence detection system (GE Healthcare). Chemiluminescent images were acquired with the LAS-4000 system (Buckinghamshire, UK). Protein expression was subsequently quantified using the Image J 1.46r software (National Institutes of Health).

Reagents

YM155 monobromide (kindly provided by Astellas Pharma, Inc., Tokyo, Japan), fludarabine and bendamustine (Sigma, St Louis, MO, USA) were dissolved in DMSO and stored at -80 °C. Experiments examining caspase-dependent apoptosis included the addition of 20 μ M ZVAD-FMK (Caspase inhibitor; R&D Systems).

Assessment of apoptosis

Apoptosis was assessed analyzing the binding of annexin V-FITC and the incorporation of PI by FC. Staining was performed according to the manufacturer's instructions using the annexin V-FITC apoptosis detection kit (Bender Medsystems, Vienna, Austria). To evaluate the potential synergism between YM155 and fludarabine or bendamustine, a cooperative index (CI) based on the Chou-Talalay method was calculated.⁴³ The following formula was used: CI = sum of specific apoptosis caused by treatment with a single agent/specific apoptosis determined with combined treatment. The percentage of specific apoptosis was determined using the following formula: specific apoptosis (drug-induced apoptosis - spontaneous apoptosis)/(100 - spontaneous apoptosis).

Assessment of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$)

Mitochondrial depolarization was assessed by using 4 nM 3,3'-diethyloxa-carbocyanine iodide (DiOC6[3]; Sigma-Aldrich). For this, 1×10^6 cells were washed once with PBS, resuspended in 1 ml of DiOC6[3] incubated for 15 min in the dark at 37 °C, and then analyzed by FC.

Determination of H2AX phosphorylation

Phosphorylated H2AX was measured by FC using mouse anti-phospho (Ser139) H2AX mAb conjugated with FITC (Biolegend, San Diego, CA, USA) as previously described.⁴⁴

Immunocytochemistry

CLL cells were centrifuged onto glass slides using the Shandon CytoSpin 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) cytocentrifuge. Slides were air dried, fixed with 95% ethanol for 10 min at room temperature, washed with distilled water and subjected to antigen retrieval following the manufacturer's instructions (Target retrieval solution; Dako REAL, Glostrup, Denmark). Then, endogenous peroxidase was quenched with 1 ml peroxidase-blocking solution (Dako REAL) for 5 min. Slides were washed again with PBS and incubated with the rabbit anti-survivin antibody at 1/200 dilution (R&D Systems) for 1 h at 4 °C. After washing with PBS, the slides were incubated at room temperature for 30 min with the anti-rabbit IgG HRP-linked secondary antibody (Dako North America). Color was developed with diaminobenzidine (Dako, Glostrup, Denmark) and counterstained with hematoxylin and then coverslipped.

End point and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from 3×10^6 CLL cells using the RNeasy mini kit and QIAshredder (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions and complementary DNA was synthesized from 600 ng of RNA.

For end point RT-PCR, the following specific oligonucleotide primers were used: survivin-forward (5'-CAGATTGAATCGCGGGACCC-3') and survivin-reverse (5'-CCAAGTCTGGCTCGTCTCAG-3'); and β -actin-forward (5'-GTGGGGCGCCCGACCA-3') and reverse (5'-CTCCTTAATGTACGCA CGATTTC-3').

For QRT-PCR (real-time quantitative PCR) analysis, expression of survivin was analyzed using a pre-developed TAQMAN assay (Hs03043574_m1) and the ABI PRISM 7900 sequence detector instrument (Applied

Biosystems, Foster City, CA, USA). The comparative Ct method ($\Delta\Delta Ct$) for relative quantification of gene expression was used. β -Glucuronidase gene expression was used as an internal control, and mRNA-expression levels were given as arbitrary units referred to calibrator sample (Jurkat mRNA).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm s.e.m. of at least three independent experiments. Difference between groups was analyzed using the Mann-Whitney test or one or two-way ANOVA (*t*-test), and $P < 0.05$ was considered as statistically significant. Lethal dose 50 (LD₅₀) values were calculated with GraphPad Prism software version 5.0 (San Diego, CA, USA). Analyses were performed using the biostatistics software package SPSS version 17 (IBM, Chicago, IL, USA). Results were graphed with GraphPad Prism software.

RESULTS

The co-culture of primary CLL cells with BMSC, CD40L and CpG ODN induces active proliferation of CLL cells

CLL cells located in bone marrow and lymph nodes can receive diverse survival and proliferative signals from the microenvironment, which ultimately makes them more resistant to external apoptotic signals. To partially *ex vivo* mimic the microenvironment found in the proliferative centers, we co-cultured primary CLL cells with the BMSC cell line UE6E7T-2 and stimulated them with soluble CD40L and CpG ODN. In this setting, proliferative responses assessed by Ki-67 expression were already observed after 24 h and further increased at 48 and 72 h (Figure 1a). Unlike previous studies,^{19,45} we did not observe any correlation between IGHV status, ZAP-70 or CD38 expression and induction of proliferation, probably because the small size of the series analyzed (data not shown). We also characterized the proliferative and resting compartments using differences in the expression of CD5 and CXCR4 by FC as previously defined by Calissano *et al.*⁴² Co-culture of CLL cells for 48 h induced a significant increase in the number of cells in the proliferative compartment, defined as CXCR4^{dim}CD5^{bright} (Figure 1b) (mean % CXCR4^{dim}CD5^{bright} cells: 23.16 \pm 7.25 in co-culture vs 5.67 \pm 2.52 in suspension, $P < 0.05$). As expected, the CXCR4^{dim}CD5^{bright} fraction was significantly enriched in Ki-67-positive cells after 48 h of co-culture compared with cells in suspension and with the CXCR4^{bright}CD5^{dim} fraction (Figure 1c). Cell-cycle analysis showed that after 48 h of co-culture CLL cells entered into S/G2/M phase, this increasing at 72 h (Figure 1d; Supplementary Figure S1) (mean % cells in S phase at 24 h vs 72 h: 1.01 \pm 0.31 vs 37.72 \pm 7.10, $P < 0.01$; G2/M phase: 0.09 \pm 0.06 vs 7.25 \pm 6.45, $P > 0.05$).

To elucidate whether the co-culture system used also affected the activation of T lymphocytes, we assessed their Ki-67, CD38 and CD69 expression. In all samples, the percentage of T cells was inferior to 10%. The co-culture for 48 h induced the upregulation of both CD38 and CD69 expression compared with cells in suspension (Supplementary Figure S2A and B) (mean CD38 mean fluorescence intensity (MFI) for T cells in suspension vs in co-culture: 107.7 \pm 10.04 vs 202.8 \pm 25.06, $P < 0.01$; mean CD69 MFI for T cells in suspension vs in co-culture: 50.92 \pm 6.48 vs 83.97 \pm 13.61, $P < 0.01$). In addition, the rate of proliferation also increased after 48 h of co-culture (Supplementary Figure S2C) (mean % Ki-67-positive T cells in suspension vs in co-culture: 0.61 \pm 0.2 vs 2.08 \pm 0.66, $P < 0.01$).

YM155 inhibits the upregulation of survivin induced by the co-culture of CLL cells

To determine whether the exposure of CLL cells to these proliferative culture conditions was able to induce survivin expression, we analyzed its expression by RT-PCR, western blotting and immunocytochemistry at different time points. Primary CLL cells in suspension did not express survivin at the mRNA or the protein level overtime. Importantly, co-culture of CLL

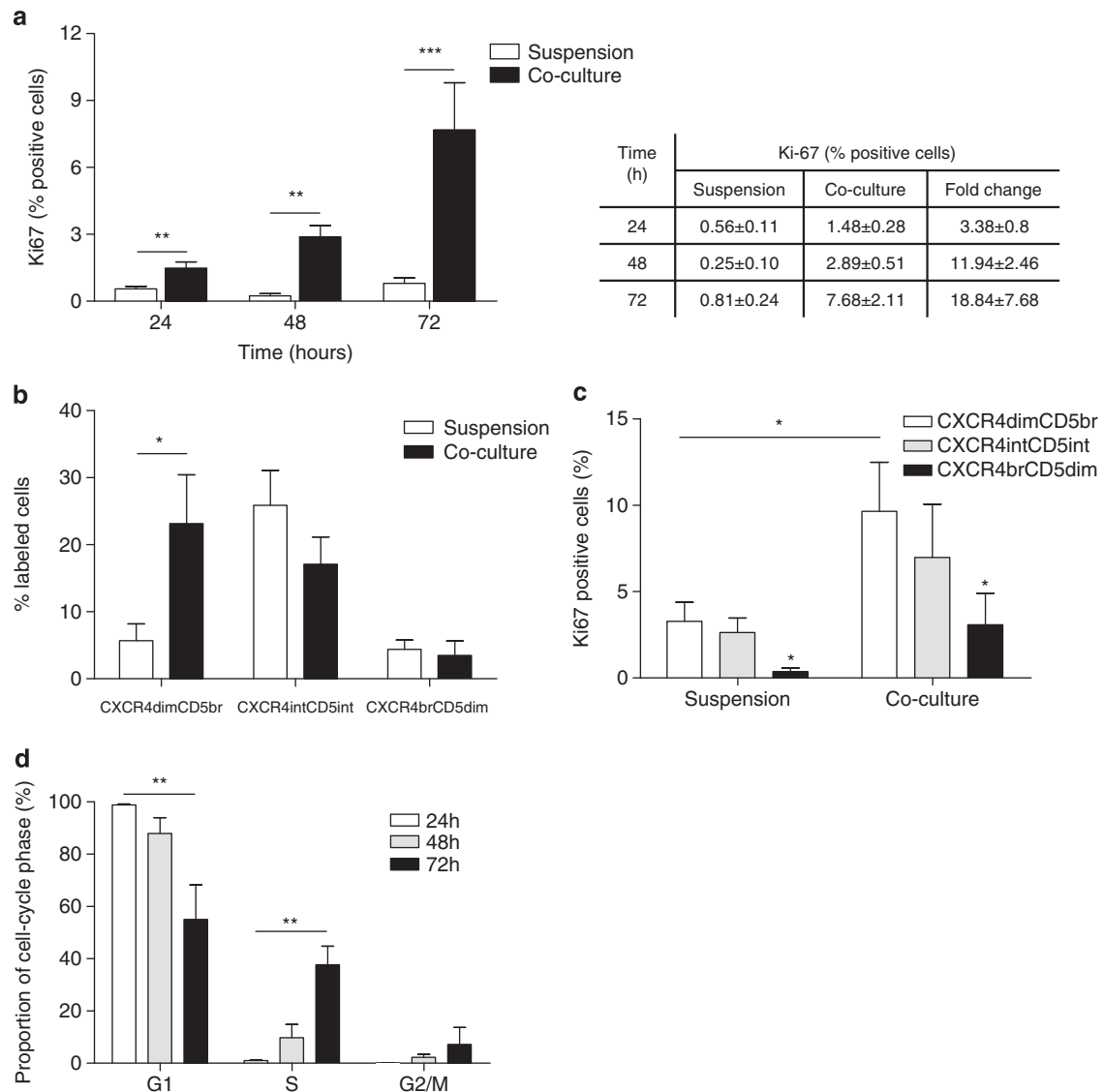


Figure 1. The co-culture of primary CLL cells with BMSCs, CD40L and CpG ODN induces active proliferation of CLL cells. **(a)** CLL cells from eight patients were cultured in suspension or in co-culture for 24, 48 and 72 h before analysis of expression of Ki-67 by FC after. Graph shows mean \pm s.e.m. (values in right panel table). **(b)** Analysis of CXCR4 and CD5 expression by FC in CLL cells from seven patients cultured in suspension or in co-culture for 48 h. **(c)** Expression of Ki-67 in CLL cells according to CXCR4 and CD5 expression in seven patients with CLL. **(d)** Cell-cycle analysis of CLL cells from three patients cultured in suspension or in co-culture for 24, 48 and 72 h. These patients are not included in Figure 1a ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, two-way ANOVA, Bonferroni's post-test. Error bars represent \pm s.e.m.).

cells induced the expression of survivin mRNA and protein in a time-dependent manner, starting after 24 h and being more evident after 72 h at the protein level (Figures 2a–d). Immunocytochemical analysis of CLL cells in suspension and after 24, 48 and 72 h of co-culture confirmed the induction of survivin expression previously observed by western blotting. Of note, already after 24 h of co-culture CLL cells increased their size, resembling stimulated B cells, and tended to be located in sparse clusters that included dividing cells (Figure 2e). Thus, we did not detect survivin expression in suspension cells at any time point, while it appeared slightly expressed after 24 h of co-culture and became much more evident after 48 and 72 h.

To assess the effect of survivin suppressant YM155 in actively proliferating survivin-positive CLL cells, we stimulated CLL cells for 48 h in our co-culture system before exposing them to YM155 for additional 24 h. Using this approach, we observed that YM155 treatment was able to almost completely abrogate survivin expression at protein level (Figures 2c–e) whereas the levels of

mRNA were not affected, indicating that the blockage at the promoter level for 24 h was probably not sufficient to observe the degradation of survivin mRNA in this experimental setting. Interestingly, the immunocytochemical analysis also showed that after 24 h of YM155 treatment the number of large dividing cells markedly declined and clusters of CLL cells virtually disappeared (Figure 2e).

Actively proliferating CLL cells are more sensitive to the apoptosis induced by the treatment with YM155

To determine the ability of YM155 to induce apoptosis in actively proliferating primary CLL cells, cells from six patients with CLL were treated with YM155 under proliferative or control (suspension) conditions. After 48 h of culture, CLL cells were treated with different concentrations of YM155 and harvested 24 h later. Only in co-culture conditions, YM155 at concentrations ranging from 50 to 800 nM significantly decreased the viability of CLL cells in a dose-dependent manner (Figures 3a–c). Interestingly, the LD₅₀ for

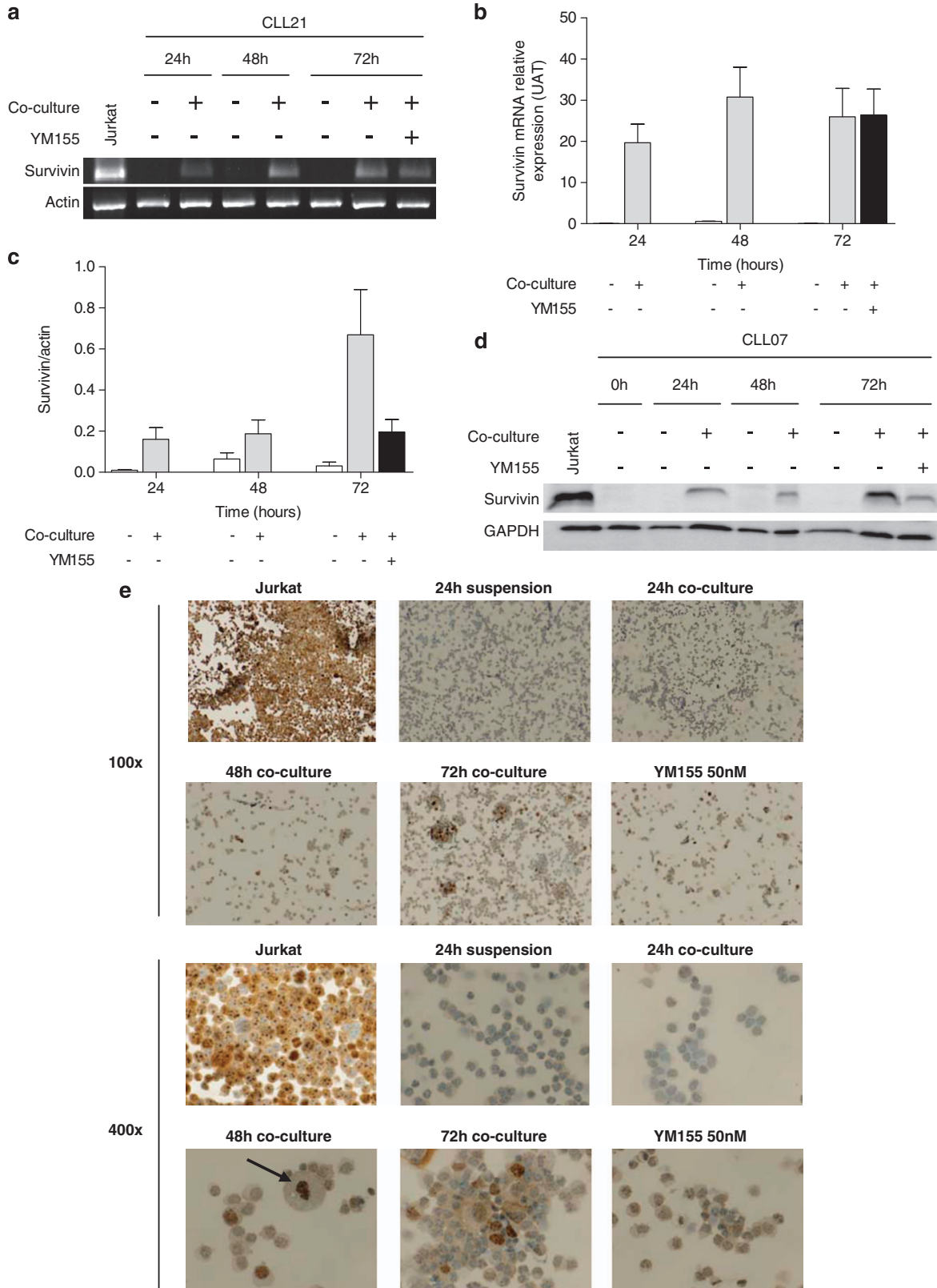


Figure 2. Treatment with YM155 suppresses the expression of survivin in proliferating primary CLL cells. CLL cells were cultured in suspension or in co-culture for up to 72 h. 50 nM YM155 was added after 48 hours of co-culture for additional 24 h. The Jurkat cell line was used as a positive control for survivin expression. **(a)** A representative RT-PCR analysis of survivin. **(b)** Quantification of survivin expression analyzed by QRT-PCR (arbitrary units, AU). Each bar represents the mean \pm s.e.m. from triplicates. **(c)** Quantification of survivin expression analyzed by western blotting relative to α -actin. Each bar represents the mean \pm s.e.m. from four patients. **(d)** A representative immunoblot analysis of survivin expression. **(e)** Immunocytochemical analysis of survivin expression in primary CLL cells ($\times 100$ and $\times 400$ magnification of one representative patient). The arrow indicates a dividing cell.

