

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA  
MOLECULAR

LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B: UNA ENFERMEDAD  
HETEROGÉNEA. ESTUDIO DEL ROL DE LAS  
MUTACIONES DE IGVH Y BCL-6 EN ESTA  
HETEROGENEIDAD: APROXIMACIONES GENÓMICA Y  
FUNCIONAL

ELOISA JANTUS LEWINTRE

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 24 de juny de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Vicente Vicente García
- D. Jordi Sierra Gil
- D<sup>a</sup>. Ana Conesa Cegarra
- D. Vicente Alberola Candel
- D. Gerardo López Rodas

Va ser dirigida per:

D. Javier García-Conde Bru

D<sup>a</sup>. Rosa Farrás Rivera

©Copyright: Servei de Publicacions  
Eloisa Jantus Lewintre

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7249-4

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

# VNIVERSITAT VALÈNCIA

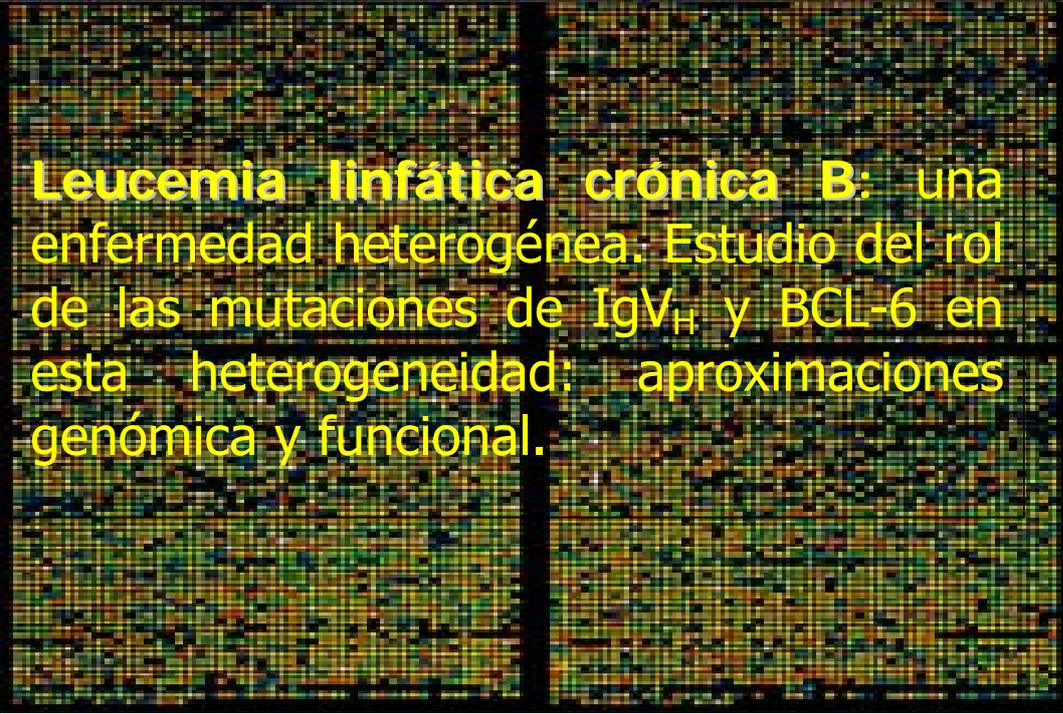
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**PROGRAMA DE DOCTORADO:** Bioquímica Clínico-Médica e Inmunología  
(2da edición)- Mención de calidad.

**DOCTORANDO:** Eloisa Jantus Lewintre

**DIRECTORES:** Prof. Dr. Javier García Conde  
Dra. Rosa Farrás Rivera

**LUGAR DE REALIZACIÓN:** Centro de Investigación Príncipe Felipe  
Hospital Clínico Universitario de Valencia



**Leucemia linfática crónica B: una enfermedad heterogénea. Estudio del rol de las mutaciones de IgV<sub>H</sub> y BCL-6 en esta heterogeneidad: aproximaciones genómica y funcional.**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo agradecer **a mis directores:**

Al **Prof Javier García Conde**, por todo su apoyo y confianza y el ánimo que me ha transmitido durante estos años de trabajo. Por abrirme las puertas de su grupo, sin conocerme, por escuchar y respetar mis opiniones y por permitirme emprender una aventura que aunque dura y sacrificada es además interesante y maravillosa.

A la **Dra. Rosa Farrás**, por su calidez como persona, su trato amable, sus consejos y por los invaluable aportes que ha realizado para que esta tesis pudiera hacerse realidad.

Gracias también a todos aquellos que han compartido el laboratorio conmigo, primero en el **Hospital Clínico** y luego en el **Centro de Investigación Príncipe Felipe**, sin el apoyo de todos ustedes, el camino hubiera sido mucho mas difícil. Hemos sabido compatibilizar los buenos y malos momentos y siempre me han dado sus opiniones y consejos sin mezquindades.

A los **coautores** de los trabajos científicos por su invaluable aporte a mi tarea investigadora.

Quisiera hacer una mención especial para mis **amigas** y compañeras: **Elena** y **Cristina** que me han apoyado siempre sin condicionamientos, y que en momentos de flaqueza me dieron la fuerza suficiente para continuar. Y para **Celia**, que aunque a muchos kilómetros de distancia, siempre se las ha ingeniado para estar "cerca" cuando mas la necesitaba.

Y por último un agradecimiento especial para las personas mas importantes en mi vida, mi familia ...

Mis **hermanos**, el pilar en los cuales me he apoyado y con los que siempre puedo contar. Ellos han creído en mí y han llenado mi vida de maravillosos momentos.

Mis **abuelos**, que con su ejemplo me han enseñado que nada en la vida se consigue sin un enorme esfuerzo.

Mis **padres**, quienes se sacrificaron por darme siempre lo mejor y a quienes les debo lo que soy. Me han formado como una persona de bien y me han sabido transmitir su "don de gente". Espero que estén orgullosos de mí. Pero quiero hacer una mención especial para mi mamá, que siempre está a mi lado para darme fuerzas, ayudarme, y aconsejarme. Ha dado todo en esta vida para que sus hijos sean felices, y en mi caso lo ha logrado y no quiero desaprovechar esta oportunidad para agradecersele como ella se lo merece.

A mis hijas, **Julieta** e **Inés** (habrá nacido ya al momento de defender la tesis?), porque me han hecho sentir una mujer plena y le dan sentido a mi vida. Sin sus abrazos, caricias y mimos, todo ésto hubiera sido imposible.

A mi esposo **Guillermo**, que es mi cómplice en toda esta aventura. Es él quien ha soportado momentos de desesperación y ha compartido también mis pequeños éxitos. Ha llenado mi vida de amor y me dá mucho mas de lo que merezco.