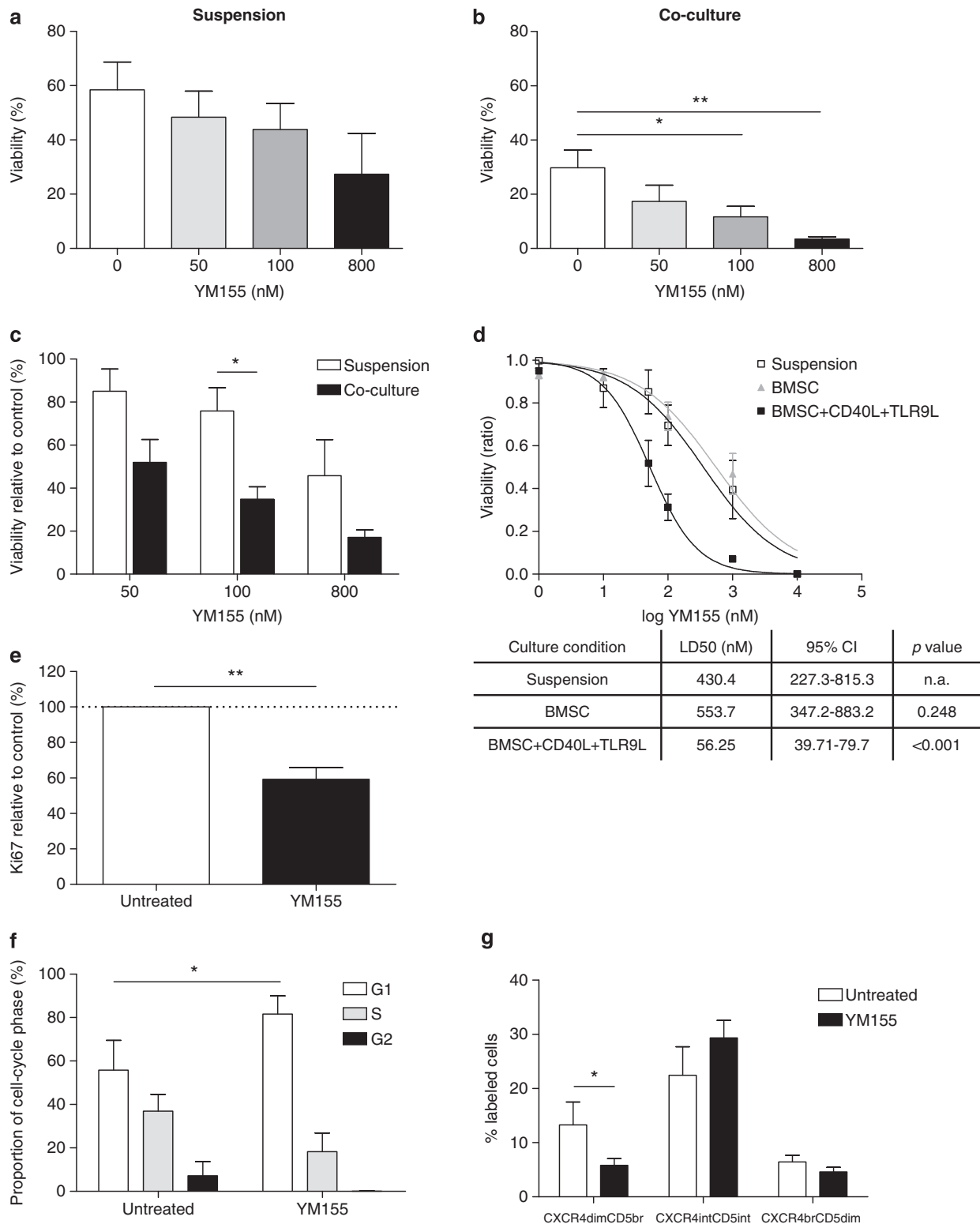


Figure 3. Cytotoxicity and anti-proliferative effects of treatment of primary CLL cells with YM155. CLL cells in suspension or in co-culture were incubated with increasing doses of YM155. Annexin V/PI double negative cells were considered as viable cells. **(a)** Viability (%) of primary CLL cells in suspension from six patients with CLL. **(b)** Viability (%) of primary CLL cells in co-culture from six patients with CLL (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ non-paired T -test, Mann–Whitney post-test). **(c)** Viability relative to control (%) in six patients with CLL (* $P < 0.05$, two-way ANOVA, Bonferroni's post-test). **(d)** Comparison between lethal dose 50 (LD_{50}) curves for CLL cells in suspension, in co-culture with BMSC and in complete co-culture. **(e)** Mean percentage of Ki-67-positive cells relative to control in CLL cells from 12 patients treated with 50 nM YM155 for 24 h after 48 h of co-culture (** $P < 0.01$, one-way ANOVA). **(f)** Cell-cycle distribution in primary CLL cells from three patients after 24 h of 50 nM YM155 treatment (* $P < 0.01$, two-way ANOVA, Bonferroni's post-test). **(g)** CLL sub-populations defined by CXCR4 and CD5 expression were analyzed after 24 h of treatment with 50 nM YM155 in seven patients with CLL (* $P < 0.01$, two-way ANOVA, Bonferroni's post-test). Results are shown as mean \pm s.e.m.

CLL cells in proliferative conditions was 7.7 times lower than the one for CLL cells in suspension (LD₅₀ for CLL cells in co-culture: 56.25 nM, 95% confidence interval (CI) 39.71–79.70; LD₅₀ for CLL cells in suspension: 430.4 nM, 95% CI 227.3–815.3) (Figure 3d). To evaluate the specific effect of YM155 treatment also on non-proliferating CLL cells bred on stroma, we calculated the LD₅₀ of primary CLL cells cultured on BMSC without CpG ODN/CD40L. The LD₅₀ obtained did not differ from the LD₅₀ for CLL cells in suspension (LD₅₀ for CLL cells on BMSC: 553.7 nM, 95% CI 347.2–883.2), indicating that CLL cells cultured in proliferative conditions resulted more sensitive to YM155 treatment.

Following this, we analyzed the effect of YM155 on the proliferation of CLL cells by measuring Ki-67 expression, G1 arrest, and changes in CXCR4^{dim}/CD5^{bright} sub-population. Primary CLL cells were co-cultured for 48 h, as described above, and treated with 50 nM YM155 for 24 h. This treatment caused a drastic reduction of 40.74 ± 6.59% in the proportion of Ki-67 expressing CLL cells (Figure 3e). Moreover, after treatment with YM155 the proportion of cells in G1 phase increased from 55.04 ± 13.28% in untreated controls to 81.61 ± 8.47% in YM155-treated CLL cells ($P < 0.05$) and the proportion of cells in S and G2 phases was reduced from 36.99 ± 7.12% to 18.26 ± 8.59% and from 7.25 ± 6.45 to 0.13 ± 0.13% respectively, although the differences did not reach statistical significance (Figure 3f). Finally, treatment with YM155 significantly reduced the CXCR4^{dim}/CD5^{bright} fraction, whereas the proportion of the non-proliferative compartments was not affected by the treatment (Figure 3g) (CXCR4^{dim}/CD5^{bright} cells in untreated controls: 13.29 ± 4.21% and after YM155 treatment: 5.82 ± 1.24% ($P < 0.05$)). Altogether, these data provide strong evidence that YM155 treatment is able to efficiently overcome microenvironment-mediated survival and proliferative signaling and that it has specific effect on actively proliferating CLL cells.

YM155 induces caspase-dependent apoptosis in primary CLL cells without induction of a DNA damage response

To assess the role of caspases in the cytotoxicity induced by the treatment with YM155, CLL cells stimulated in co-culture for 48 h were treated with 50 nM YM155 for 24 h in the presence or the absence of Z-VAD-fmk, a pan-caspase inhibitor. The analysis of annexin V/PI-negative cells showed that both spontaneous and YM155-induced apoptosis were partially inhibited by Z-VAD-fmk treatment (Figure 4a). Additionally, treatment with 50 nM YM155 inhibited survivin expression and induced the cleavage of PARP protein, which was completely abrogated by the addition of Z-VAD-fmk (Figure 4b), thus confirming the participation of caspases in the YM155-induced apoptosis.

To further characterize the cellular mechanisms involved in YM155 cytotoxicity on CLL cells, DiOC6[3] was used to examine changes in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$ m) after treatment with YM155 (Figure 4c). Interestingly, there was a significant enhancement of DiOC6[3] signal in CLL cells after 72 h of co-culture compared with CLL cells in suspension (MFI, 234.2 ± 65.45 vs 92.19 ± 6.98, $P < 0.05$). This enhancement of $\Delta\Psi$ m was completely abrogated by YM155, which induced an evident depolarization of the mitochondrial membrane after 24 h (MFI, 234.2 ± 65.45 for untreated controls vs 133.4 ± 18.87 for YM155-treated cells, $P < 0.05$), indicating that the intrinsic pathway of apoptosis participates in the YM155-induced apoptosis.

Recent data from pre-clinical tests in human prostate cancer cell lines suggested that YM155 killed cells primarily by inducing DNA damage whereas the suppression of survivin expression would be a secondary event.⁴⁶ Therefore, we aimed to assess whether YM155 was able to induce DNA damage in primary CLL cells by analyzing the expression of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX).^{47,48} For this, we cultured primary CLL cells in suspension and in co-culture for 48 h. CLL cells were then treated with 50 nM YM155 for 2, 6, 24 and 48 h and the phosphorylation of H2AX was subsequently

quantified by FC (Figures 4d and e). Cells were also treated with 5 μ g/ml fludarabine and 150 μ M bendamustine as positive controls for induction of DNA damage. As expected, γ H2AX levels increased as early as 6 h after exposure to fludarabine or bendamustine and peaked after 24 h. In contrast, there was no significant increase in H2AX phosphorylation after 6, 24 or 48 h of YM155 treatment. Moreover, we did not observe any enhancement of fludarabine or bendamustine-induced DNA damage when these drugs were combined with YM155. Altogether, these results suggest that apoptosis induced by YM155 in primary CLL cells is not mediated by direct DNA damage.

Effect of YM155 on anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2

Since YM155 treatment also induced apoptosis in CLL cells in suspension which do not express survivin, we aimed to investigate whether YM155 might have additional targets in CLL cells. Some authors have shown downregulation of Mcl-1 and Bcl-2 after YM155 treatment independently from survivin modulation in some cancer cell lines.^{31,34,49} Therefore, we analyzed the expression of the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2 by western blotting after YM155 treatment in CLL cells in suspension and in co-culture (Figure 4f). The induction of apoptosis after YM155 treatment was evidenced by cleavage of PARP protein in both culture conditions. Interestingly, Mcl-1 expression was downregulated after YM155 treatment in CLL cells in suspension and in co-culture while Bcl-2 downregulation was only observed in CLL cells in suspension after YM155 treatment. Expression and inhibition of survivin expression was again only evidenced in CLL cells in co-culture. These results suggest that YM155 downregulated Mcl-1 and Bcl-2 expression independently of the level of survivin expression.

Cytotoxic effects of YM155 in fludarabine and bendamustine-resistant CLL cells

The effect on survival caused by treatment with YM155 combined with fludarabine or bendamustine was analyzed in co-cultured CLL cells. First, we evaluated the induction of resistance to fludarabine and bendamustine treatment by the co-culture system. For this, CLL cells were cultured for 48 h in suspension and on BMSC with or without CD40L and CpG ODN. Subsequently, we added increasing doses of fludarabine or bendamustine for additional 24 h. Interestingly, the co-culture of CLL cells with CD40L and CpG ODN was the condition that showed the highest chemoresistance pattern whereas the co-culture with BMSC induced a consistent but not statistically significant resistance to fludarabine at 10, 100 and 1000 μ M (Figure 5a). The capacity of fludarabine to induce apoptosis in the complete co-culture was inhibited at such extent that it was not possible to calculate its LD₅₀, whereas LD₅₀ of fludarabine in CLL cells in suspension was 416 μ M (95% CI 125.5–1379) and in CLL cells on BMSC was 603.9 μ M (95% CI 399.6–912.5) (Figures 5a and b). To determine whether there was a specific resistance of the proliferative compartment to standard chemotherapy, we analyzed the proliferative and resting compartments according to CXCR4 and CD5 expression after fludarabine treatment. We observed that treatment with fludarabine did not significantly modify the proportion of any of these CLL cells compartments (Figure 5c). For CLL cells treated with bendamustine, LD₅₀ of CLL cells in proliferative conditions was 5.18 times higher than for CLL cells in suspension, while CLL cells cultured on BMSC only showed more resistance to bendamustine treatment at 50 μ M, being the LD₅₀ two times higher than for CLL cells in suspension (Figures 5d and e). These results indicate that CLL cells cultured on BMSC with CD40L and CpG ODN develop the strongest chemoresistance, especially to fludarabine.