## INDICE

<b>Abreviaturas</b>	6
<b>I. Introduccion</b>	7
1. Leucemia linfática crónica: generalidades	8
2. Diagnóstico y Clasificación	9
2.1. Diagnóstico	9
2.2. Clasificación	10
3. Parámetros clínicos en la LLC-B	11
3.1. Morfología de las células leucémicas	11
3.2. Patrón de infiltración medular	11
3.3 Edad y sexo	12
3.4. Tiempo de duplicación linfocitario	12
4. Caracterización celular, moleclar y funcional de la LLC-B	13
4.1. Origen de la LLC-B	13
4.1.1. Biología de los linfocitos B normales	13
4.1.2. Célula precursora de la LLC-B	15
4.1.2.1. Células de LLC con IgV <sub>H</sub> no mutado	17
4.1.2.2. Células de LLC con IgV <sub>H</sub> mutado	17
4.2. Inmunofenotipo	20
4.3. Inmunoglobulinas de membrana e isotipos	22
4.4. Perfiles de expresión génica en LLC-B.	22
5. Factores pronóstico en LLC-B	24
5.1. Marcadores séricos	24
5.2. Estado mutacional del gen IgV <sub>H</sub>	24
5.3. Mutaciones somáticas en el gen BCL-6	27
5.4. Expresión de CD38	27
5.5. ZAP70	29
5.6. Anomalías cromosómicas	31
5.7. Longitud de telómeros y actividad telomerasa	33
5.8. Otros factores pronóstico en LLC-B	34
6. Competencia de la señalización BCR	34
6.1. Inducción de apoptosis por señales mediadas por BCR	38
7. Efectos del microambiente celular sobre las células de LLC-B	39
8. LLC-B patogénesis	40
9. Investigación translacional en LLC-B	42
9.1. Tratamientos	42
9.1.1. Agentes alquilantes	43
9.1.2. Análogos de purinas	43
9.1.3. Tratamientos combinados con análogos de purinas más agentes alquilantes.	44
9.1.4. Anticuerpos monoclonales	44
9.1.5. Quimioinmunoterapia	45
9.1.6. Tratamiento de la enfermedad residual	45
9.1.7. Transplante autólogo y alogénico	45
9.1.8. Nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la LLC-B	46
9.2. Investigación clínica futura en LLC-B	47
<b>II. Hipótesis y Objetivos</b>	49
1. Hipótesis	50

2. Objetivos	51
2.1. Objetivo principal	51
2.2. Objetivos secundarios	51
<b>III. Pacientes y Métodos</b>	<b>53</b>
1. Pacientes y muestras	54
2. Análisis mutacional de los genes IgV <sub>H</sub> y BCL-6	56
3. Determinación de ZAP70 por citometría de flujo	57
4. Cultivos celulares	58
5. Medición de apoptosis	58
6. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)	59
7. Extracción de ARN e hibridación con micromatrices de ADN	59
8. PCR a tiempo real	60
9. Análisis de datos de expresión	61
10. Análisis estadísticos	64
<b>IV. Resultados: Capítulo I - Ensayos funcionales en LLC-B</b>	<b>65</b>
1. Caracterización de las mutaciones de IgV <sub>H</sub> y BCL-6: correlación con expresión y función	66
1.1. Mutaciones en IgV <sub>H</sub>	66
1.2. Mutaciones en el gen BCL-6	67
1.3. Expresión del gen BCL-6. Correlación con las mutaciones	70
2. Ensayos funcionales en LLC-B: susceptibilidad a la apoptosis mediada por fármacos que afectan NFκB	72
2.1. Respuesta en el tiempo	72
2.2. Respuesta dosis dependiente	73
2.3. Dependencia de NFκB de los efectos de Btz	74
2.4. Papel de las caspasas en la inducción de apoptosis por Btz	75
2.5. Apoptosis inducida por Btz en función del estado mutacional de IgV <sub>H</sub> y BCL-6	77
3. Efectos del microambiente celular en la supervivencia de células de LLC-B: sistemas de cocultivo.	77
<b>V. Discusión : Capítulo I - Ensayos funcionales en LLC-B</b>	<b>81</b>
1. Caracterización de las mutaciones de IgV <sub>H</sub> y BCL-6: correlación con expresión y función	82
1.1. Mutaciones en IgV <sub>H</sub>	82
1.2. Mutaciones en el gen BCL-6	83
1.3. Expresión del gen BCL-6. Correlación con las mutaciones	84
2. Ensayos funcionales en LLC-B: susceptibilidad a la apoptosis mediada por fármacos que afectan NFκB.	86
3. Efectos del microambiente celular en la supervivencia de células de LLC-B: sistemas de cocultivo.	89
<b>VI. Resultados:Capítulo II - Estudio de perfiles de expresión génica en la LLC-B. Correlación con las mutaciones en genes IgV<sub>H</sub> y BCL-6</b>	<b>91</b>
1. LLC-B: Expresión génica diferencial y perfil funcional	92
1.1. Cluster jerárquico no-supervisado	92
1.2. Genes diferencialmente expresados y perfil funcional en LLC-B	93
2. Perfiles de expresión en subgrupos moleculares de LLC-B	94
2.1. Comparación G1+G2 vs.G3	94
2.2. Comparación G1 vs. G2	101
2.3. Comparación G1+G3 vs. G2	101

2.4. Comparación CD38+ vs. CD38-	101
2.5. Comparación ZAP70+ vs. ZAP70-	101
3. Validación de los datos de perfiles de expresión por PCR a tiempo real	104
<b>VII. Discusión Capítulo II - Estudio de perfiles de expresión génica en la LLC-B. Correlación con las mutaciones en genes IgV<sub>H</sub> y BCL-6</b>	107
1. LLC-B: Expresión génica diferencial y perfil funcional	108
2. Perfiles de expresión en subgrupos moleculares de LLC-B	109
2.1. Comparación G1+G2 vs. G3	109
2.2. Comparación G1 vs. G2	113
2.3. Comparación G1+G3 vs. G2	114
2.4. Comparación CD38+ vs. CD38-	114
2.5. Comparación ZAP70+ vs. ZAP70-	114
3. Validación de los datos de perfiles de expresión por PCR a tiempo real	114
<b>VIII. Resultados: Capítulo III - Marcadores de pronóstico en la LLC-B.</b>	117
1. Selección de marcadores potenciales en LLC-B: validación en un grupo muestral independiente	118
2. Correlación entre marcadores de pronóstico y estado mutacional del gen IgV <sub>H</sub>	118
3. Valor pronóstico de CRY1, LPL, BCL7A, ZAP70, CD82 y DUSP22	122
3.1. CRY1: Nuevo biomarcador en LLC-B? Correlación con la expresión de ZAP70 o LPL y estado mutacional de IgV <sub>H</sub>	126
<b>IX. Discusión: Capítulo III - Marcadores de pronóstico en la LLC-B.</b>	129
1. Selección de marcadores potenciales en LLC-B. Valor pronóstico de CRY1, LPL, BCL7A, ZAP70, CD82 y DUSP22	130
2. CRY1: Nuevo biomarcador en LLC-B?. Correlación con la expresión de ZAP70 o LPL y estado mutacional de IgV <sub>H</sub> .	132
<b>X. Conclusiones</b>	135
1. Estudios funcionales	136
2. LLC-B: firma molecular	136
3. Marcadores de pronóstico en la LLC-B	137
<b>XI. Publicaciones derivadas de la tesis</b>	139
<b>XII . Referencias bibliográficas</b>	141
<b>XIII. Notas</b>	155

## ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
AID	Activación de desaminasa de citidina inducida
BAY11	BAY 117082
BCR	Receptor de membrana de la célula B
BL	Linfoma de Burkitt
Btz	Bortezomib
CD	Determinante antigénico o de clase
CDR	Región determinante de complementariedad
CG	Centro germinal
CR	Remisión completa
CRY1	Criptocromo 1
CSR	Recombinación de cambio de clases
DLBCL	Linfoma difuso de células grandes
DUSP22	Fosfatasa dual 22
FDR	Cociente de falsos descubrimientos
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Linfoma folicular
GO	Gene Ontology
Hb	Hemoglobina
Ig	Inmunoglobulina
IgV <sub>H</sub>	Región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas.
KEGG	Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas
LDH	Lactato dehidrogenasa
LLC-B	Leucemia linfática crónica B
LPL	Lipoproteín lipasa
mAb	Anticuerpo monoclonal
MM	Mieloma múltiple
MZ	Zona marginal
OR	Respuesta global
OS	Supervivencia global
PBMC	Células mononucleadas de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PI	Ioduro de propidio
PR	Remisión parcial
RTqPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
SD	Desviación estándar
SEM	Error estándar de la media
SHM	Hipermutaciones somáticas
TDL	Tiempo de duplicación linfocitaria
ILT	Tiempo libre de tratamiento
V <sub>H</sub>	Cadena pesada de las inmunoglobulinas
V <sub>L</sub>	Cadena ligera de las inmunoglobulinas

## **I. INTRODUCCION**

## 1. LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B: GENERALIDADES

La leucemia linfática crónica B (LLC-B) ha sido considerada, tradicionalmente, como una enfermedad causada por la acumulación progresiva monoclonal de células B relativamente inmaduras, inmunológicamente incompetentes, con un fenotipo característico (coexpresión de CD5+ y CD19+) y que presentan fallo en su capacidad apoptótica. En cuanto al desarrollo de la enfermedad, se sabe que la clínica de los pacientes puede ser muy variada, encontrándose desde aquellos que progresan más rápidamente con enfermedad sintomática hasta otros con enfermedad indolente sin requerimiento de terapia.

A diferencia de otras enfermedades linfoproliferativas de células B, la patogénesis y las causas de ciertos comportamientos biológicos de la LLC-B aún necesitan una definición más precisa. La razón de esto puede estar en la falta de una anomalía citogenética que se relacione con esta leucemia, la incertidumbre que todavía existe sobre su origen celular y el grado variable de inmunocompetencia de las células leucémicas y de sus progenitores<sup>1</sup>. Sin embargo, hay evidencias que permiten ser optimistas en cuanto a que podremos lograr un conocimiento más profundo de la biología de esta patología.

Actualmente la LLC-B, se define como una proliferación de linfocitos B cuya característica inmunofenotípica más predominante es la expresión de marcadores comunes de células B: CD19, CD20, y CD23 con el antígeno CD5, en ausencia de otros marcadores pan-T, además de presentar niveles bajos de inmunoglobulinas en la superficie de sus membranas celulares. Además de estas características fenotípicas que pueden ser útiles para el diagnóstico de la enfermedad, se encuentra la baja expresión de CD79b y CD22<sup>2,3</sup>.

En cuanto a la biología de la LLC-B podemos actualmente describir un nuevo espectro de formas clínico- biológicas. El análisis de un segmento génico que codifica la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgV<sub>H</sub>), nos ha ayudado a redefinir y comprender algunos aspectos de esta enfermedad. En realidad, ahora se sabe que una gran parte de las células de LLC-B representan una expansión clonal de células B inmunocompetentes que han tenido contacto antigénico y que han alcanzado un estado avanzado de maduración. La visión actual de la enfermedad señala que la expansión de las células B es producto de un proceso dinámico en el cual la proliferación celular compensa en parte la pérdida de células causada por la

apoptosis. Para apoyar esto podemos señalar que en sangre periférica de pacientes con LLC-B existe prácticamente una ausencia virtual de células en ciclo celular, sin embargo pueden encontrarse áreas bien definidas de aparente proliferación en la médula ósea y nódulos linfáticos afectados de pacientes con LLC-B. Estos "centros de proliferación" contienen células más grandes, con cromatina nuclear menos condensada que expresan el marcador de ciclo celular Ki-67<sup>4</sup>, considerándose estas estructuras como los sitios primarios de proliferación clonal. Pero, el balance entre proliferación celular y apoptosis varía en diferentes subgrupos de la enfermedad, los cuales han sido definidos teniendo en cuenta características genotípicas basadas en los genes de inmunoglobulinas que permiten discriminar subgrupos de enfermos con evolución diferente, previamente definidos teniendo en cuenta criterios basados exclusivamente en la clínica<sup>1</sup>. Así, la descripción por Hamblin y *col*<sup>5</sup> del papel pronóstico del estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub> en las células de la LLC-B inició la distinción clara de dos grupos moleculares diferentes en cuanto a supervivencia y tiempo libre al tratamiento. De esta manera, se postula que, en las células de LLC con IgV<sub>H</sub> mutado, la célula B proliferante podría haber atravesado el centro germinal (CG), que es el sitio fisiológico en donde ocurren las hipermutaciones somáticas, mientras que en las LLC con genes IgV<sub>H</sub> no mutados, la células B malignas podrían derivar de una célula menos diferenciada, que no ha atravesado el CG (célula B *naive*)<sup>6</sup>. A pesar de que esta hipótesis ampliamente aceptada no logra explicar completamente las diferencias en el curso clínico encontrada entre pacientes con IgV<sub>H</sub> mutado y no mutado proporciona una explicación consistente con los conceptos actuales de desarrollo de la célula B<sup>7</sup> y es coincidente en muchos aspectos con los estudios más recientes de perfiles de expresión génica de casos de LLC-B y de subpoblaciones normales de células B.