We next assessed the effect on survival of YM155 combined with fludarabine or bendamustine in CLL cells cultured on BMSC with CD40L and CpG ODN. Treatment of co-cultured CLL cells with 400 μ M fludarabine had little effect on their viability (Figure 5f)

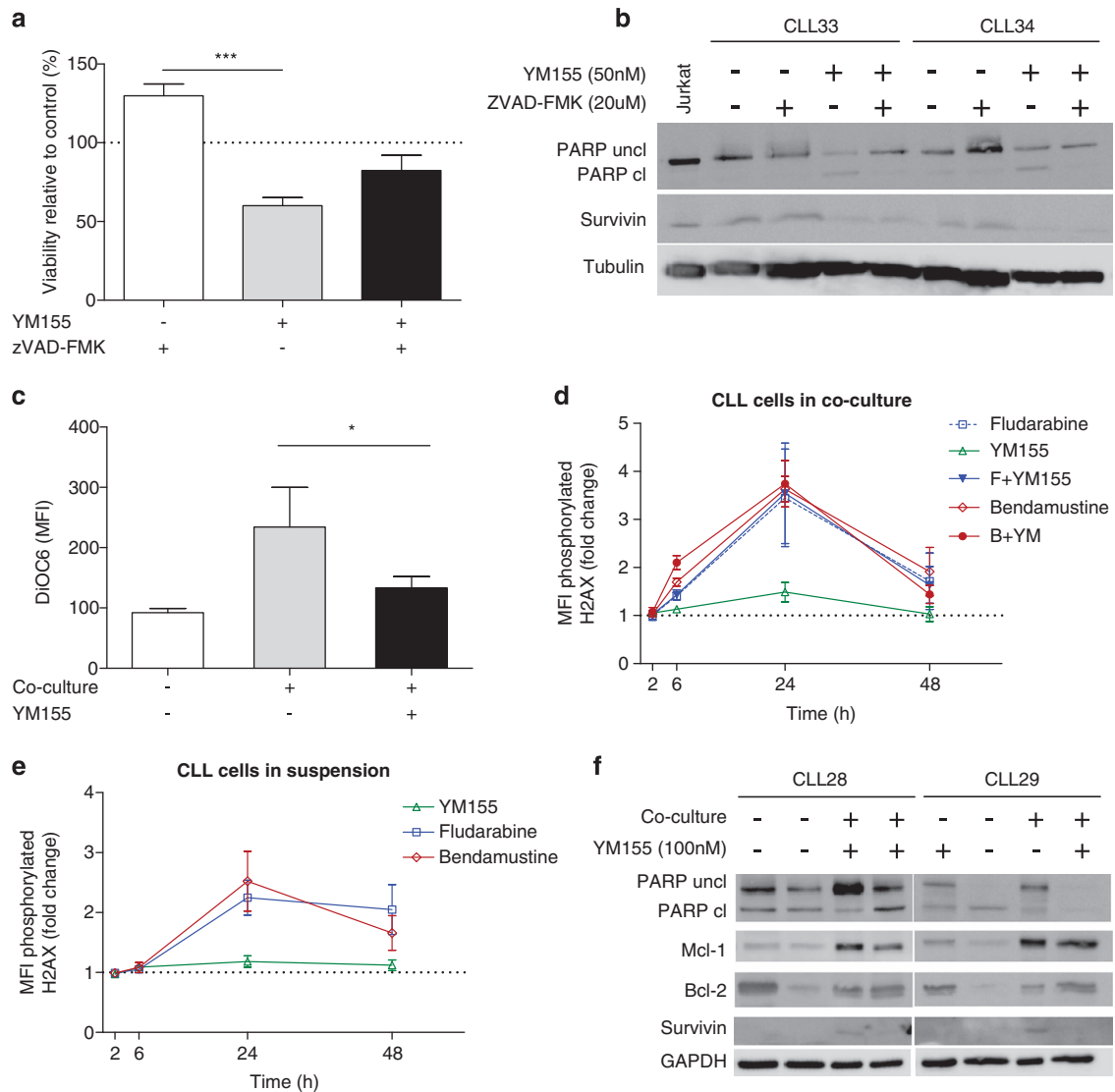


Figure 4. Treatment of primary CLL cells with YM155 induces caspase-dependent apoptosis. **(a)** CLL cells from seven patients were co-cultured for 48 h and subsequently treated for 24 h with 50 nM YM155, 20 μ M Z-VAD-fmk or the combination of both. Results are shown as the mean percentage of viable cells relative to control \pm s.e.m., *** $P < 0.001$, one-way ANOVA. **(b)** Cleavage of PARP and expression of survivin were analyzed by western blotting in CLL cells co-cultured for 48 h and treated for additional 24 h with 50 nM YM155, 20 μ M Z-VAD-fmk or the combination of both (two representative patients are shown). Jurkat cell line is used as a positive control for survivin expression. **(c)** CLL cells were treated with or without 50 nM YM155 for 24 h after 48 h in co-culture or in suspension and $\Delta\Psi_m$ was analyzed by DiOC6[3] detection by FC. MFI: mean fluorescence intensity. Data are expressed as mean \pm s.e.m. of six patients (* $P < 0.05$, paired T -test). **(d)** Analysis of γ H2AX by FC after treatment with 50 nM YM155, 5 μ g/ml fludarabine, 150 μ M bendamustine, the combination of 50 nM YM155 with 5 μ g/ml fludarabine or 150 μ M bendamustine for 24 h after 48 h in co-culture. Results are shown as the mean fold change \pm s.e.m. of six patients. **(e)** Analysis of γ H2AX by FC after treatment with 50 nM YM155, 5 μ g/ml fludarabine, 150 μ M bendamustine for 24 h after 48 h in suspension. Results are shown as the mean fold change \pm s.e.m. of six patients. **(f)** Cleavage of PARP, Mcl-1, Bcl-2 and survivin expression was analyzed by western blotting in CLL cells in suspension and in co-culture for 48 h and treated for additional 24 h with 100 nM YM155 (two representative patients are shown).

(mean percentage of viable cells relative to control $88.19 \pm 8.94\%$) while treatment with 50 nM YM155 significantly decreased viability of co-cultured CLL cells (mean percentage of viable cells relative to control $52.52 \pm 8.51\%$). When we combined 400 μ M fludarabine with 50 nM YM155 the mean viability of treated cells relative to control was reduced to $46.54 \pm 6.55\%$. CI values computed from cytotoxicity profiles displayed additive cell death induction for fludarabine and YM155-treated CLL cells (CI = 1.12). Mean viability of co-cultured CLL cells treated with 150 μ M bendamustine or with 50 nM YM155 was $60.82 \pm 7.02\%$ and $63.49 \pm 6.9\%$, respectively (Figure 5f). When we combined these drugs the mean viability related to control was reduced significantly to $26.92 \pm 3.74\%$, a difference with fludarabine and YM155 combination treatment that may have

clinical significance. The combination of 50 nM YM155 and 150 μ M bendamustine had also an additive effect (CI = 1.01) although in this case, it was mainly because both drugs contributed almost equally to the higher cytotoxicity of this combined treatment.

Sensitivity to treatment with YM155 of primary CLL cells is independent from biological prognostic factors

The induction of apoptosis by YM155 was analyzed in CLL cells from 20 patients according to their biological prognostic factors. For this, primary CLL cells co-cultured for 48 h were subsequently treated with 50 nM YM155 for additional 24 h and induction of apoptosis was assessed by annexin V/PI staining.

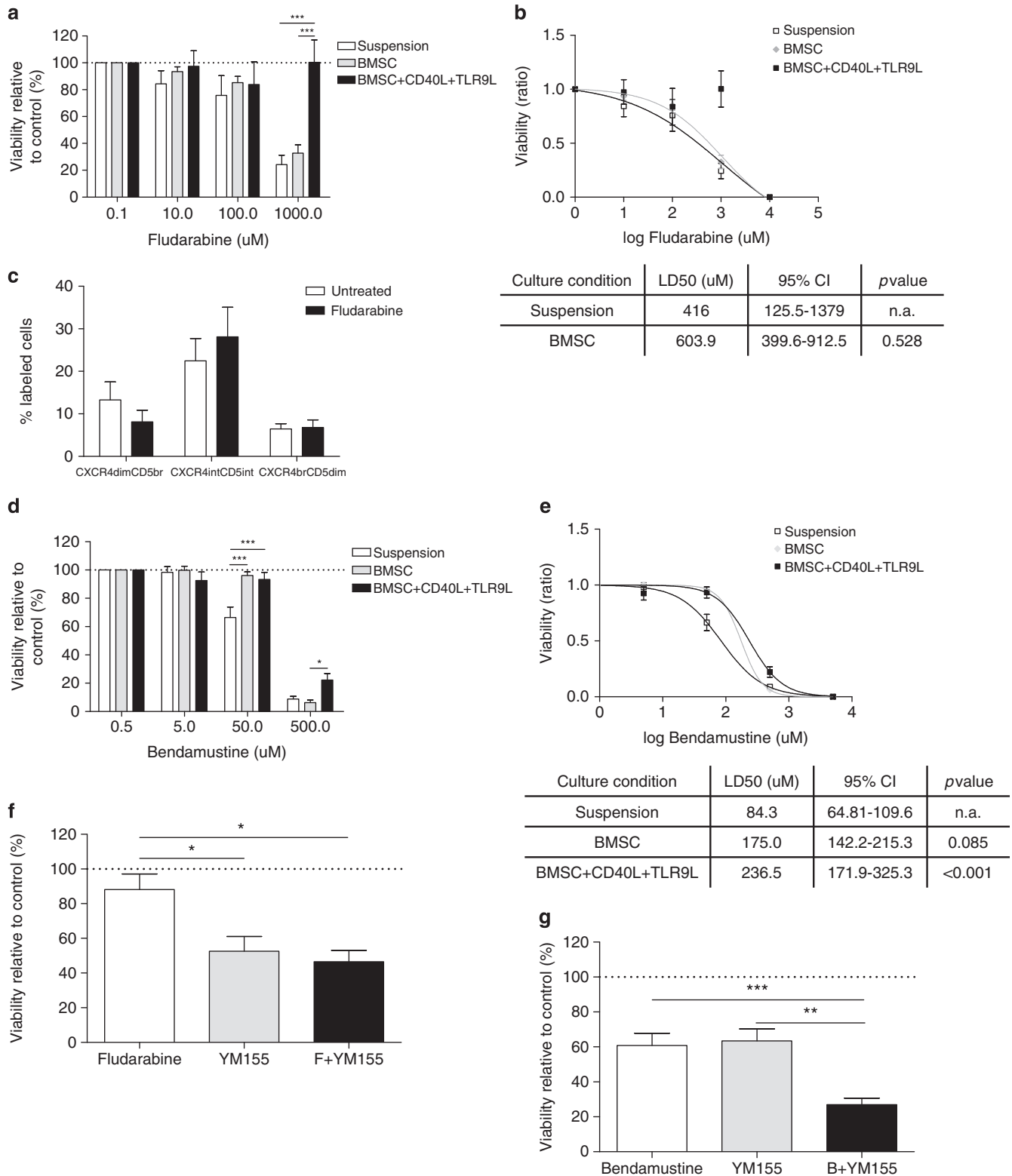


Figure 5. Cytotoxic effects of the combination of YM155 with fludarabine or bendamustine in co-cultured CLL cells. CLL cells from seven patients were treated for 24 h with increasing doses of fludarabine (**a**) or bendamustine (**d**) after 48 h from culture in suspension, with BMSC or in complete co-culture. Data shown represent mean percentage of viable cells relative to control \pm s.e.m. ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, two-way ANOVA). Increasing doses of fludarabine (**b**) or bendamustine (**e**) were plotted on a logarithmic scale to calculate the lethal dose 50 (LD₅₀). (**c**) Analysis of CXCR4 and CD5 expression by FC in CLL cells from seven patients cultured in suspension or in co-culture for 48 h and subsequently treated with 5 μ M fludarabine. (**f**) Viability relative to control of CLL cells from 12 patients co-cultured for 48 h and subsequently treated with 400 μ M fludarabine, 50 nM YM155 or the combination of both drugs. Results are shown as mean \pm s.e.m. ($*P < 0.05$, one-way ANOVA). (**g**) Viability relative to control of CLL cells from 12 patients co-cultured for 48 h and subsequently treated with 150 μ M bendamustine, 50 nM YM155 or the combination of both drugs. Results are shown as mean \pm s.e.m. ($**P < 0.01$, $***P < 0.001$, one-way ANOVA).

Notably, CLL cases with high expression of ZAP-70, high expression of CD38 or adverse karyotype (del17p13.1 and/or del11q22.3) displayed similar responses to YM155 to those cases without these high-risk biological factors (Table 2). These results interestingly suggest that YM155 is effective in CLL cells despite the presence of adverse prognosis biological factors.

DISCUSSION

Growing evidence reinforces the critical role that the microenvironment found in the bone marrow and lymph nodes plays in the maintenance and expansion of CLL cells (reviewed in Caligaris-Cappio⁵⁰). CLL cells in these organs are supported by accessory cells that provide them with survival and proliferative signals. Importantly, these interactions also confer drug resistance,^{8,13,22} making CLL cells found in the proliferative niches difficult to completely eradicate, this probably accounting for the eventual relapse observed in all patients with CLL. Therefore, there is an increased emphasis placed on therapeutically targeting CLL cells from these proliferative niches.

We hypothesized that *ex vivo* modeling the microenvironment of the proliferative centers will facilitate the identification of drugs able to specifically target actively proliferating CLL cells. The co-culture of primary CLL cells and BMSC along with soluble CD40L and CpG ODN induced a marked proliferative response of primary CLL cells. In addition, the T lymphocytes present in the samples were also stimulated and activated, probably contributing to the global stimulation of primary CLL cells in this setting. Morphologically, the proliferative response of CLL cells in co-culture translated into an increased number of stimulated and dividing cells that clustered together, resembling the structures observed in the proliferative centers or 'pseudofollicles'. Supporting the role of the microenvironment in disease persistence,^{8,13,22} CLL cells in the complete co-culture developed a marked chemoresistance to treatment with fludarabine and bendamustine, even more than when culturing CLL cells only on stroma.

Survivin protein is an inhibitor of apoptosis protein family member having an essential role in regulation of cell division,⁵¹ that has also been described to promote tumor-associated angiogenesis⁵² and to have a major role in resistance to chemotherapy in non-small cell lung cancer cells.⁵³ In CLL cells from peripheral blood, survivin expression has been described to be higher in patients with progressive disease and related to a worse response to treatment,²⁹ while in other studies survivin expression was not detectable in the majority of the patients.^{9,54} In our hands,

the low number of patients analyzed did not have progressive disease and we only detected survivin expression upon co-culture stimuli. Therefore, taking all these data into account we speculated that targeting survivin protein with YM155 might be a reasonable strategy to specifically induce cytotoxicity in actively proliferating and chemoresistant CLL cells found in the pseudofollicles.

YM155 inhibits survivin gene promoter activity and suppresses survivin expression, suggesting that its main mechanism of action is the inhibition of the transcription of the gene.³² However, the exact cytotoxic mechanism by which YM155 induces apoptosis remains unclear. Some authors have shown that YM155 can also downregulate Mcl-1 and Bcl-2 expression independently of survivin downregulation.^{31,34,49} YM155 has also demonstrated the ability to potentiate the antitumoral activity of various cytotoxic agents including topoisomerase inhibitors,⁵⁵ alkylating agents,⁵⁶ monoclonal antibodies,^{36,37} radiotherapy⁵⁷ and recently, the combination of YM155 with STAT3 inhibitors in B-cell lymphoma cell lines showed encouraging results.³⁵ Two phase II clinical trials have studied YM155 as a potential therapeutic agent in refractory diffuse large B-cell lymphoma. Cheson *et al.*³⁸ reported no serious adverse events but limited single-agent activity of YM155. Based on pre-clinical combination data³⁷ and single agent clinical data, a phase II study using the combination of YM155 with rituximab is currently ongoing. Preliminary results showed that the combination was well tolerated with limited hematologic toxicities and the overall response rate was 56.3%.³⁹

Interestingly, we found that YM155 preferentially induced apoptosis in survivin-positive CLL cells cultured in proliferative conditions, being the LD₅₀ for CLL cells in co-culture almost eight times lower than the one for CLL cells in suspension. Moreover, we observed a strong reduction in Ki-67-positive cells along with a specific reduction in the CXCR4^{dim}/CD5^{high} compartment and a preferential decrease in CLL cells in G2/M phase. This increase in the proportion of CLL cells in G1 phase might be a consequence of the selective YM155-induced apoptosis of CLL cells in G2/M phase, (survivin expression is cell-cycle dependent, with the highest expression during G2/M)⁵⁸ although it may also be due to a direct YM155-induced G1 arrest. Altogether, these results support our hypothesis that targeting survivin protein would mainly affect the actively proliferating CLL cells. However, unstimulated non-proliferating CLL cells, which did not express survivin, also appeared to be sensitive to YM155 treatment. We observed that YM155 induced Bcl-2 and Mcl-1 downregulation in CLL cells in suspension, thus confirming that YM155 has additional targets in CLL cells. Remarkably, YM155 exhibited significant *ex vivo* antitumoral activity in CLL cases irrespective of prognosis markers such as ZAP-70 and CD38 expression and in cases with del17p13.1, which is in line with previous reports showing that YM155 can promote apoptosis in both p53 wild-type and deficient cell lines and xenograft models.^{30,32}

The proliferative compartment in CLL represents only a small percentage of the malignant cells; however, increasing evidence suggests that such actively proliferating cells are responsible for disease persistence after treatment.^{4,5} Therefore, targeting this small but crucial compartment with YM155 in combination with standard therapies, such as fludarabine or bendamustine, could be an efficient approach to try to eradicate both proliferative and non-proliferative compartments of CLL cells.