## 2. DIAGNOSTICO y CLASIFICACION

### 2.1. DIAGNOSTICO

En la Tabla 1 se resumen los criterios diagnósticos adoptados por el National Cancer Institute (NCI)<sup>8</sup>, los definidos por el International Workshop on Chronic Lymphocytic Leucemia (IWCLL) de 1989, y los revisados por NCI en 1996 para estandarizar los distintos estudios sobre LLC<sup>9</sup>.

**TABLA 1.** Criterios utilizados en el diagnóstico de LLC-B

	<b>NCI, 1988</b>	<b>IWCLL, 1989</b>	<b>NCI, 1996</b>
<b>Nro de linfocitos</b>	> 5 x 10 <sup>9</sup> /l	> 10 x 10 <sup>9</sup> /l durante más de 4 semanas	5 x 10 <sup>9</sup> /l (Menos de 55% de células atípicas ej.: prolinfocitos)
<b>Infiltración Linf. Medular</b>	> 30%	> 30%	> 30% (no necesario)
<b>Fenotipo inmunológico</b>	Clonal (κ o λ)	Clonal(κ o λ)	CD19, CD20, CD23, CD5, Clonal (κ o λ)

## 2.2. CLASIFICACION

La LLC-B tiene un doble sistema de clasificación por estadios. Las clasificaciones de Rai<sup>10</sup> y Binet<sup>11</sup> son útiles en esta enfermedad como herramientas para predecir el pronóstico y para el establecimiento de indicaciones terapéuticas. Estos sistemas también son utilizados para la estadificación de los pacientes en función de los resultados terapéuticos alcanzados en los diferentes protocolos de tratamiento. En las Tablas 2 y 3 se muestran los criterios de cada una de ellas.

La clasificación de Binet integra el número de grupos ganglionares implicados en la enfermedad, con la insuficiencia de médula ósea. Su principal aportación deriva del reconocimiento de una forma predominantemente esplénica de la enfermedad, la cual puede tener un mejor pronóstico que en la clasificación Rai, y del reconocimiento que la presencia de anemia y/o trombocitopenia tienen un pronóstico similar y no requiere un estadio distinto. Ninguno de los sistemas separa las causas inmunes de las causas no inmunes de la citopenia. Pacientes con trombocitopenia, anemia o ambos, como resultado de infiltración de la médula ósea y producción deficiente (Rai III/ IV, Binet C) tienen un pronóstico más precario que los pacientes con citopenias inmunes<sup>2</sup>. El IWCLL ha recomendado la integración de las clasificaciones de Rai y Binet de la siguiente manera: A(0), A(I), A(II); B(I), B(II); y C(III), C(IV)<sup>3</sup>.

**TABLA 2.** Sistema de estadificación de Rai <sup>10</sup>

<b>Estadio 0:</b> Linfocitosis en sangre periférica y médula ósea.
<b>Estadio I:</b> Linfocitosis y adenopatías.
<b>Estadio II:</b> Linfocitosis con esplenomegalia y/o hepatomegalia, con/ sin adenopatías.
<b>Estadio III:</b> Linfocitosis y anemia, Hemoglobina (Hb) < 11,0 g/dL, con/ sin adenopatías u organomegalias.
<b>Estadio IV:</b> Linfocitosis y plaquetopenia, menos de 100 x 10 <sup>9</sup> /L plaquetas con/ sin adenopatías, organomegalias y anemia.

**TABLA 3.** Sistema de estadificación de Binet <sup>11</sup>

<b>Estadio A:</b> Hasta 2 áreas ganglionares afectadas* sin anemia ni trombocitopenia. ( Hb $\geq$ 10 g/dL, plaquetas $\geq$ 100 x 10 <sup>9</sup> /L)
<b>Estadio B:</b> Tres o más áreas ganglionares afectadas* sin anemia ni trombocitopenia. Hb $\geq$ 10 g/dL, plaquetas $\geq$ 100 x 10 <sup>9</sup> /L
<b>Estadio C:</b> Anemia ( Hb < 10 g/dL) o trombocitopenia (plaquetas < 100 x 10 <sup>9</sup> /L)

(\*) Áreas ganglionares: cervical, axilar e inguinal (uni o bilateral), esplenomegalia o hepatomegalia.

### 3. PARAMETROS CLINICOS EN LLC-B:

El examen morfológico de la sangre periférica, unido a los marcadores inmunológicos, los datos moleculares y de citogenética, constituyen los pilares fundamentales para el diagnóstico preciso de la LLC y se erigen como elementos importantes con valor pronóstico.

#### 3.1. MORFOLOGIA DE LAS CELULAS LEUCEMICAS

En base a la morfología de los linfocitos de sangre periférica, las LLC-B se pueden clasificar en:

- **LLC típica:** En esta forma, más del 90% de linfocitos circulantes son pequeños de apariencia madura, con cromatina condensada y nucleolo pequeño o no visible.

- **LLC atípicas:** Deben presentar más del 10% de células con morfología atípica. Las células atípicas se definen de varias maneras: prolinfocitos, células linfoplasmocitoides o parainmunoblastos. Estas células en general, exhiben más nucleolos y tienen una cromatina menos densa que las células B típicas<sup>12</sup>. Pueden aparecer en un 15% de los pacientes al diagnóstico o durante el curso de la enfermedad, y en general se relacionan con un peor curso clínico de la enfermedad.

#### 3.2. PATRON DE INFILTRACIÓN MEDULAR

Los patrones histológicos de infiltración medular en LLC-B caen dentro de tres categorías muy amplias y que a veces se solapan: nodular, intersticial y difuso. En general, la presencia de un patrón difuso se correlaciona con un peor curso clínico de la enfermedad, y una supervivencia entre 2 y 4 años, mientras que en los casos con un patrón no difuso (nodular, intersticial o mixto), la supervivencia varía entre 8 a 11 años<sup>13,14</sup>. El patrón difuso generalmente se correlaciona con un estadio clínico avanzado y

cuando se observa en un estadio clínico precoz, se considera un indicador de rápida progresión.

### **3.3. EDAD y SEXO**

La LLC-B se presenta generalmente en edad avanzada. Sin embargo, un tercio de los casos se presentan en pacientes con menos de 60 años, y entre un 10-15% en pacientes menores de 50 años<sup>15</sup>. El riesgo de desarrollar LLC-B aumenta progresivamente con la edad.

La LLC-B es más frecuente en hombres que en mujeres (1.5 : 1.0, según Mauro y *col<sup>4</sup>*) y desarrollan la enfermedad a edad más temprana<sup>16</sup>. Como grupo, los varones, generalmente presentan una enfermedad más agresiva<sup>17</sup>, lo cual es consistente con la observación que sus clones caen más frecuentemente en la categoría con genes de IgV<sub>H</sub> no-mutados<sup>18</sup> (de peor pronóstico clínico) y con perfiles de expresión génica característicos de este subgrupo<sup>19</sup>.