In conclusion, our results demonstrate that the co-culture system herein employed promotes proliferation, induces survivin expression and protects primary CLL cells from apoptosis induced by cytotoxic agents. In this setting, inhibiting the transcription of survivin protein by treatment with YM155 is able to efficiently overcome microenvironment-mediated cell protection and proliferation and has specific effect on actively proliferating CLL cells. Therefore, YM155 might be a potent therapeutic drug complementing our growing armamentarium against chemotherapy-resistant CLL cells.

Table 2. Assessment of *in vitro* YM155 cytotoxicity according to biological risk factors

Risk factor	Number of patients (n)	% Viability related to control (mean \pm s.e.m.)	P
<i>ZAP-70 expression</i>			
Low	10	75.00 \pm 8.22	0.734
High	10	69.92 \pm 5.25	
<i>CD38 expression</i>			
Low	15	73.93 \pm 5.34	0.727
High	5	72.20 \pm 12.7	
<i>17p deletion</i>			
Negative	17	74.93 \pm 5.98	0.694
Positive	3	69.2 \pm 8.95	
<i>Non-adverse karyotype</i>			
Adverse karyotype	16	76.98 \pm 5.55	0.277
Adverse karyotype	4	60.44 \pm 9.43	

Non-adverse karyotype: del13q14.3 and/or trisomy 12 and/or normal karyotype. Adverse karyotype: del17p13.1 and/or del11q22.3.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research funding from the Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI 11/00792) (FB). NP is a recipient of a PhD fellowship granted by Institut de Recerca Vall d'Hebron. CC is supported by a grant from Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH). MC holds a contract from Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (RYC-2012-12018).

REFERENCES

- 1 Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 399–408.
- 2 Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia—an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 1967; **29**(Suppl): 566–584.
- 3 Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Koltitz JE, Kudalkar P, Cesar D *et al*. *In vivo* measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; **115**: 755–764.
- 4 Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B *et al*. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; **117**: 563–574.
- 5 Giné E, Martínez A, Villamor N, López-Guillermo A, Camos M, Martínez D *et al*. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia (“accelerated” chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* 2010; **95**: 1526–1533.
- 6 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.
- 7 Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, Zapata JM, Karras JG, Tsukada N *et al*. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood* 2002; **100**: 1795–1801.
- 8 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.
- 9 Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M *et al*. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **97**: 2777–2783.
- 10 Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F *et al*. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4⁺, CD40L⁺ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 1403–1413.
- 11 Bagnara D, Kaufman MS, Calissano C, Marsilio S, Patten PEM, Simone R *et al*. A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood* 2011; **117**: 5463–5472.
- 12 Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP *et al*. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 2009; **114**: 4441–4450.
- 13 Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 2519–2526.
- 14 Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stiglenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G *et al*. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 980–988.
- 15 Pascutti MF, Jak M, Tromp JM, Derks IAM, Remmerswaal EBM, Thijssen R *et al*. IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells. *Blood* 2013; **122**: 3010–3019.
- 16 Tretter T, Schuler M, Schneller F, Brass U, Esswein M, Aman MJ *et al*. Direct cellular interaction with activated CD4(+) T cells overcomes hyporesponsiveness of B-cell chronic lymphocytic leukemia *in vitro*. *Cell Immunol* 1998; **189**: 41–50.
- 17 Willimott S, Baou M, Naresh K, Wagner SD. CD154 induces a switch in pro-survival Bcl-2 family members in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; **138**: 721–732.
- 18 Scielzo C, Apollonio B, Scarfò L, Janus A, Muzio M, Ten Hacken E *et al*. The functional *in vitro* response to CD40 ligation reflects a different clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2011; **25**: 1760–1767.
- 19 Tromp JM, Tonino SH, Elias JA, Jaspers A, Luijckx DM, Kater AP *et al*. Dichotomy in NF- κ B signaling and chemoresistance in immunoglobulin variable heavy-chain-mutated versus unmutated CLL cells upon CD40/TLR9 triggering. *Oncogene* 2010; **29**: 5071–5082.

- 20 Jahrsdörfer B, Hartmann G, Racila E, Jackson W, Mühlhoff L, Meinhardt G *et al*. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* 2001; **69**: 81–88.
- 21 Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H *et al*. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2000; **95**: 999–1006.
- 22 Fonte E, Apollonio B, Scarfò L, Ranghetti P, Fazi C, Ghia P *et al*. *In vitro* sensitivity of CLL cells to fludarabine may be modulated by the stimulation of Toll-like receptors. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 367–379.
- 23 Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol* 2006; **18**: 609–615.
- 24 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; **3**: 917–921.
- 25 Marusawa H, Matsuzawa S-I, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I *et al*. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003; **22**: 2729–2740.
- 26 Altieri DC. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. *J Cell Biochem* 2004; **92**: 656–663.
- 27 Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K *et al*. Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004; **28**: 487–494.
- 28 Sachanas S, Levidou G, Angelopoulou MK, Moschogiannis M, Yiakoumis X, Kalpadakis C *et al*. Apoptotic and proliferative characteristics of proliferation centers in lymph node sections of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013.
- 29 Grzybowska-Izydorczyk O, Cebula B, Robak T, Smolewski P. Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer* 2010; **46**: 800–810.
- 30 Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M *et al*. Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Sci* 2011; **102**: 614–621.
- 31 Tang H, Shao H, Yu C, Hou J. Mcl-1 downregulation by YM155 contributes to its synergistic anti-tumor activities with ABT-263. *Biochem Pharmacol* 2011; **82**: 1066–1072.
- 32 Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, Minematsu T, Shirasuna K, Matsuhisa A *et al*. YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res* 2007; **67**: 8014–8021.
- 33 Tyner JW, Jemal AM, Thayer M, Druker BJ, Chang BH. Targeting survivin and p53 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2012; **26**: 623–632.
- 34 Feng W, Yoshida A, Ueda T. YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **435**: 52–57.
- 35 Kaneko N, Kita A, Yamanaka K, Mori M. Combination of YM155, a survivin suppressant with a STAT3 inhibitor: a new strategy to treat diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res* 2013; **37**: 1156–1161.
- 36 Chen J, Pise-Masison CA, Shih JH, Morris JC, Janik JE, Conlon KC *et al*. Markedly additive antitumor activity with the combination of a selective survivin suppressant YM155 and alemtuzumab in adult T-cell leukemia. *Blood* 2013; **121**: 2029–2037.
- 37 Kita A, Mitsuoka K, Kaneko N, Nakata M, Yamanaka K, Jitsuoka M *et al*. Sepantronium bromide (YM155) enhances response of human B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; **343**: 178–183.
- 38 Cheson BD, Bartlett NL, Vose JM, Lopez-Hernandez A, Seiz AL, Keating AT *et al*. A phase II study of the survivin suppressant YM155 in patients with refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 2012; **118**: 3128–3134.
- 39 Papadopoulos KP, Smith SE, Steinberg J, Papa R, Lopez-Jimenez J, Keating A *et al*. A phase II study of sepantronium bromide (YM155) plus rituximab in previously treated subjects with aggressive CD20-positive B cell non-Hodgkin’s lymphoma who are ineligible for or have previously received an autologous stem cell transplant. Stage I results. *Blood* 2012; **120**: abstract 2731.
- 40 Tolcher AW, Quinn DI, Ferrari A, Ahmann F, Giaccone G, Drake T *et al*. A phase II study of YM155, a novel small-molecule suppressor of survivin, in castration-resistant taxane-pretreated prostate cancer. *Ann Oncol* 2012; **23**: 968–973.
- 41 Kelly RJ, Thomas A, Rajan A, Chun G, Lopez-Chavez A, Szabo E *et al*. A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2013; **24**: 2601–2606.
- 42 Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan X-J, Yancopoulos S, Hayes G *et al*. Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med* 2011; **17**: 1374–1382.
- 43 Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 2010; **70**: 440–446.

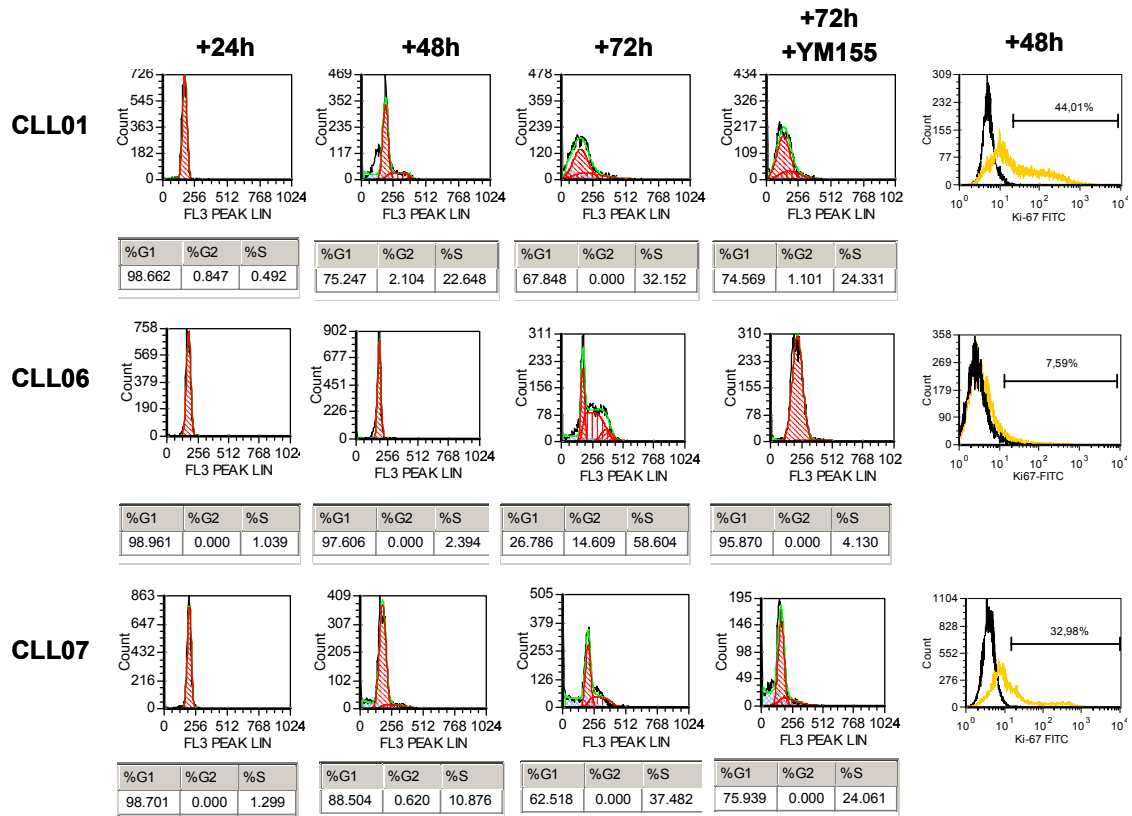
- 44 MacPhail SH, Banáth JP, Yu TY, Chu EHM, Lambur H, Olive PL. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol* 2003; **79**: 351–358.
- 45 Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P *et al*. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 2007; **21**: 110–120.
- 46 Glaros TG, Stockwin LH, Mullendore ME, Smith B, Morrison BL, Newton DL. The “survivin suppressants” NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; **70**: 207–212.
- 47 Foster ER, Downs JA. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J* 2005; **272**: 3231–3240.
- 48 Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 2008; **18**: 134–147.
- 49 Huang YT, Cheng CC, Lin TC, Chiu TH, Lai PC. Therapeutic potential of sepantronium bromide YM155 in gemcitabine-resistant human urothelial carcinoma cells. *Oncol Rep* 2014; **31**: 771–780.
- 50 Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; **123**: 380–388.
- 51 Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 2003; **116**: 2987–2998.
- 52 Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 4349–4354.
- 53 Morgillo F, Woo JK, Kim ES, Hong WK, Lee H-Y. Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* 2006; **66**: 10100–10111.
- 54 Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, Davies FE, Richards SJ, Haynes AP *et al*. Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood* 2001; **98**: 29–35.
- 55 Sato A, Ito K, Asano T, Sumitomo M, Asano T, Hayakawa M. Synergistic effect of survivin-specific small interfering RNA and topotecan in renal cancer cells: topotecan enhances liposome-mediated transfection by increasing cellular uptake. *Int J Oncol* 2007; **30**: 695–700.
- 56 Li B, Fan J, Liu X, Qi R, Bo L, Gu J *et al*. Suppression of colorectal tumor growth by regulated survivin targeting. *J Mol Med (Berl)* 2006; **84**: 1077–1086.
- 57 Iwasa T, Okamoto I, Suzuki M, Nakahara T, Yamanaka K, Hatashita E *et al*. Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 6496–6504.
- 58 Li F, Altieri DC. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* 1999; **344**(Pt 2): 305–311.

Supplementary Information accompanies this paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

Supplementary Figures

Supplementary Figure 1: Cell cycle analysis and Ki-67 expression in CLL cells after co-culture

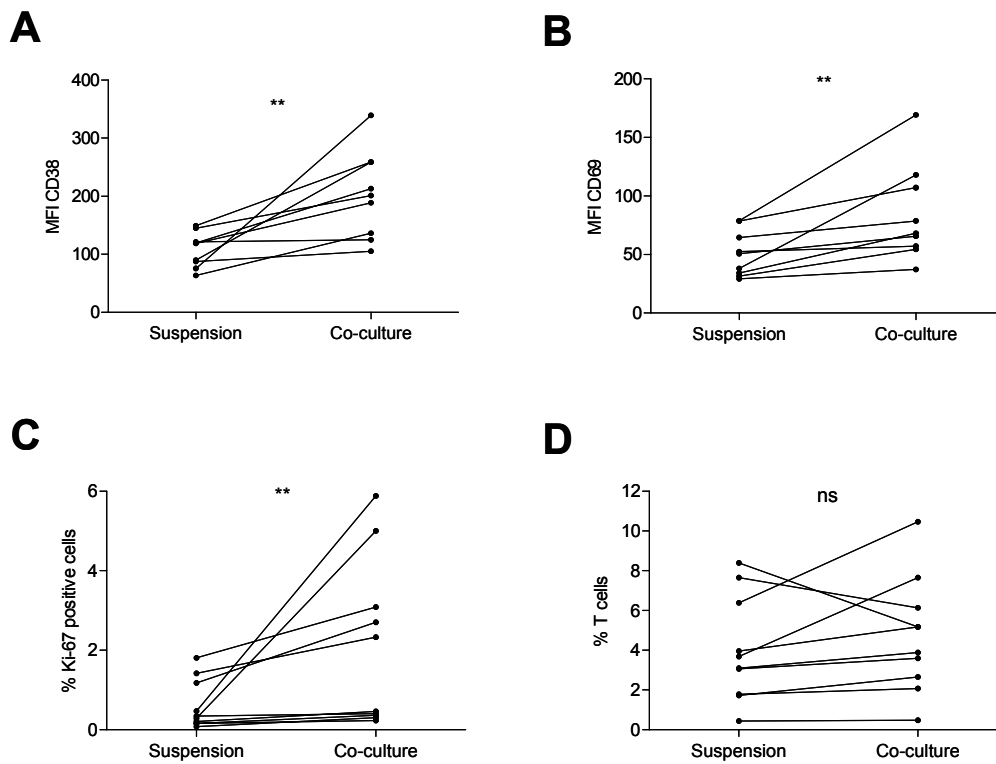
Primary CLL cells from 3 patients were cultured for 24, 48 and 72 hours in co-culture. After 48 hours of co-culture 50nM YM155 was added for additional 24 hours. Cell cycle analysis and Ki-67 expression of these patients are shown.



RESULTATS

Supplementary Figure 2: Activation and proliferation rates in T cells after co-culture.