### **3.4. TIEMPO DE DUPLICACIÓN LINFOCITARIO**

Durante mucho tiempo, la LLC ha sido considerada una enfermedad en la cual existe una acumulación de células B debido a un fallo en los mecanismos de apoptosis en estas células causado por un defecto genético, con mínima proliferación del clon leucémico. Pero desde hace tiempo se sabe que aquellos pacientes en los que su número absoluto de linfocitos se duplica en menos de un año generalmente tienen un curso clínico peor que aquellos que tienen una acumulación más lenta, incluso en estadios tempranos de la enfermedad<sup>20</sup>. Apoyando esta observación, estudios recientes, usando mediciones más sofisticadas sugieren que la caracterización inicial de la biología de la LLC-B necesita ser reevaluada. Usando un ensayo de marcaje *in vivo*, ha sido posible evaluar la velocidad de proliferación de las células de LLC-B, y se ha documentado que una pequeña fracción del clon leucémico (aproximadamente 0.1 – 1.78%) se encuentra dividiéndose de manera activa, lo que generaría aproximadamente entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{12}$  nuevas células por día en los pacientes estudiados. Con estos valores, es posible calcular una tasa de muerte de entre 0 y  $1 \times 10^{12}$  células leucémicas por día por paciente. Por lo tanto, hay una dinámica entre muerte y división celular similar a la que ocurre en otros tipos de leucemias y linfomas. Por lo tanto, la LLC-B es una enfermedad tanto de proliferación como de acumulación de células B, en la cual podemos decir que existe un balance homeostático en aquellos pacientes con un conteo linfocitario estable, mientras que existe un desbalance en este

proceso en pacientes cuyo número de linfocitos aumenta de manera sostenida, duplicándose en menos de un año, y generando así una enfermedad más agresiva<sup>21</sup>.

## **4. CARACTERIZACION CELULAR, MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA LLC-B**

### **4.1. ORIGEN DE LA LLC-B.**

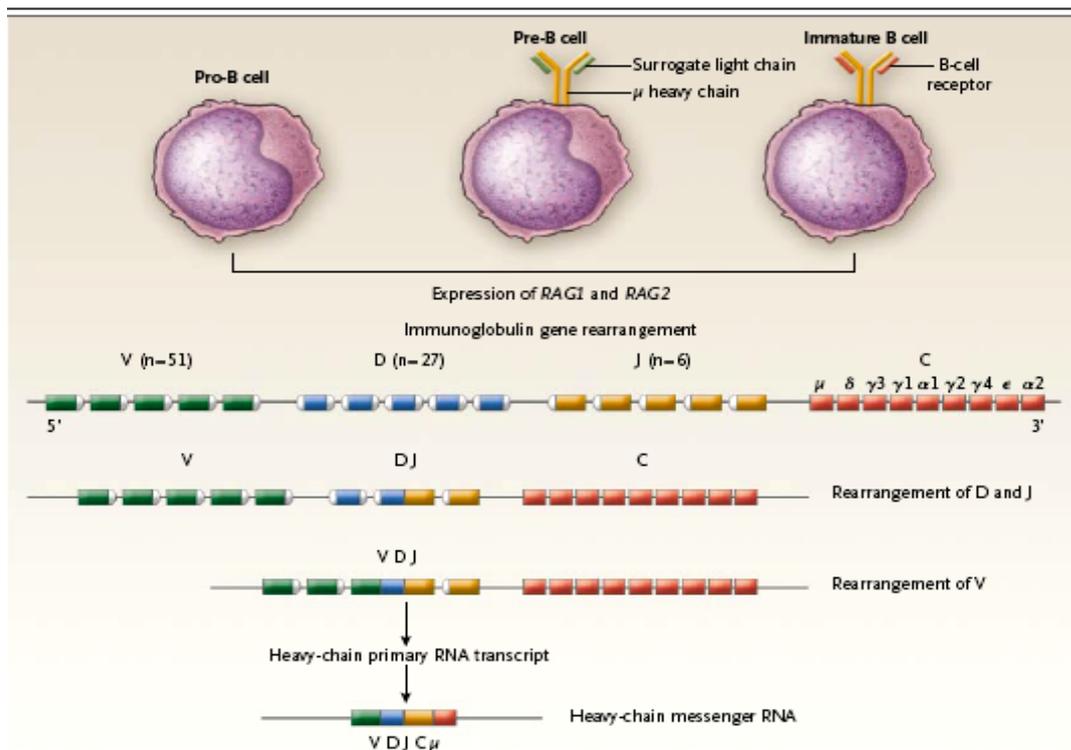
#### **4.1.1. Biología de los Linfocitos B Normales**

Las células B forman parte del sistema inmune adaptativo y se desarrollan en la médula ósea pasando por diferentes etapas de maduración (ver Figura 1), cada una de ellas caracterizada por el estado de recombinación de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas y de la expresión de ciertos marcadores de superficie<sup>22</sup>. Así, podemos señalar que las células B en estadios muy tempranos de maduración en médula ósea, pueden diferenciarse por su expresión de antígenos CD10+, CD19+ y CD34+. Estas células expresan, en el espacio intracelular, TdT y RAG-1/-2 y el marcador subrogante del componente de la cadena ligera del receptor de membrana de la célula B (BCR). A nivel de reorganizaciones génicas, el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas  $\mu$  ya ha sufrido los reordenamientos  $D_HJ_H$ . El siguiente escalón en la maduración de las células B es la incorporación de CD10+, CD19+ y CD34-, además es positivo para la cadena ligera subrogante y no expresa RAG -1/-2. El gen de IgH ya ha sufrido reordenamientos  $V_HD_HJ_H$ . Subsecuentemente, la célula pierde la expresión del receptor pre-B y pasa a ser CD19+, CD34- y subrogante de cadena ligera negativo. Luego estas mismas células aumentan la expresión de RAG-1/-2 e inician el proceso de rearrreglos en el gen de cadenas ligeras de inmunoglobulinas<sup>23</sup>.

Cuando un antígeno de afinidad adecuada se une al BCR, la célula ingresa al CG en los folículos linfoides, donde se divide rápidamente y sus genes de inmunoglobulinas sufren un proceso de hipermutación somática (SHM)<sup>24</sup> (ver Figura 1). Este proceso específicamente afecta a los genes  $V_H$  y  $V_L$  y consiste en mutaciones del ADN que ocurren con frecuencias millones de veces superior que la frecuencia de mutaciones en el resto del genoma. A través de estas mutaciones, los receptores de las células B descendientes, llamados centrocitos, adquieren nuevas propiedades. Se ha dicho que el CG favorece el encuentro de la célula B con el antígeno, permitiendo la selección positiva después de varias series de mutación/ selección de aquel BCR formado por cadenas de inmunoglobulinas con afinidad hasta 100 veces superior que

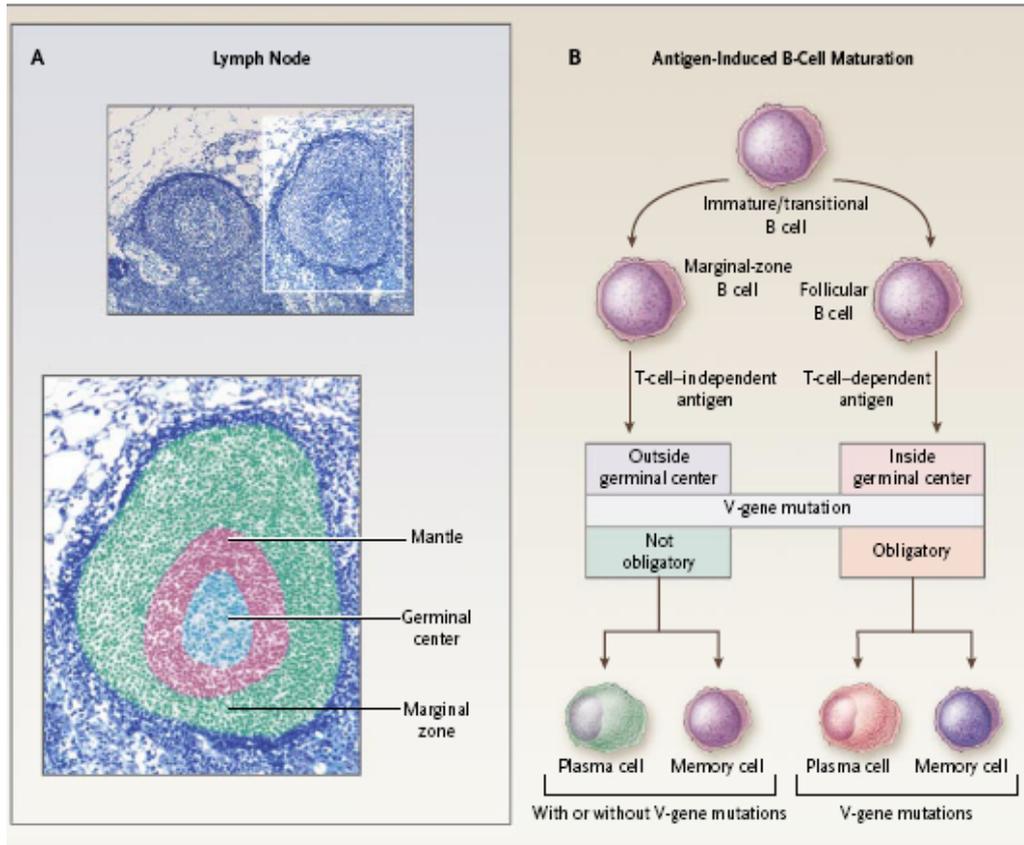
el correspondiente no mutado mientras que los centrocitos con receptores que han perdido la capacidad de unión al antígeno o que unen autoantígenos son normalmente eliminados<sup>24</sup>. Este proceso de estimulación y selección usualmente requiere la competencia de linfocitos T. Sin embargo, el proceso también puede ocurrir en algunos casos sin células T y fuera de los centros germinales (Figura 2), en la zona marginal (MZ) alrededor de los folículos linfoides, con frecuencia en respuesta a carbohidratos de bacterias encapsuladas o virus. Ambos procesos culminan con el desarrollo de células plasmáticas o células B de memoria (células que han tenido contacto con antígeno, o células experimentadas).

**FIGURA 1:** Desarrollo de Linfocitos B normales.



La unidad genética codificada por las regiones variables (V) de las cadenas pesada (H) y ligera (L) de las inmunoglobulinas sufre reordenamientos en un proceso que ocurre en varias etapas. Inicialmente, 1 de los 27 segmentos D se une a uno de los 6 genes  $J_H$  en las células pro-B. Luego, 1 de los 51 segmentos  $V_H$  forma la unidad  $DJ_H$  en las células pre-B. En este momento, las pseudo-cadenas L monomórficas ( $V_{preB} + \lambda.5$ ) también son sintetizadas permitiendo la expresión de superficie del complejo  $V_H DJ_H - \mu + V_{preB} - \lambda.5$  (receptor de célula pre-B). Eventos similares de recombinación ocurren en el locus de la cadena L en las células pre-B, pero solo involucran dos segmentos génicos ( $V_L$  y  $J_L$ ). Los genes activantes de recombinasa RAG-1 y RAG-2 son esenciales para que ocurran estos eventos moleculares. Además, la enzima deoxitransferasa terminal puede introducir nucleótidos adicionales en las uniones  $D-J_H$  y  $V_H-DJ_H$  incrementando la diversidad de las regiones V de las células B en desarrollo. Cada célula B utiliza un único set de reordenamientos  $V_H DJ_H$  y  $V_L J_L$  para crear su sitio de unión al antígeno manteniendo una única estructura BCR que identifica y es característica de cada clon de linfocitos B. Cada uno de estos reordenamientos debe llevar a la formación de genes recombinados que codifiquen a una molécula de inmunoglobulina intacta para permitir que la célula progrese hacia la siguiente etapa de desarrollo. Imagen extraída de Chiorazzi *et al*, 2005<sup>24</sup>.

**FIGURA 2:** Comparación de las vías de maduración de las células B de acuerdo a su dependencia de células T<sup>24</sup>.



En el panel **A**, un folículo de un nódulo linfático, consistente en un centro germinal y un manto folicular, alrededor pueden verse las células que forman la zona marginal extrafolicular. En el panel **B**, células B maduras, en los tejidos linfoides periféricos pueden seguir dos vías de maduración. La respuesta de células B foliculares a antígenos requiere la ayuda de células T, mientras que en la zona marginal las células B responden a antígenos sin la participación de las células T. La estimulación antigénica T-dependiente invariablemente induce mutaciones en el gen IgV en las células B foliculares. La estimulación antigénica T-independiente puede o no inducir mutaciones en IgV en las células B de la zona marginal. Las mutaciones en IgV ocurren en las células B foliculares dentro del CG, mientras que en la zona marginal las mutaciones en IgV se dan fuera de las estructuras típicas del CG. Ambas vías (T dependiente e independiente) conducen a células plasmáticas o células B de memoria. Las células B de memoria sin mutaciones en IgV que derivan de la estimulación T-independiente son también referenciadas como células B con experiencia antigénica, para distinguirlas de aquellas células de memoria con mutaciones somáticas. Imagen extraída de Chiorazzi *et al*, 2005<sup>24</sup>.