PBMC from 9 patients were cultured for 48 hours in suspension or in co-culture and the differential expression of CD38, CD69 and Ki-67 in CD5 and CD3 positive cells were analyzed. A, MFI of CD38 expression (**P<0.01, paired-T test). B, MFI of CD69 expression (**P<0.01, paired-T test). C, Percentage of Ki-67 expression (**P<0.01, paired-T test). D, Percentage of T cells (CD5 and CD3 positive cells).



IV. DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

L'LLC es caracteritza per l'acumulació i proliferació de limfòcits B madurs monoclonals que coexpressen CD5 i CD23 a la SP, MO i òrgans limfoides secundaris. Tot i que clàssicament havia estat considerada una malaltia poc proliferativa, estudis recents demostren la rellevància de la proliferació en la patogènesi i en la història natural d'aquesta malaltia. Les cèl·lules d'LLC que resideixen en els teixits limfoides reben senyals de supervivència i proliferació en unes estructures anomenades "pseudofol·licles" o "centres de proliferació". En aquestes microestructures, les cèl·lules d'LLC es troben un microambient favorable format per cèl·lules accessòries com cèl·lules estromals i limfòcits T que les estimulen promovent la seva proliferació i protegint-les de l'apoptosi espontània o induïda per drogues. Així doncs, és lògic pensar que els centres de proliferació de cèl·lules d'LLC siguin una peça clau en la persistència de la malaltia residual i per tant, responsables principals de l'eventual recaiguda de la malaltia observada en la majoria dels pacients.

Tenint en compte aquestes observacions, el propòsit dels nostres treballs va ser primer, dissenyar un sistema de cultiu *in vitro* de cèl·lules primàries d'LLC que intentés imitar el microambient d'aquests centres proliferatius i en segon terme, testar els efectes de l'YM155 en aquest compartiment de cèl·lules d'LLC proliferant i quimioresistent.

En el primer treball descrit, per tal de reproduir el microambient dels centres proliferatius *in vitro*, inicialment vam caracteritzar fenotípicament el compartiment proliferant de cèl·lules d'LLC *in vivo*, o el que és el mateix aquelles cèl·lules d'LLC proliferants localitzades a la SP, per a posteriorment, comparar-les amb les cèl·lules d'LLC cultivades en condicions que imiten el microambient dels centres de proliferació. Finalment, vam analitzar els efectes funcionals d'aquest nou sistema de cocultiu en la inducció de quimioresistència a les cèl·lules d'LLC.

A l'hora de dissenyar el nou sistema de cultiu de cèl·lules d'LLC vam decidir cocultivar-les amb BMSC donat que ha estat àmpliament demostrat el seu paper en la protecció de les cèl·lules d'LLC envers l'apoptosi espontània i l'induïda per fàrmacs^{119,122,314,315}. A més a més, també s'ha descrit el seu paper en l'activació de les cèl·lules d'LLC en repòs, induint l'expressió de marcadors d'activació com CD38, CD69, CD70, CD71 i CD25^{308,307}. L'addició del lligand soluble del CD40 es va basar en les múltiples evidències que demostren la importància dels limfòcits T en la inducció de proliferació i supervivència en les cèl·lules d'LLC, i com aquesta estimulació es transmetria a través del receptor CD40^{145,317,318,319}. Per últim, vam afegir CpG ODN per tal d'estimular les cèl·lules d'LLC a través del TLR9 donada la seva potent capacitat

DISCUSSIÓ

d'induir proliferació, producció de citoquines i sobreexpressió de molècules involucrades en les relacions limfòcit B- limfòcit T com el CD40, CD80, CD86, CD54 i CD58^{320,321}. L'estimulació simultània del CD40 i el TLR9 ja havia estat estudiada amb anterioritat observant una característica preferent inducció de proliferació i d'immunogenicitat en el subtipus U-CLL, fet que no va ser reproduït en el nostre sistema de cocultiu (Article 1, Taula 1) probablement com a conseqüència del reduït nombre de pacients analitzats.

El sistema de cocultiu de cèl·lules primàries d'LLC amb BMSC i estimulació del CD40 i del TLR9 va resultar el que induïa més proliferació, supervivència i augment del metabolisme respecte la resta de sistemes testats, on analitzàvem cadascun dels estímuls per separat. Fenotípicament, les cèl·lules d'LLC cultivades en aquest sistema de cocultiu eren comparables al compartiment proliferant de cèl·lules d'LLC *in vivo*. Principalment, aquests canvis fenotípics indicaven: primer, que aquestes cèl·lules eren activades i conseqüentment adquirien major agressivitat d'acord amb un increment d'expressió de les proteïnes ZAP-70 i CD38; segon, adquirien major capacitat d'interaccionar amb altres cèl·lules del microambient degut a un augment d'expressió de les integrines CD49d i CD62L; i tercer, una probable recirculació recent des del MO o GL per la infraexpressió dels receptors de quimioquines CXCR4, CXCR5 i CCR7 com a conseqüència de la interiorització dels receptors en resposta a la unió als seus lligands CXCL12, CXCL13 i CCL19/21. En aquest últim cas, les cèl·lules d'LLC cultivades en el nostre model *in vitro*, van mostrar només un descens en l'expressió del receptor CXCR4 donat que les MSC usades provenien de MO, en conseqüència secretores de CXCL12 però no de CXCL13 i CCL19/21¹²⁰, quimioquines expressades per les MSC dels teixits limfoides secundaris^{322,323,324}. De forma interessant, el co-cultiu amb BMSC, CD40L i CpG ODN també va estimular els limfòcits T presents en les mostres, d'acord amb l'expressió de Ki-67, CD38, CD69, fet que també contribuiria probablement a l'estimulació global de les cèl·lules d'LLC.

En referència als canvis relacionats amb l'expressió de ZAP-70 cal destacar el marcat enriquiment en cèl·lules positives per l'expressió de ZAP-70 en el compartiment proliferant de cèl·lules d'LLC *in vivo* i com el sistema de cocultiu *in vitro* descrit va reproduir fidelment aquesta important característica. El destacat valor pronòstic de l'expressió de ZAP-70 és un reflex del paper biològic que té aquesta proteïna en la cèl·lula d'LLC. ZAP-70 intervé en la senyalització derivada del BCR potenciant la seva senyalització, el que es tradueix en un increment de l'activació³²⁵ i de la capacitat de resposta enfront senyals de migració i supervivència de la cèl·lula d'LLC¹³⁰. Tot i aquestes evidències que relacionen l'expressió de ZAP-70 a característiques d'agressivitat de la cèl·lula d'LLC, els mecanismes que regulen la seva expressió són poc coneguts. Els nostres resultats indiquen que tant l'estimulació del CD40 com del TLR9 independentment van provocar un augment d'expressió de ZAP-70, tot i que

l'estimulació del CD40 per sí sola no va ser suficient per a induir un significatiu increment en la proliferació, suggerint una necessària intervenció d'altres factors.

Funcionalment, vam poder observar com el nostre sistema de cocultiu va promoure la proliferació de cèl·lules d'LLC quimioresistents davant l'evident manca de resposta, en termes d'inducció d'apoptosi, amb el tractament amb fludarabina o bendamustina. Aquests resultats són consistents amb altres sistemes de cultiu *in vitro* de cèl·lules primàries d'LLC descrits que han utilitzat tant cocultius amb cèl·lules estromals^{119,314,326} com l'estimulació del CD40¹⁴⁵ o del TLR9³²¹. Pel que fa als mecanismes responsables d'aquesta quimioresistència adquirida pel cocultiu, vam poder observar com l'expressió de la proteïna antiapoptòtica Mcl-1 augmentà, en canvi la de Bcl-2 no es modificà, probablement perquè els nivells de Bcl-2 a la cèl·lula d'LLC ja són constitutivament elevats²⁸³. De totes maneres, la totalitat dels possibles mecanismes biològics relacionats amb aquesta resistència al tractament quimioteràpic induïda pel cocultiu no queda esclarida en aquest treball, i seria una interessant i potencial línia per a continuar estudiant.

Per tant, els resultats d'aquest article demostren que el cocultiu de cèl·lules d'LLC amb BMSC, CD40L i CpG ODN promou la proliferació de cèl·lules d'LLC quimioresistents amb un fenotip comparable al de les cèl·lules proliferants d'LLC circulants *in vivo*.

Aquest estudi aporta un model de sistema de cocultiu que pot servir de base per a l'estudi dels mecanismes biològics de les cèl·lules d'LLC proliferants i quimioresistents, així com per al descobriment de noves molècules que potencialment podrien arribar a ser noves dianes terapèutiques i per al desenvolupament de nous fàrmacs dirigits a aquestes molècules.

En aquest sentit, en el segon article vam analitzar els efectes del tractament amb l'YM155 en cèl·lules primàries d'LLC cultivades en aquest sistema de cocultiu que recrea les condicions del microambient dels centres proliferatius.

La survivina és un membre de la família de proteïnes inhibidores de l'apoptosi que es troba diferencialment expressada en molts tipus de cèl·lules tumorals però no en els respectius tipus cel·lulars normals^{327,191}. En el cas de l'LLC, diversos estudis previs han demostrat l'expressió de survivina principalment en les cèl·lules proliferants d'LLC que resideixen en els centres proliferatius^{146,207,208}. Pel que fa a l'expressió en cèl·lules d'LLC circulants els resultats publicats són discordants^{205,206}. Mentre Grzybowska-Izydorczyk *et al* van observar una lleu però evident expressió de survivina en cèl·lules d'LLC de SP, més elevada en aquells pacients amb malaltia progressiva, Munzert *et al*, no en van evidenciar. Aquestes discrepàncies podrien ser degudes a l'ús de tècniques diferents (en el primer cas van utilitzar FC, mentre els segons western blot i RT qPCR) o diferències en els pacients analitzats. En el

DISCUSSIÓ

nostre estudi no vam evidenciar expressió de survivina en les cèl·lules de SP, ni a nivell proteic (per western blot) ni a nivell d'mRNA.

A més a més de la funció com a inhibidora de l'apoptosi, la survivina té un paper essencial en la regulació de la divisió cel·lular³²⁸, en l'angiogènesi associada al creixement tumoral³²⁹ i en la resistència al tractament quimioteràpic³³⁰.

Amb aquestes consideracions, vam especular que la inhibició de la survivina podria ser una raonable aproximació terapèutica per tal d'induir citotoxicitat de forma específica en aquell compartiment de cèl·lules proliferants i quimioresistents d'LLC que resideixen en els centres proliferatius.

Per a aquest propòsit, vam analitzar primer l'expressió de la survivina a nivell proteic i d'mRNA en les cèl·lules d'LLC cultivades en el nostre sistema de cocultiu, és a dir amb BMSC, CD40L i CpG ODN. Els nostres resultats van demostrar que aquest sistema de co-cultiu induïa l'expressió de survivina en les cèl·lules d'LLC, mentre en les cèl·lules d'LLC no estimulades els nivells d'expressió de survivina eren pràcticament indetectables. Per tant, confirmàvem que aquesta proteïna havia de ser una adequada diana per al tractament específic de les cèl·lules d'LLC proliferants.

El fàrmac que vam utilitzar per a bloquejar l'acció de la survivina va ser l'YM155. L'YM155 inhibeix la transcripció del gen *BIRC5*, el gen que codifica per la survivina³³¹. La seva capacitat antitumoral ha estat demostrada en una àmplia varietat de tumors sòlids i limfomes tant *in vitro* com en models animals³³² i en assaigs clínics^{221,333}. De totes maneres, els mecanismes exactes pels quals indueix citotoxicitat no estan totalment dilucidats. Alguns autors han mostrat com l'YM155 també pot inhibir l'expressió de Mcl-1 i Bcl-2 de forma independent a la inhibició de la survivina en algunes línies cel·lulars tumorals^{212,213}, i així ho vam observar també amb les nostres cèl·lules primàries d'LLC. A més a més, estudis recents *in vitro* amb línies cel·lulars de càncer de pròstata suggereixen que l'YM155 indueix mort cel·lular majoritàriament per inducció de dany en el DNA mentre la inducció d'apoptosi com a conseqüència de la supressió de survivina seria un efecte secundari²¹⁶. En el nostre treball vam veure que tant en les cèl·lules en suspensió com en les cèl·lules en cocultiu, el tractament amb YM155 a les dosis utilitzades en aquest treball no induïa dany en el DNA. A més a més, en l'estudi reportat comenten que la inducció de dany en el DNA es produiria amb dosis menors que la supressió d'expressió de survivina, una observació que tampoc vam poder corroborar perquè la dosi utilitzada per a aquests experiments va ser 50nM i amb aquesta dosi l'YM155 no només disminuïa els nivells proteics de survivina sinó que també induïa apoptosi i inhibia significativament la proliferació de les cèl·lules d'LLC. Una diferència important entre tots dos estudis que podria contribuir a la discordància de resultats és el tipus cel·lular utilitzat, mentre

l'anterior estudi utilitzà línies cel·lulars de tumors sòlids com pròstata, nosaltres vam testar cèl·lules primàries d'LLC.

Aquestes observacions tenen importants conseqüències a l'hora de dissenyar futurs assaigs clínics perquè aquells pacients amb defectes relacionats amb la reparació del DNA, per exemple amb del17p o mutacions de *TP53*, es mostren resistents al tractament amb drogues que indueixen dany en el DNA. En aquest sentit, el tractament amb YM155 va induir apoptosi en les cèl·lules primàries d'LLC independentment de la presència de del17p, tot i que només es va poder analitzar en 3 pacients amb aquesta característica.

Com hem comentat, l'YM155 induí apoptosi en les cèl·lules primàries d'LLC, el fet més significatiu va ser que aquesta inducció d'apoptosi es produí de forma preferent en aquelles cèl·lules d'LLC cultivades en el nostre sistema de cocultiu, per tant en aquelles cèl·lules d'LLC proliferants, sent responsable a més a més d'inhibir la seva proliferació. Cal destacar que, aquelles cèl·lules d'LLC cocultivades només amb BMSC no van resultar tant sensibles al tractament amb YM155 com aquelles estimulades a més a més amb CD40L i CpG ODN. Un fet que dona més força a l'especificitat de l'YM155 per a les cèl·lules d'LLC proliferants perquè, d'acord amb el nostre primer estudi, les BMSC per sí soles no indueixen tanta proliferació en les cèl·lules d'LLC com amb l'addició de CD40L i CpG ODN.

El compartiment proliferant de l'LLC representa només una petita fracció del percentatge de cèl·lules tumorals; no obstant, nombroses evidències suggereixen que aquest compartiment seria el responsable de la persistència de la malaltia després del tractament^{334,118}, d'aquí la importància de l'eficàcia de l'YM155 en induir apoptosi principalment en les cèl·lules d'LLC proliferants. De totes maneres, a l'hora de dissenyar una estratègia terapèutica eficaç en front l'LLC cal tenir en compte que, només amb l'acció de l'YM155, les cèl·lules d'LLC circulants no proliferants podrien potencialment recircular *in vivo* cap als teixits limfoides, arribar als centres proliferatius i tornar a constituir una nova població de cèl·lules d'LLC proliferants i quimioresistents. Els nostres experiments *in vitro* testant la combinació de l'YM155 amb agents quimioteràpics convencionals com la fludarabina i la bendamustina demostren que aquestes aproximacions terapèutiques podrien arribar a ser opcions eficaces dirigides tant al compartiment proliferant com a les cèl·lules circulants quiescents.