#### 4.1.2. CELULA PRECURSORA DE LA LLC-B

Durante mucho tiempo, la LLC-B se describió como una enfermedad producida por la transformación maligna de células B CD5+, las cuales corresponden a un grupo muy minoritario de las células B normales en ratones y humanos. Cuando se estudiaron mediante diferentes técnicas estas células CD5+, se demostró que la mayoría de las células B CD5+, en todas las edades, expresan genes de IgV<sub>H</sub> no mutados (similar a lo encontrado en ratones). Por lo tanto, cuando se analizan las células de LLC-B y se

encuentra que pueden tener genes de IgV<sub>H</sub> mutados o no, este modelo que propone a la célula B CD5+ como precursor de la LLC-B debe asumir que las células de LLC-B con IgV<sub>H</sub> mutado deriva de una célula CD5+ que, en muy raras circunstancias, prolifera y muta su gen IgV<sub>H</sub> durante su paso por el CG, siendo este hecho poco probable.

La comparación de los datos de perfiles de expresión génica de células de LLC-B con las firmas moleculares de diferentes subgrupos de células B, revelan que el perfil de la LLC-B, independientemente del nivel de mutación del gen IgV<sub>H</sub>, estaba muy relacionado con el de células de amígdala CD27+ (memoria). Sin embargo, un análisis más detallado de esta subpoblación celular señala que esta fracción comprende un grupo heterogéneo de células. Varios estudios bien documentados sugieren que la población CD27+ comprende las células B de memoria "clásicas", generadas en la reacción que ocurre en el CG, pero también incluye células que han tenido contacto con antígenos, pero dichos antígenos son T-independientes, y quizá también incluya a un subgrupo mutado somáticamente pero generado de manera antígeno y T-independiente<sup>25,26</sup>.

Por otra parte, también se ha analizado el repertorio de BCR en LLC-B en una gran cantidad de pacientes y se han encontrado diferencias con el repertorio de las células B normales o en los grupos de células B CD5+, otra evidencia que señala que las células de LLC-B no derivarían de la transformación de células B CD5+. Estos hechos conducen más bien a señalar una implicación directa de la estimulación y la selección en el origen de la célula de LLC-B<sup>1</sup>.

En cuanto a los genes de IgV<sub>H</sub>, se ha demostrado que existe un uso desbalanceado de ciertos genes de V<sub>H</sub>. Por ejemplo, los genes VH3-07, VH1-69 y VH4-34 se encuentran más frecuentemente en LLC-B que en la población general de células B normales o CD5+. El gen VH3-07 se encuentra más frecuentemente en células mutadas, mientras que VH1-69 en la mayoría de los casos se encuentra en células no mutadas. Para VH4-34 la distribución se reparte entre las dos formas<sup>1,27,28</sup>.

Dado que el repertorio de BCR es diferente entre células de LLC-B y células normales, la pregunta que surge es como se produce la selección de ese repertorio y si es posible que operen diferentes mecanismos en los casos mutados y en los no mutados.

Para la explicación del origen de las células de LLC-B en realidad hay varios escenarios posibles los cuales no son mutuamente excluyentes. En la Figura 1 se proponen dos modelos de la derivación celular en LLC-B

#### 4.1.2.1. Células de LLC-B con IgV<sub>H</sub> no mutado:

Como se señaló anteriormente, el proceso de hipermutaciones somáticas en los genes de las inmunoglobulinas implica algún grado de estimulación/ selección por lo que se debe buscar una explicación al origen de las LLC-B con IgV<sub>H</sub> no mutado.

Un modelo explica el origen de las células de LLC-B con IgV<sub>H</sub> no mutado como derivadas de células que residen en la MZ y allí reciben estimulación antigénica. Por lo tanto, es probable que las células madre que originan este tipo de leucemias B provengan de la proliferación de células vírgenes o células que hayan sufrido estimulación fuera del CG por antígenos T-independientes (como es el caso de los polisacáridos o lipopolisacáridos), los cuales inducen dicha proliferación sin acumulación de mutaciones en el gen de las inmunoglobulinas (Figura 3 , Modelo A).

Así, un BCR poliespecífico sería la primera línea de defensa contra patógenos. Se ha visto que el BCR de algunas LLC-B presenta reminiscencias estructurales de anticuerpos que han reaccionado contra polisacáridos capsulares de antígenos bacterianos<sup>1,29</sup>. Esto, unido a las observaciones en ratones en los que las células de la MZ median la respuesta de antígenos T- independientes, sugiere que las células progenitoras podrían derivar de este conjunto. En principio la formación del repertorio BCR y la transformación maligna pueden ocurrir conjunta o secuencialmente. La transformación también puede comenzar cuando la célula está siendo estimulada o una célula con un BCR determinado puede transformarse con posterioridad. Esto no está claro, pero lo que sí parece ser posible, es que en algunas células de LLC-B la estimulación antigénica continúe durante la transformación<sup>27,30</sup>.

En general, la hipótesis del origen celular pre-CG de las células no mutadas es factible, y está de acuerdo con muchos de los datos disponibles actualmente, pero no logra explicar porqué los perfiles de expresión de células de LLC-B mutadas y no-mutadas han mostrado solo pequeñas diferencias entre sí<sup>31,32</sup>, a pesar de sus presuntos programas funcionales y orígenes celulares diferentes.

Para explicar este hecho, surge otra aproximación que señala que tanto las LLC mutadas como no-mutadas derivan de un subgrupo de células de la MZ (IgM+,IgD<sub>low</sub>) que son estimuladas de forma T-independiente y que pueden en este caso no desarrollar hipermutaciones somáticas (Figura 3, Modelo B)<sup>1</sup>.

#### 4.1.2.2. Células de LLC-B con IgV<sub>H</sub> mutado:

Como señaláramos antes, la derivación de las células de LLC-B mutadas, puede explicarse mediante varios escenarios posibles.