Per tant, els nostres resultats demostrarien que el sistema de cocultiu utilitzat en el nostre estudi protegeix a les cèl·lules primàries d'LLC de l'apoptosi espontània i induïda per fàrmacs, promou la seva proliferació i indueix l'expressió de survivina. En aquest sentit, inhibint la transcripció de la proteïna survivina amb l'YM155 s'aconsegueix de forma eficaç suprimir aquesta protecció i proliferació induïdes pel microambient i té un efecte específic en

DISCUSSIÓ

les cèl·lules d'LLC proliferants. Així doncs, l'YM155 podria ser una potent droga en front les cèl·lules d'LLC quimioresistents que complementaria l'actual arsenal terapèutic en l'LLC.

v. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- 1.** El co-cultiu de cèl·lules primàries d'LLC amb BMSC, CD40L i CpG ODN indueix proliferació en les cèl·lules d'LLC.
- 2.** El co-cultiu de cèl·lules primàries d'LLC amb BMSC, CD40L i CpG ODN promou un immunofenotip comparable al del compartiment proliferant de cèl·lules d'LLC circulant en sang perifèrica.
- 3.** El co-cultiu de cèl·lules primàries d'LLC amb BMSC, CD40L i CpG ODN incrementa significativament l'expressió de la proteïna ZAP-70 en les cèl·lules d'LLC.
- 4.** Les cèl·lules primàries d'LLC cocultivades amb BMSC, CD40L i CpG ODN adquireixen una marcada quimioresistència al tractament amb fludarabina i bendamustina.
- 5.** El co-cultiu de cèl·lules primàries d'LLC amb BMSC, CD40L i CpG ODN indueix l'expressió de la proteïna survivina en les cèl·lules d'LLC.
- 6.** El tractament de les cèl·lules d'LLC cultivades amb BMSC, CD40L i CpG ODN amb YM155 suprimeix l'expressió de survivina induïda pel cocultiu.
- 7.** El tractament amb YM155 indueix apoptosi en les cèl·lules primàries d'LLC de forma preferent en aquelles cèl·lules d'LLC proliferants i independentment de factors pronòstic biològics.
- 8.** L'YM155 indueix apoptosi depenent de caspases en les cèl·lules d'LLC sense inducció de dany en el DNA i regulació negativa de l'expressió d'Mcl-1.
- 9.** La combinació de l'YM155 amb fludarabina i bendamustina incrementa la toxicitat enfront les cèl·lules primàries d'LLC.

vi. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1 Mikkola HKA, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Dev Camb Engl* 2006; **133**: 3733–3744.
- 2 Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; **505**: 327–334.
- 3 Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 2013; **495**: 231–235.
- 4 Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Prchal JT. *Williams Hematology*. 7th ed. McGraw-Hill Medical: New York.
- 5 Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N *et al*. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 2013; **153**: 1025–1035.
- 6 Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J *et al*. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 2007; **109**: 3706–3712.
- 7 Metcalf D. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood* 1998; **92**: 345–347; discussion 352.
- 8 Enver T, Heyworth CM, Dexter TM. Do stem cells play dice? *Blood* 1998; **92**: 348–351; discussion 352.
- 9 Schlissel MS. Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 890–899.
- 10 Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 497–508.
- 11 Hirose J, Kouro T, Igarashi H, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW. A developing picture of lymphopoiesis in bone marrow. *Immunol Rev* 2002; **189**: 28–40.
- 12 Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 195–205.
- 13 Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC *et al*. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994; **180**: 1955–1960.
- 14 Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi B-I, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 2004; **20**: 707–718.
- 15 Rolink AG, Winkler T, Melchers F, Andersson J. Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *J Exp Med* 2000; **191**: 23–32.

BIBLIOGRAFIA

- 16 Geier JK, Schlissel MS. Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements. *Semin Immunol* 2006; **18**: 31–39.
- 17 Melchers F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**: 578–584.
- 18 Mostoslavsky R, Singh N, Kirillov A, Pelanda R, Cedar H, Chess A *et al.* Kappa chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion. *Genes Dev* 1998; **12**: 1801–1811.
- 19 Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 728–740.
- 20 Osmond DG. Population dynamics of bone marrow B lymphocytes. *Immunol Rev* 1986; **93**: 103–124.
- 21 Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC. Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol* 2000; **1**: 379–385.
- 22 Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 22–33.
- 23 Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 251–262.
- 24 Lin K-I, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 4771–4780.
- 25 Arpin C, Déchanet J, Van Kooten C, Merville P, Grouard G, Brière F *et al.* Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 1995; **268**: 720–722.
- 26 Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; **352**: 804–815.
- 27 Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O *et al.* Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010; **116**: 3724–3734.
- 28 Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, Landgren O, Ostroumova E, Bluhm EC *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 2007; **139**: 809–819.
- 29 Cheson BD, Bennett JM, Rai KR, Grever MR, Kay NE, Schiffer CA *et al.* Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. *Am J Hematol* 1988; **29**: 152–163.
- 30 Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; **111**: 5446–5456.

- 31 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. IARC, 2008.
- 32 Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 1967; **29**: Suppl:566–584.
- 33 Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; **46**: 219–234.
- 34 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.
- 35 Chronic lymphocytic leukaemia: proposals for a revised prognostic staging system. Report from the International Workshop on CLL. *Br J Haematol* 1981; **48**: 365–367.
- 36 Abrisqueta P, Bosch F, Aymerich M, Gine E, Moreno C, Rozman M *et al.* Changes in the Natural History, Treatment Modalities, and Survival Patterns in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) from 1980 to 2008. The Hospital Clinic of Barcelona Experience. *ASH Annu Meet Abstr* 2008; **112**: 48.
- 37 Muntañola A, Bosch F, Arguis P, Arellano-Rodrigo E, Ayuso C, Giné E *et al.* Abdominal computed tomography predicts progression in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2007; **25**: 1576–1580.
- 38 Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Viñolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; **62**: 567–575.
- 39 Bergmann MA, Eichhorst BF, Busch R, Adorf D, Stilgenbauer S, Eckart MJ *et al.* Prospective Evaluation of Prognostic Parameters in Early Stage Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results of the CLL1-Protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). *ASH Annu Meet Abstr* 2007; **110**: 625.
- 40 Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S *et al.* National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; **87**: 4990–4997.
- 41 Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987; **69**: 929–936.
- 42 Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1910–1916.
- 43 Dürig J, Naschar M, Schmücker U, Renzing-Köhler K, Hölter T, Hüttmann A *et al.* CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2002; **16**: 30–35.
- 44 Schroers R, Griesinger F, Trümper L, Haase D, Kulle B, Klein-Hitpass L *et al.* Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; **19**: 750–758.

BIBLIOGRAFIA

- 45 Tam CS, O'Brien S, Wierda W, Kantarjian H, Wen S, Do K-A *et al.* Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **112**: 975–980.
- 46 Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P, Giallonardo P. Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1989; **81**: 181–185.
- 47 Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S *et al.* Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996; **22**: 439–447.
- 48 Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1999; **62**: 117–122.
- 49 Källander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1984; **54**: 2450–2455.
- 50 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 leukemia. *Blood* 1999; **93**: 1732–1737.
- 51 Magnac C, Porcher R, Davi F, Nataf J, Payelle-Brogard B, Tang RP *et al.* Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 2003; **17**: 133–137.
- 52 Sarfati M, Chevret S, Chastang C, Biron G, Stryckmans P, Delespesse G *et al.* Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996; **88**: 4259–4264.
- 53 Knauf WU, Langenmayer I, Ehlers B, Mohr B, Adorf D, Nerl CH *et al.* Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1997; **27**: 523–532.
- 54 Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G *et al.* Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**: 2633–2639.
- 55 Saka B, Aktan M, Sami U, Oner D, Sanem O, Dinçol G. Prognostic importance of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lab Haematol* 2006; **28**: 30–35.
- 56 Manshouri T, Do K, Wang X, Giles FJ, O'Brien SM, Saffer H *et al.* Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood* 2003; **101**: 2507–2513.
- 57 Eisterer W, Bechter O, Söderberg O, Nilsson K, Terol M, Greil R *et al.* Elevated levels of soluble CD44 are associated with advanced disease and in vitro proliferation of neoplastic lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2004; **28**: 1043–1051.
- 58 Samy N, Abd El-Maksoud MD, Mousa TE, El-Mezayen HA, Shaalan M. Potential role of serum level of soluble CD44 and IFN- γ in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol Northwood Lond Engl* 2011; **28 Suppl 1**: S471–475.

- 59 Molica S, Vitelli G, Levato D, Giannarelli D, Gandolfo GM. Elevated serum levels of soluble CD44 can identify a subgroup of patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia who are at high risk of disease progression. *Cancer* 2001; **92**: 713–719.
- 60 Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; **102**: 1515–1525.
- 61 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.
- 62 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.
- 63 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.
- 64 Crespo M, Bosch 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 leukemia. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1764–1775.
- 65 Kröber A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P *et al.* V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; **100**: 1410–1416.
- 66 Lanham S, Hamblin T, Oscier D, Ibbotson R, Stevenson F, Packham G. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; **101**: 1087–1093.
- 67 Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C *et al.* Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 2004; **103**: 375–382.
- 68 Oscier DG, Thompsett A, Zhu D, Stevenson FK. Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood* 1997; **89**: 4153–4160.
- 69 Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE *et al.* ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; **101**: 4944–4951.
- 70 Bosch F, Crespo M, Villamor N, Muntanola A, Ferrer A, Domingo A *et al.* Clinical Characteristics and Outcome of a Large Series of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) According to ZAP-70 Expression. *ASH Annu Meet Abstr* 2004; **104**: 14.
- 71 Ferrero E, Malavasi F. Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal

BIBLIOGRAFIA

- cell antigen 1 and alysin ADP-ribosyl cyclase. *J Immunol Baltim Md 1950* 1997; **159**: 3858–3865.
- 72 Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Dürig J, Morabito F, Dührsen U *et al.* CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003; **102**: 2146–2155.
- 73 Jelinek DF, Tschumper RC, Geyer SM, Bone ND, Dewald GW, Hanson CA *et al.* Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001; **115**: 854–861.
- 74 Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK *et al.* 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.
- 75 Hernández JA, Rodríguez AE, González M, Benito R, Fontanillo C, Sandoval V *et al.* A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica* 2009; **94**: 364–371.
- 76 Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, Reed JC, Kitada S *et al.* Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2007; **25**: 799–804.
- 77 Marasca R, Maffei R, Martinelli S, Fiorcari S, Bulgarelli J, Debbia G *et al.* Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematol Oncol* 2013; **31**: 88–95.
- 78 Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, Abruzzo LV, Van Dyke DL, O'Brien S *et al.* De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009; **114**: 957–964.
- 79 Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE *et al.* Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002; **100**: 1177–1184.
- 80 Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010; **17**: 28–40.
- 81 Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C *et al.* Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; **121**: 1403–1412.
- 82 Wierda WG, O'Brien S, Wang X, Faderl S, Ferrajoli A, Do K-A *et al.* Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2011; **29**: 4088–4095.

- 83 Ouillette P, Li J, Shaknovich R, Li Y, Melnick A, Shedden K *et al.* Incidence and clinical implications of ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; **51**: 1125–1132.
- 84 Rose-Zerilli MJ, Forster J, Parker H, Parker A, Rodríguez AE, Chaplin T *et al.* ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica* 2014; **99**: 736–742.
- 85 Döhner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G *et al.* p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 1995; **85**: 1580–1589.
- 86 Catovsky D, Richards S, Matutes E, Oscier D, Dyer MJS, Bezares RF *et al.* Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; **370**: 230–239.
- 87 Delgado J, Espinet B, Oliveira AC, Abrisqueta P, de la Serna J, Collado R *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *Br J Haematol* 2012; **157**: 67–74.
- 88 Zenz T, Eichhorst B, Busch R, Denzel T, Häbe S, Winkler D *et al.* TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2010; **28**: 4473–4479.
- 89 Rodríguez-Vicente AE, Díaz MG, Hernández-Rivas JM. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogeneous disease. *Cancer Genet* 2013; **206**: 49–62.
- 90 Gruber M, Wu CJ. Evolving understanding of the CLL genome. *Semin Hematol* 2014; **51**: 177–187.
- 91 Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; **475**: 101–105.
- 92 Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2012; **44**: 47–52.
- 93 Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K *et al.* SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011; **365**: 2497–2506.
- 94 Arruga F, Gizdic B, Serra S, Vaisitti T, Ciardullo C, Coscia M *et al.* Functional impact of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014; **28**: 1060–1070.
- 95 Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K *et al.* Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 2009; **113**: 856–865.
- 96 Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Rossi D, Minga E, Villamor N *et al.* Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014. doi:10.1038/leu.2014.196.

BIBLIOGRAFIA

- 97 Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M *et al.* Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011; **118**: 6904–6908.
- 98 Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S *et al.* Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; **119**: 2854–2862.
- 99 Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H *et al.* Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011; **470**: 115–119.
- 100 Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, Aymerich M, Jares P, Juan M *et al.* Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood* 2014; **123**: 3790–3796.
- 101 Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS *et al.* Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012; **481**: 506–510.
- 102 Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS *et al.* Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013; **152**: 714–726.
- 103 Ciccone M, Ferrajoli A, Keating MJ, Calin GA. SnapShot: chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2014; **26**: 770–770.e1.
- 104 Caligaris-Cappio F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood* 1996; **87**: 2615–2620.
- 105 Fischer M, Klein U, Küppers R. Molecular single-cell analysis reveals that CD5-positive peripheral blood B cells in healthy humans are characterized by rearranged V κ genes lacking somatic mutation. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1667–1676.
- 106 Capello D, Fais F, Vivenza D, Migliaretti G, Chiorazzi N, Gaidano G *et al.* Identification of three subgroups of B cell chronic lymphocytic leukemia based upon mutations of BCL-6 and IgV genes. *Leukemia* 2000; **14**: 811–815.
- 107 Wakai M, Hashimoto S, Omata M, Stoeberl ZM, Allen SL, Lichtman SM *et al.* IgG⁺, CD5⁺ human chronic lymphocytic leukemia B cells. Production of IgG antibodies that exhibit diminished autoreactivity and IgG subclass skewing. *Autoimmunity* 1994; **19**: 39–48.
- 108 Seifert M, Küppers R. Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM⁺(IgD⁺)CD27⁺ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med* 2009; **206**: 2659–2669.
- 109 Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**: 37–50.
- 110 Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 2011; **117**: 1781–1791.
- 111 Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Dürig J *et al.* Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2012; **209**: 2183–2198.

- 112 Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G *et al.* Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2011; **20**: 246–259.
- 113 Lanasa MC. Novel insights into the biology of CLL. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2010; **2010**: 70–76.
- 114 Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; **115**: 755–764.
- 115 Calissano C, Damle RN, Hayes G, Murphy EJ, Hellerstein MK, Moreno C *et al.* In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; **114**: 4832–4842.
- 116 Damle RN, Temburni S, Calissano C, Yancopoulos S, Banapour T, Sison C *et al.* CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood* 2007; **110**: 3352–3359.
- 117 Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan X-J, Yancopoulos S, Hayes G *et al.* Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med Camb Mass* 2011; **17**: 1374–1382.
- 118 Giné E, Martínez A, Villamor N, López-Guillermo A, Camos M, Martínez D *et al.* Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ('accelerated' chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* 2010; **95**: 1526–1533.
- 119 Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, Ding W, Schnabl S, Quiroga MP *et al.* Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 2009; **114**: 4441–4450.
- 120 Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996; **184**: 1101–1109.
- 121 Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of 'nurselike' cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; **99**: 1030–1037.
- 122 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.
- 123 Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A *et al.* NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 18261–18266.
- 124 Palomero T, Dominguez M, Ferrando AA. The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia. *Cell Cycle Georget Tex* 2008; **7**: 965–970.
- 125 Ramsay AD, Rodriguez-Justo M. Chronic lymphocytic leukaemia--the role of the microenvironment pathogenesis and therapy. *Br J Haematol* 2013; **162**: 15–24.

BIBLIOGRAFIA

- 126 Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells Dayt Ohio* 2006; **24**: 1030–1041.
- 127 Burger JA, Kipps TJ. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma* 2002; **43**: 461–466.
- 128 Campbell DJ, Kim CH, Butcher EC. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol Rev* 2003; **195**: 58–71.
- 129 Burger JA. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 424–430.
- 130 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.
- 131 Calpe E, Purroy N, Carpio C, Abrisqueta P, Carabia J, Palacio C *et al.* ZAP-70 promotes the infiltration of malignant B-lymphocytes into the bone marrow by enhancing signaling and migration after CXCR4 stimulation. *PLoS One* 2013; **8**: e81221.
- 132 Calpe E, Codony C, Baptista MJ, Abrisqueta P, Carpio C, Purroy N *et al.* ZAP-70 enhances migration of malignant B lymphocytes toward CCL21 by inducing CCR7 expression via IgM-ERK1/2 activation. *Blood* 2011; **118**: 4401–4410.
- 133 Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, Firestein GS, Kipps TJ. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2001; **107**: 305–315.
- 134 Brachtl G, Sahakyan K, Denk U, Girbl T, Alinger B, Hofbauer SW *et al.* Differential bone marrow homing capacity of VLA-4 and CD38 high expressing chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One* 2011; **6**: e23758.
- 135 Burger JA, Gandhi V. The lymphatic tissue microenvironments in chronic lymphocytic leukemia: in vitro models and the significance of CD40-CD154 interactions. *Blood* 2009; **114**: 2560–2561; author reply 2561–2562.
- 136 Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F *et al.* Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **111**: 865–873.
- 137 Majid A, Lin TT, Best G, Fishlock K, Hewamana S, Pratt G *et al.* CD49d is an independent prognostic marker that is associated with CXCR4 expression in CLL. *Leuk Res* 2011; **35**: 750–756.
- 138 Redondo-Muñoz J, Ugarte-Berzal E, García-Marco JA, del Cerro MH, Van den Steen PE, Opdenakker G *et al.* Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood* 2008; **112**: 169–178.

- 139 Amigo-Jiménez I, Bailón E, Ugarte-Berzal E, Aguilera-Montilla N, García-Marco JA, García-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide. *PLoS One* 2014; **9**: e99993.
- 140 Bailón E, Ugarte-Berzal E, Amigo-Jiménez I, Van den Steen P, Opdenakker G, García-Marco JA *et al.* Overexpression of progelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen. *J Leukoc Biol* 2014; **96**: 185–199.
- 141 Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 129–156.
- 142 Gu B, Dao LP, Wiley J. Impaired transendothelial migration of B-CLL lymphocytes: a defect linked to low L-selectin expression. *Leuk Lymphoma* 2001; **42**: 5–12.
- 143 Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 2–17.
- 144 Planken EV, Dijkstra NH, Willemze R, Kluin-Nelemans JC. Proliferation of B cell malignancies in all stages of differentiation upon stimulation in the 'CD40 system'. *Leukemia* 1996; **10**: 488–493.
- 145 Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; **106**: 995–1004.
- 146 Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M *et al.* Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **97**: 2777–2783.
- 147 Romano MF, Lamberti A, Tassone P, Alfinito F, Costantini S, Chiurazzi F *et al.* Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1998; **92**: 990–995.
- 148 Pascutti MF, Jak M, Tromp JM, Derks IAM, Remmerswaal EBM, Thijssen R *et al.* IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells. *Blood* 2013. doi:10.1182/blood-2012-11-467670.
- 149 Plander M, Seegers S, Ugocsai P, Diermeier-Daucher S, Iványi J, Schmitz G *et al.* Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles. *Leukemia* 2009; **23**: 2118–2128.
- 150 Buske C, Gogowski G, Schreiber K, Rave-Fränk M, Hiddemann W, Wörmann B. Stimulation of B-chronic lymphocytic leukemia cells by murine fibroblasts, IL-4, anti-CD40 antibodies, and the soluble CD40 ligand. *Exp Hematol* 1997; **25**: 329–337.
- 151 Natoni A, O'Dwyer M, Santocanale C. A cell culture system that mimics chronic lymphocytic leukemia cells microenvironment for drug screening and characterization. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2013; **986**: 217–226.
- 152 Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 499–511.
- 153 Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 249–258.

BIBLIOGRAFIA

- 154 Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio MTS, Frenquelli M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 2009; **144**: 507–516.
- 155 Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Guyart A, Regnier A, Trudel S, Claisse J-F *et al.* TLR9 Ligand (CpG Oligodeoxynucleotide) Induces CLL B-Cells to Differentiate into CD20(+) Antibody-Secreting Cells. *Front Immunol* 2014; **5**: 292.
- 156 Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Petlickovski A, Pelosi M, Chiusolo P *et al.* The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 2007; **21**: 110–120.
- 157 Chatzouli M, Ntoufa S, Papakonstantinou N, Chartomatsidou E, Anagnostopoulos A, Kollia P *et al.* Heterogeneous Functional Effects of Concomitant B Cell Receptor and TLR Stimulation in Chronic Lymphocytic Leukemia with Mutated Versus Unmutated Ig Genes. *J Immunol Baltim Md 1950* 2014. doi:10.4049/jimmunol.1302102.
- 158 Tromp JM, Tonino SH, Elias JA, Jaspers A, Luijks DM, Kater AP *et al.* Dichotomy in NF-kappaB signaling and chemoresistance in immunoglobulin variable heavy-chain-mutated versus unmutated CLL cells upon CD40/TLR9 triggering. *Oncogene* 2010; **29**: 5071–5082.
- 159 Tarnani M, Laurenti L, Longo PG, Piccirillo N, Gobessi S, Mannocci A *et al.* The proliferative response to CpG-ODN stimulation predicts PFS, TTT and OS in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2010; **34**: 1189–1194.
- 160 Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; **118**: 4313–4320.
- 161 Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T *et al.* Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007; **109**: 259–270.
- 162 Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C *et al.* Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008; **111**: 1524–1533.
- 163 Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, Murray F, Laurell A, Willander K *et al.* Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; **104**: 2879–2885.
- 164 Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M *et al.* Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2004; **113**: 1008–1016.
- 165 Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, Ghiotto F, Allen SL, Kolitz J *et al.* Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004; **200**: 519–525.
- 166 Widhopf GF, Rassenti LZ, Toy TL, Gribben JG, Wierda WG, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood* 2004; **104**: 2499–2504.

- 167 Messmer BT, Albesiano E, Messmer D, Chiorazzi N. The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood* 2004; **103**: 3490–3495.
- 168 Lanemo Myhrinder A, Hellqvist E, Sidorova E, Söderberg A, Baxendale H, Dahle C *et al.* A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood* 2008; **111**: 3838–3848.
- 169 Hervé M, Xu K, Ng Y-S, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT *et al.* Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1636–1643.
- 170 Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G *et al.* Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005; **105**: 1678–1685.
- 171 Ghia EM, Jain S, Widhopf GF, Rassenti LZ, Keating MJ, Wierda WG *et al.* Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood* 2008; **111**: 5101–5108.
- 172 Thomas S, Preda-Pais A, Casares S, Brumeanu T-D. Analysis of lipid rafts in T cells. *Mol Immunol* 2004; **41**: 399–409.
- 173 Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 2012; **120**: 1175–1184.
- 174 Muzio M, Apollonio B, Scielzo C, Frenquelli M, Vandoni I, Bousiotis V *et al.* Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood* 2008; **112**: 188–195.
- 175 Ringshausen I, Schneller F, Bogner C, Hipp S, Duyster J, Peschel C *et al.* Constitutively activated phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) is involved in the defect of apoptosis in B-CLL: association with protein kinase Cdelta. *Blood* 2002; **100**: 3741–3748.
- 176 Zhuang J, Hawkins SF, Glenn MA, Lin K, Johnson GG, Carter A *et al.* Akt is activated in chronic lymphocytic leukemia cells and delivers a pro-survival signal: the therapeutic potential of Akt inhibition. *Haematologica* 2010; **95**: 110–118.
- 177 Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2000; **164**: 2200–2206.
- 178 Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki J *et al.* Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem* 1991; **266**: 15790–15796.
- 179 Mócsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JAG, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC *et al.* The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 6158–6163.
- 180 Yanagi S, Inatome R, Takano T, Yamamura H. Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **288**: 495–498.

BIBLIOGRAFIA

- 181 Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu M-M, Zhou R, Mocsai A *et al.* Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science* 2003; **299**: 247–251.
- 182 Goodman PA, Wood CM, Vassilev A, Mao C, Uckun FM. Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* 2001; **20**: 3969–3978.
- 183 Jumaa H, Bossaller L, Portugal K, Storch B, Lotz M, Flemming A *et al.* Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2003; **423**: 452–456.
- 184 Buchner M, Fuchs S, Prinz G, Pfeifer D, Bartholomé K, Burger M *et al.* Spleen tyrosine kinase is overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2009; **69**: 5424–5432.
- 185 Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992; **71**: 649–662.
- 186 Wang H, Kadlecsek TA, Au-Yeung BB, Goodfellow HES, Hsu L-Y, Freedman TS *et al.* ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**: a002279.
- 187 Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, Wierda WG, Grever MR, Byrd JC *et al.* Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **112**: 1923–1930.
- 188 Chen L, Apgar J, Huynh L, Dicker F, Giago-McGahan T, Rassenti L *et al.* ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; **105**: 2036–2041.
- 189 Chen L, Huynh L, Apgar J, Tang L, Rassenti L, Weiss A *et al.* ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **111**: 2685–2692.
- 190 Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; **396**: 580–584.
- 191 Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; **22**: 8581–8589.
- 192 Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 2001; **11**: 49–54.
- 193 Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 61–70.
- 194 Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 2004; **64**: 7183–7190.
- 195 Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, Lee J, Nomoto K, Schrantz N *et al.* IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 1754–1766.
- 196 Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 401–410.

- 197 Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC. Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 1999; **19**: 388–398.
- 198 Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1117–1127.
- 199 Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 23130–23140.
- 200 Vogel C, Hager C, Bastians H. Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation. *Cancer Res* 2007; **67**: 339–345.
- 201 Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 1457–1462.
- 202 Jeyaprakash AA, Klein UR, Lindner D, Ebert J, Nigg EA, Conti E. Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together. *Cell* 2007; **131**: 271–285.
- 203 Stauber RH, Mann W, Knauer SK. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Res* 2007; **67**: 5999–6002.
- 204 Rosa J, Canovas P, Islam A, Altieri DC, Doxsey SJ. Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 1483–1493.
- 205 Grzybowska-Izydorczyk O, Cebula B, Robak T, Smolewski P. Expression and prognostic significance of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family and its antagonists in chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* 2010; **46**: 800–810.
- 206 Munzert G, Kirchner D, Stobbe H, Bergmann L, Schmid RM, Döhner H *et al.* Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood* 2002; **100**: 3749–3756.
- 207 Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K *et al.* Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004; **28**: 487–494.
- 208 Sachanas S, Levidou G, Angelopoulou MK, Moschogiannis M, Yiakoumis X, Kalpadakis C *et al.* Apoptotic and proliferative characteristics of proliferation centers in lymph node sections of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013. doi:10.3109/10428194.2013.806802.
- 209 Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, Minematsu T, Shirasuna K, Matsuhisa A *et al.* YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res* 2007; **67**: 8014–8021.
- 210 Cheng Q, Ling X, Haller A, Nakahara T, Yamanaka K, Kita A *et al.* Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter. *Int J Biochem Mol Biol* 2012; **3**: 179–197.

BIBLIOGRAFIA

- 211 Nakamura N, Yamauchi T, Hiramoto M, Yuri M, Naito M, Takeuchi M *et al.* Interleukin enhancer-binding factor 3/NF110 is a target of YM155, a suppressant of survivin. *Mol Cell Proteomics MCP* 2012; **11**: M111.013243.
- 212 Tang H, Shao H, Yu C, Hou J. Mcl-1 downregulation by YM155 contributes to its synergistic anti-tumor activities with ABT-263. *Biochem Pharmacol* 2011; **82**: 1066–1072.
- 213 Feng W, Yoshida A, Ueda T. YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; **435**: 52–57.
- 214 Wagner V, Hose D, Seckinger A, Weiz L, Meißner T, Rème T *et al.* Preclinical efficacy of sepantronium bromide (YM155) in multiple myeloma is conferred by down regulation of Mcl-1. *Oncotarget* 2014.
- 215 Rauch A, Hennig D, Schäfer C, Wirth M, Marx C, Heinzl T *et al.* Survivin and YM155: how faithful is the liaison? *Biochim Biophys Acta* 2014; **1845**: 202–220.
- 216 Glaros TG, Stockwin LH, Mullendore ME, Smith B, Morrison BL, Newton DL. The ‘survivin suppressants’ NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; **70**: 207–212.
- 217 Iwasa T, Okamoto I, Suzuki M, Nakahara T, Yamanaka K, Hatashita E *et al.* Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008; **14**: 6496–6504.
- 218 Chen J, Pise-Masison CA, Shih JH, Morris JC, Janik JE, Conlon KC *et al.* Markedly additive antitumor activity with the combination of a selective survivin suppressant YM155 and alemtuzumab in adult T-cell leukemia. *Blood* 2013; **121**: 2029–2037.
- 219 Kaneko N, Mitsuoka K, Amino N, Yamanaka K, Kita A, Mori M *et al.* Combination of YM155, a survivin suppressant, with bendamustine and rituximab: a new combination therapy to treat relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2014; **20**: 1814–1822.
- 220 Kaneko N, Kita A, Yamanaka K, Mori M. Combination of YM155, a survivin suppressant with a STAT3 inhibitor: a new strategy to treat diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res* 2013; **37**: 1156–1161.
- 221 Cheson BD, Bartlett NL, Vose JM, Lopez-Hernandez A, Seiz AL, Keating AT *et al.* A phase II study of the survivin suppressant YM155 in patients with refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* 2012; **118**: 3128–3134.
- 222 Shakushiro K, Kawano H, Nakata M, Kita A, Maeda A, Watanabe S *et al.* Formulation Design and Evaluation of Liposomal Sepantronium Bromide (YM155), a Small-Molecule Survivin Suppressant, Based on Pharmacokinetic Modeling and Simulation. *Pharm Res* 2014. doi:10.1007/s11095-014-1458-4.
- 223 Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists’ Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 861–868.
- 224 Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 2013; **88**: 803–816.

- 225 Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, Liberati A, Loscertales J, Herbrecht R *et al.* Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2009; **27**: 4378–4384.
- 226 Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C *et al.* Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; **107**: 885–891.
- 227 Flinn IW, Neuberg DS, Grever MR, Dewald GW, Bennett JM, Paietta EM *et al.* Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2007; **25**: 793–798.
- 228 Bosch F, Ferrer A, Villamor N, González M, Briones J, González-Barca E *et al.* Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008; **14**: 155–161.
- 229 Bosch F, Ferrer A, López-Guillermo A, Giné E, Bellosillo B, Villamor N *et al.* Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002; **119**: 976–984.
- 230 Hendry L, Bowen A, Matutes E, Swansbury J, Catovsky D. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia and low grade non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2004; **45**: 945–950.
- 231 Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 2004; **104**: 2635–2642.
- 232 Huhn D, von Schilling C, Wilhelm M, Ho AD, Hallek M, Kuse R *et al.* Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**: 1326–1331.
- 233 O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, Giles FJ, Freireich EJ, Cortes J *et al.* Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2001; **19**: 2165–2170.
- 234 Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, Jaksic B, Dmoszynska A, Wu J *et al.* Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2007; **25**: 5616–5623.
- 235 Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Pons G, Montserrat E, Gil J. In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**: 2836–2843.
- 236 Di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, Bassan R, Rambaldi A, Golay J *et al.* Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *Br J Haematol* 2001; **114**: 800–809.
- 237 Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J *et al.* Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; **376**: 1164–1174.

BIBLIOGRAFIA

- 238 Robak T, Jamroziak K, Gora-Tybor J, Stella-Holowiecka B, Konopka L, Ceglarek B *et al.* Comparison of cladribine plus cyclophosphamide with fludarabine plus cyclophosphamide as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia: a phase III randomized study by the Polish Adult Leukemia Group (PALG-CLL3 Study). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2010; **28**: 1863–1869.
- 239 Foon KA, Boyiadzis M, Land SR, Marks S, Raptis A, Pietragallo L *et al.* Chemoimmunotherapy with low-dose fludarabine and cyclophosphamide and high dose rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2009; **27**: 498–503.
- 240 Bosch F, Abrisqueta P, Villamor N, Terol MJ, González-Barca E, Ferra C *et al.* Rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone: a new, highly active chemoimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2009; **27**: 4578–4584.
- 241 Reynolds C, Di Bella N, Lyons RM, Hyman W, Richards DA, Robbins GJ *et al.* A Phase III trial of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab vs. pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Invest New Drugs* 2012; **30**: 1232–1240.
- 242 Fink A-M, Busch R, Lange E, Köppler H, Kiehl M, Sökler M *et al.* Chemoimmunotherapy With Fludarabine (F), Cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) Versus Bendamustine and Rituximab (BR) In Previously Untreated and Physically Fit Patients (pts) With Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results Of a Planned Interim Analysis Of The CLL10 Trial, An International, Randomized Study Of The German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood* 2013; **122**: 526–526.
- 243 Lepretre S, Aurran T, Mahé B, Cazin B, Tournilhac O, Maisonneuve H *et al.* Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood* 2012; **119**: 5104–5110.
- 244 Elter T, Gercheva-Kyuchukova L, Pylypenko H, Robak T, Jaksic B, Rekhman G *et al.* Fludarabine plus alemtuzumab versus fludarabine alone in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia: a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2011; **12**: 1204–1213.
- 245 Robak T. Current and emerging monoclonal antibody treatments for chronic lymphocytic leukemia: state of the art. *Expert Rev Hematol* 2014; **7**: 841–857.
- 246 Kalaycio M, Negrea OG, Elstrom R, Farber C, Horne H, Wegener WA *et al.* Monotherapy with Subcutaneous (SC) Injections of Low Doses of Humanized Anti-CD20 Veltuzumab Is Active in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *ASH Annu Meet Abstr* 2012; **120**: 192.
- 247 Byrd JC, Pagel JM, Awan FT, Forero A, Flinn IW, Deauna-Limayo DP *et al.* A phase 1 study evaluating the safety and tolerability of otlertuzumab, an anti-CD37 mono-specific ADAPTIR therapeutic protein in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; **123**: 1302–1308.
- 248 Awan FT, Hillmen P, Hellmann A, Robak T, Hughes SG, Trone D *et al.* A randomized, open-label, multicentre, phase 2/3 study to evaluate the safety and efficacy of lumiliximab in combination with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab versus fludarabine,

- cyclophosphamide and rituximab alone in subjects with relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2014; **167**: 466–477.
- 249 Byrd JC, Kipps TJ, Flinn IW, Cooper M, Odenike O, Bendiske J *et al.* Phase I study of the anti-CD40 humanized monoclonal antibody lucatumumab (HCD122) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012; **53**: 2136–2142.
- 250 Chanan-Khan A, Miller KC, Musial L, Lawrence D, Padmanabhan S, Takeshita K *et al.* Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2006; **24**: 5343–5349.
- 251 Ferrajoli A, Lee B-N, Schlette EJ, O'Brien SM, Gao H, Wen S *et al.* Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **111**: 5291–5297.
- 252 James DF, Werner L, Brown JR, Wierda WG, Barrientos JC, Castro JE *et al.* Lenalidomide and rituximab for the initial treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter clinical-translational study from the chronic lymphocytic leukemia research consortium. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2014; **32**: 2067–2073.
- 253 Eichhorst B, Bahlo J, Fink AM, Pfreundschuh M, Hebart H, Maschmeyer G *et al.* Good Tolerance of Lenalidomide Maintenance Therapy in Patients with High Risk Profile Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) after Frontline Chemoimmunotherapy: Preliminary Safety Overview of the CLLM1 Trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood* 2014; **124**: 4699–4699.
- 254 Amrein PC, Attar EC, Takvorian T, Hochberg EP, Ballen KK, Leahy KM *et al.* Phase II Study of Dasatinib in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 2977–2986.
- 255 De Gorter DJJ, Beuling EA, Kersseboom R, Middendorp S, van Gils JM, Hendriks RW *et al.* Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity* 2007; **26**: 93–104.
- 256 Herman SEM, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S *et al.* Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011; **117**: 6287–6296.
- 257 Ponader S, Chen S-S, Buggy JJ, Balakrishnan K, Gandhi V, Wierda WG *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 2012; **119**: 1182–1189.
- 258 De Rooij MFM, Kuil A, Geest CR, Eldering E, Chang BY, Buggy JJ *et al.* The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; **119**: 2590–2594.
- 259 Herman SEM, Sun X, McAuley EM, Hsieh MM, Pittaluga S, Raffeld M *et al.* Modeling tumor-host interactions of chronic lymphocytic leukemia in xenografted mice to study tumor biology and evaluate targeted therapy. *Leukemia* 2013; **27**: 2311–2321.

BIBLIOGRAFIA

- 260 Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; **369**: 32–42.
- 261 O'Brien S, Furman RR, Coutre SE, Sharman JP, Burger JA, Blum KA *et al.* Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol* 2014; **15**: 48–58.
- 262 Burger JA, Keating MJ, Wierda WG, Hartmann E, Hoellenriegel J, Rosin NY *et al.* Safety and activity of ibrutinib plus rituximab for patients with high-risk chronic lymphocytic leukaemia: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2014; **15**: 1090–1099.
- 263 Barrientos JC, Barr PM, Flinn I, Burger JA, Salman Z, Clow F *et al.* Ibrutinib In Combination With Bendamustine and Rituximab Is Active and Tolerable In Patients With Relapsed/Refractory CLL/SLL: Final Results Of a Phase 1b Study. *Blood* 2013; **122**: 525–525.
- 264 Jaglowski SM, Jones JA, Flynn JM, Andritsos LA, Maddocks KJ, Woyach JA *et al.* A phase 1b/2 study evaluating activity and tolerability of the BTK inhibitor ibrutinib in combination with ofatumumab in patients with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) and related diseases. *ASCO Meet Abstr* 2014; **32**: 7009.
- 265 Byrd JC, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Kay NE, Reddy NM *et al.* Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2014; **371**: 213–223.
- 266 Bilancio A, Okkenhaug K, Camps M, Emery JL, Ruckle T, Rommel C *et al.* Key role of the p110delta isoform of PI3K in B-cell antigen and IL-4 receptor signaling: comparative analysis of genetic and pharmacologic interference with p110delta function in B cells. *Blood* 2006; **107**: 642–650.
- 267 Hoellenriegel J, Coffey GP, Sinha U, Pandey A, Sivina M, Ferrajoli A *et al.* Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia* 2012; **26**: 1576–1583.
- 268 Hoellenriegel J, Meadows SA, Sivina M, Wierda WG, Kantarjian H, Keating MJ *et al.* The phosphoinositide 3'-kinase delta inhibitor, CAL-101, inhibits B-cell receptor signaling and chemokine networks in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; **118**: 3603–3612.
- 269 Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, Benson DM, Flinn IW, Wagner-Johnston ND *et al.* Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; **123**: 3390–3397.
- 270 Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, Cheson BD, Pagel JM, Hillmen P *et al.* Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014; **370**: 997–1007.
- 271 Barrientos JC, Coutre SE, Vos S de, Wagner-Johnston ND, Flinn IW, Sharman JP *et al.* Long-Term Follow-up of a Phase 1 Trial of Idelalisib (ZYDELIG[®]) in Combination with Bendamustine (B), Bendamustine/Rituximab (BR), Fludarabine (F), Chlorambucil (ChI), or Chlorambucil/Rituximab (ChIR) in Patients with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood* 2014; **124**: 3343–3343.
- 272 Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M *et al.* R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **319**: 998–1008.

- 273 Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Carsetti L, Berno V, Sica S *et al.* Inhibition of constitutive and BCR-induced Syk activation downregulates Mcl-1 and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2009; **23**: 686–697.
- 274 Buchner M, Baer C, Prinz G, Dierks C, Burger M, Zenz T *et al.* Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; **115**: 4497–4506.
- 275 Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, Sivina M, Keating MJ, Wierda WG *et al.* B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* 2009; **114**: 1029–1037.
- 276 Suljagic M, Longo PG, Bennardo S, Perlas E, Leone G, Laurenti L *et al.* The Syk inhibitor fostamatinib disodium (R788) inhibits tumor growth in the E μ - TCL1 transgenic mouse model of CLL by blocking antigen-dependent B-cell receptor signaling. *Blood* 2010; **116**: 4894–4905.
- 277 Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, Johnston PB, Vose JM, LaCasce A *et al.* Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; **115**: 2578–2585.
- 278 Herman SEM, Barr PM, McAuley EM, Liu D, Wiestner A, Friedberg JW. Fostamatinib inhibits B-cell receptor signaling, cellular activation and tumor proliferation in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2013; **27**: 1769–1773.
- 279 Currie KS, Kropf JE, Lee T, Blomgren P, Xu J, Zhao Z *et al.* Discovery of GS-9973, a selective and orally efficacious inhibitor of spleen tyrosine kinase. *J Med Chem* 2014; **57**: 3856–3873.
- 280 Burke RT, Meadows S, Loriaux MM, Currie KS, Mitchell SA, Maciejewski P *et al.* A potential therapeutic strategy for chronic lymphocytic leukemia by combining Idelalisib and GS-9973, a novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor. *Oncotarget* 2014; **5**: 908–915.
- 281 Spurgeon SE, Coffey G, Fletcher LB, Burke R, Tyner JW, Druker BJ *et al.* The selective SYK inhibitor P505-15 (PRT062607) inhibits B cell signaling and function in vitro and in vivo and augments the activity of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; **344**: 378–387.
- 282 Sharman J, Hawkins M, Kolibaba K, Boxer M, Klein L, Wu M *et al.* An open-label phase 2 trial of entospletinib (GS-9973), a selective Syk inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2015. doi:10.1182/blood-2014-08-595934.
- 283 Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; **82**: 1820–1828.
- 284 Pepper C, Bentley P, Hoy T. Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; **95**: 513–517.
- 285 Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL *et al.* Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study

BIBLIOGRAFIA

- of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2012; **30**: 488–496.
- 286 Seymour JF, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Puvvada S *et al.* ABT-199 (GDC-0199) in relapsed/refractory (R/R) chronic lymphocytic leukemia (CLL) and small lymphocytic lymphoma (SLL): High complete- response rate and durable disease control. *ASCO Meet Abstr* 2014; **32**: 7015.
- 287 Wierda WG, Seymour JF, Roberts AW, Puvvada S, Davids MS, Wong S *et al.* A phase 2 open-label study of the efficacy of ABT-199 (GDC-0199) in patients with relapsed or refractory (R/R) chronic lymphocytic leukemia (CLL) harboring 17p deletion. *ASCO Meet Abstr* 2014; **32**: TPS7121.
- 288 Mobasher M, Huang J, Elstrom RL, Elhamy M, Bernaards C, Hallek MJ *et al.* Multicenter, phase III, open-label, randomized study in relapsed/refractory CLL to evaluate the benefit of GDC-0199 (ABT-199) plus rituximab compared with bendamustine plus rituximab. *ASCO Meet Abstr* 2014; **32**: TPS7120.
- 289 Flinn I, Brunvand M, Dyer MJ, Hillman P, Jones J, Lymp J *et al.* Preliminary Results of a Phase 1b Study (GP28331) Combining GDC-0199 (ABT-199) and Obinutuzumab in Patients with Relapsed/Refractory or Previously Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 2014; **124**: 4687–4687.
- 290 Salles GA, Boyd TE, Morschhauser F, Wendtner C-M, Lymp J, Hilger J *et al.* Preliminary Results of a Phase 1b Study (GO28440) Combining GDC-0199 (ABT-199) with Bendamustine/Rituximab in Patients with Relapsed/Refractory or Previously Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 2014; **124**: 3337–3337.
- 291 Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 720–724.
- 292 Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; **10**: 267–276.
- 293 Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG *et al.* CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2013; **5**: 177ra38.
- 294 Wang X, Naranjo A, Brown CE, Bautista C, Wong CW, Chang W-C *et al.* Phenotypic and functional attributes of lentivirus-modified CD19-specific human CD8+ central memory T cells manufactured at clinical scale. *J Immunother Hagerstown Md* 1997 2012; **35**: 689–701.
- 295 Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I *et al.* B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012; **119**: 2709–2720.
- 296 Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; **365**: 725–733.

- 297 Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A *et al.* T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011; **3**: 95ra73.
- 298 Sutton L, Chevret S, Tournilhac O, Diviné M, Leblond V, Corront B *et al.* Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC. *Blood* 2011; **117**: 6109–6119.
- 299 Michallet M, Dreger P, Sutton L, Brand R, Richards S, van Os M *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: results of European intergroup randomized trial comparing autografting versus observation. *Blood* 2011; **117**: 1516–1521.
- 300 Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J *et al.* Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007; **21**: 12–17.
- 301 Farina L, Carniti C, Doderio A, Vendramin A, Raganato A, Spina F *et al.* Qualitative and quantitative polymerase chain reaction monitoring of minimal residual disease in relapsed chronic lymphocytic leukemia: early assessment can predict long-term outcome after reduced intensity allogeneic transplantation. *Haematologica* 2009; **94**: 654–662.
- 302 Dreger P, Schetelig J, Andersen N, Corradini P, van Gelder M, Gribben J *et al.* Managing high-risk CLL during transition to a new treatment era: stem cell transplantation or novel agents? *Blood* 2014; **124**: 3841–3849.
- 303 Kharfan-Dabaja MA, Pidala J, Kumar A, Terasawa T, Djulbegovic B. Comparing efficacy of reduced-toxicity allogeneic hematopoietic cell transplantation with conventional chemo-(immuno) therapy in patients with relapsed or refractory CLL: a Markov decision analysis. *Bone Marrow Transplant* 2012; **47**: 1164–1170.
- 304 Böttcher S, Stilgenbauer S, Busch R, Brüggemann M, Raff T, Pott C *et al.* Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis. *Leukemia* 2009; **23**: 2007–2017.
- 305 Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL *et al.* International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2007; **21**: 956–964.
- 306 Moreno C, Villamor N, Colomer D, Esteve J, Giné E, Muntañola A *et al.* Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; **107**: 4563–4569.
- 307 Moreton P, Kennedy B, Lucas G, Leach M, Rassam SMB, Haynes A *et al.* Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2005; **23**: 2971–2979.
- 308 Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G *et al.* Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free

BIBLIOGRAFIA

- and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2012; **30**: 980–988.
- 309 Cheson BD, Byrd JC, Rai KR, Kay NE, O'Brien SM, Flinn IW *et al.* Novel targeted agents and the need to refine clinical end points in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2012; **30**: 2820–2822.
- 310 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 Off J Am Soc Clin Oncol* 2005; **23**: 4079–4088.
- 311 Robak T, Dmoszynska A, Solal-Céligny P, Warzocha K, Loscertales J, Catalano J *et al.* Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2010; **28**: 1756–1765.
- 312 Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA, Peterson BL, Gribben JG, Morrison VA *et al.* Chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab produces extended overall survival and progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of CALGB study 9712. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2011; **29**: 1349–1355.
- 313 Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Burger JA, Blum KA, Coleman M *et al.* Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood* 2015; **125**: 2497–2506.
- 314 Kay NE, Shanafelt TD, Strege AK, Lee YK, Bone ND, Raza A. Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an 'angiogenic switch'. *Leuk Res* 2007; **31**: 899–906.
- 315 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.
- 316 Ding W, Nowakowski GS, Knox TR, Boysen JC, Maas ML, Schwager SM *et al.* Bi-directional activation between mesenchymal stem cells and CLL B-cells: implication for CLL disease progression. *Br J Haematol* 2009; **147**: 471–483.
- 317 Buske C, Gogowski G, Schreiber K, Rave-Fränk M, Hiddemann W, Wörmann B. Stimulation of B-chronic lymphocytic leukemia cells by murine fibroblasts, IL-4, anti-CD40 antibodies, and the soluble CD40 ligand. *Exp Hematol* 1997; **25**: 329–337.
- 318 Fluckiger AC, Rossi JF, Bussel A, Bryon P, Banchereau J, Defrance T. Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood* 1992; **80**: 3173–3181.
- 319 Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 1403–1413.
- 320 Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H *et al.* Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an

- immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2000; **95**: 999–1006.
- 321 Jahrsdörfer B, Hartmann G, Racila E, Jackson W, Mühlhoff L, Meinhardt G *et al.* CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* 2001; **69**: 81–88.
- 322 Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* 1998; **187**: 655–660.
- 323 Yoshida R, Imai T, Hieshima K, Kusuda J, Baba M, Kitaura M *et al.* Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J Biol Chem* 1997; **272**: 13803–13809.
- 324 Ohl L, Henning G, Krautwald S, Lipp M, Hardtke S, Bernhardt G *et al.* Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J Exp Med* 2003; **197**: 1199–1204.
- 325 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 leukemia. *Blood* 2002; **100**: 4609–4614.
- 326 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.
- 327 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; **3**: 917–921.
- 328 Altieri DC. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. *J Cell Biochem* 2004; **92**: 656–663.
- 329 Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 4349–4354.
- 330 Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw WC, Wheatley SP. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 2003; **116**: 2987–2998.
- 331 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; **3**: 917–921.
- 332 Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M *et al.* Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Sci* 2011; **102**: 614–621.
- 333 Tolcher AW, Quinn DI, Ferrari A, Ahmann F, Giaccone G, Drake T *et al.* A phase II study of YM155, a novel small-molecule suppressor of survivin, in castration-resistant taxane-pretreated prostate cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 2012; **23**: 968–973.

BIBLIOGRAFIA

- 334 Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; **117**: 563–574.