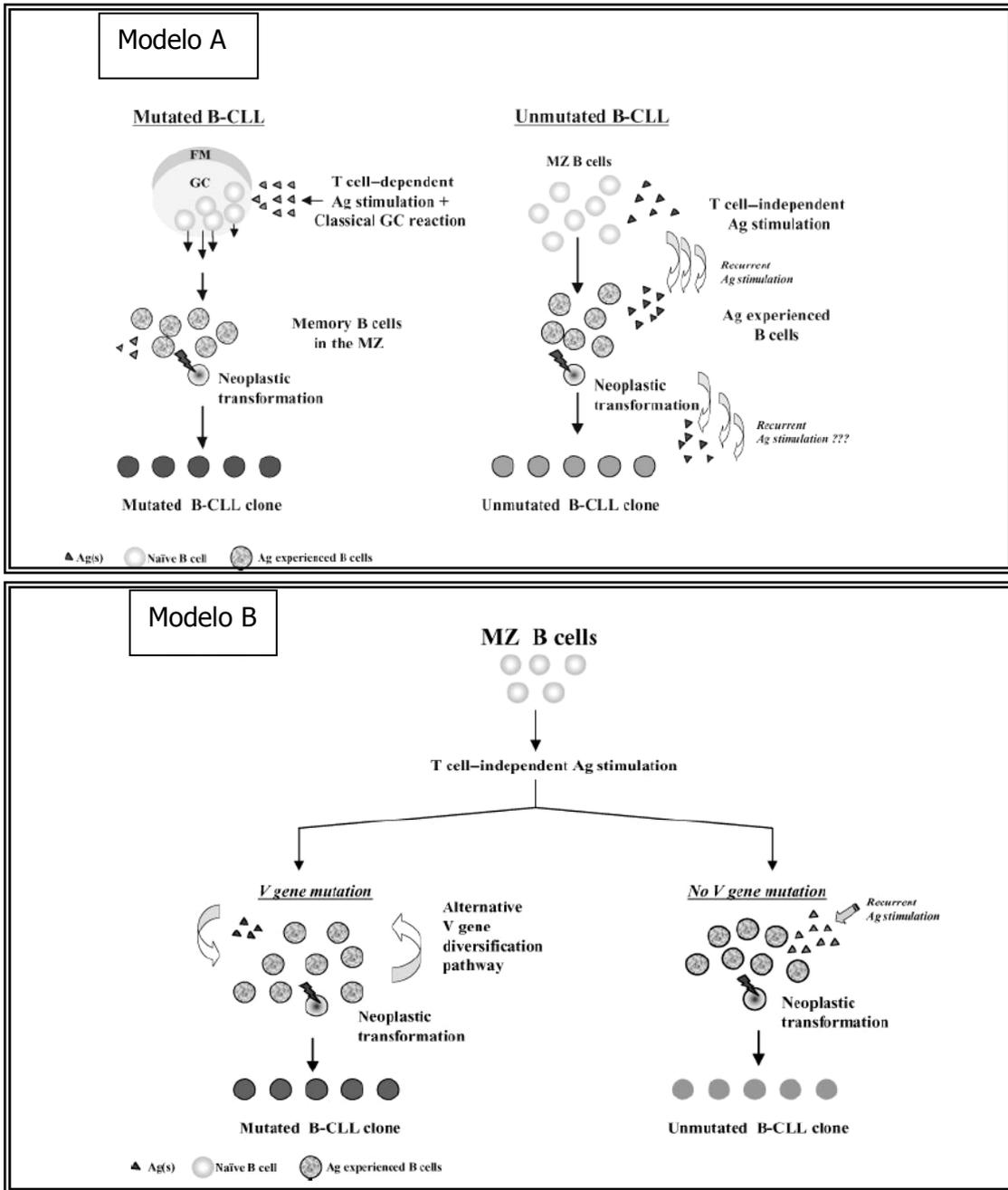
Dalla-Favera y su grupo proponen un modelo, en el cual las células mutadas se originan de las células B memoria que han abandonado el CG, dado que la presencia de mutaciones es un marcador de células B post-CG. Por otro lado, el patrón de mutaciones y particularmente la relación y localización de mutaciones de reemplazo y silentes es consistente con la selección de antígeno<sup>32</sup>. Las células de LLC-B no muestran, en general, mutaciones progresivas como en el caso del Linfoma Folicular, en el que todas las transformaciones ocurren en el CG y sus células muestran un proceso muy activo de diversificación de genes IgV<sub>H</sub>. Además, las células de LLC-B mutadas también presentan mutaciones en el gen BCL-6, como la mayoría de células B post-CG<sup>33,34</sup> (Figura 3, Modelo A). Este modelo plantea ciertas discrepancias, como por ejemplo que en la mayoría de las células B post-CG el isotipo predominante es IgG, mientras que las células de LLC-B expresan en su mayoría IgM e IgD.

Otro escenario plantea la posibilidad que tanto las células mutadas como no-mutadas derivan de una célula B de la MZ IgM<sup>+</sup> IgD<sub>low</sub> (Figura 3, Modelo B). Estas células responden a antígenos T-independientes y pueden tener IgV<sub>H</sub> mutado o no-mutado. Hay evidencias, aunque indirectas, de que estas células pueden ser estimuladas por bacterias, antígenos virales o antígenos propios dentro de la MZ y acumular mutaciones fuera del CG<sup>1</sup>. Además, en este caso, las células de LLC-B mutadas y no-mutadas derivarían de la misma célula, aunque quizás en diferentes estadios de maduración, lo cual estaría en concordancia con los estudios de perfiles de expresión similar entre ambos grupos<sup>31,32</sup>.

Existe en realidad, un tercer escenario, que es una variante del segundo, y es que siguiendo a la estimulación por un antígeno T independiente las células de la MZ fueran a los órganos linfoides y ayudaran a crear los CG donde se produce el proceso de mutación, como sucede en ratones. En este modelo la transformación podría ocurrir después de la salida de las células del CG.

En estos últimos modelos propuestos, si los progenitores son células B de la MZ IgM<sup>+</sup> IgD<sub>low</sub>, el proceso de activación al que son expuestas las células de LLC, tanto por estimulación por antígenos propios y/o transformación leucémica, podrían inducir a la aparición de nuevos marcadores de superficie. Así, la activación de células quiescentes de la MZ induce la expresión de moléculas de activación como CD5, CD23 y CD38.

**FIGURA 3.:** Modelos para explicar el origen de la LLC-B a partir de diferentes tipos celulares y/o distintas vías de diferenciación <sup>1</sup>.



**Modelo A:** sugiere que las células de LLC mutadas derivan de una célula B estimulada por un antígeno T-dependiente que conduce a la célula hacia la clásica reacción de CG. Las células no-mutadas derivan de una célula de la MZ que sufren un proceso T-independiente que no dispara la respuesta de linfocitos T helper y no produce hipermutaciones somáticas.

**Modelo B:** Sugiere que las células de LLC-B mutadas o no-mutadas derivan de un subgrupo de células de la MZ (IgM+, IgD<sub>low</sub>) que son estimuladas de forma T-independiente y que pueden o no desarrollar hipermutaciones somáticas. Aquellas células B que desarrollan mutaciones somáticas lo hacen de forma T-independiente. Los datos actuales no descartan un modelo híbrido en el cual las células de LLC-B pueden derivar de células y vías de diferenciación de ambos modelos.

Imágenes adaptadas de Chiorazzi *et al*, 2003 <sup>1</sup>.

## 4.2. INMUNOFENOTIPO

Las células de LLC son linfocitos B que tienen un inmunofenotipo definido por 3 características principales: (1) comparten antígenos B (expresión de los antígenos CD19, CD20, CD22 y reactividad habitual con CD23) con fuerte positividad del antígeno T CD5 en ausencia de otros marcadores T; (2) expresan sólo una cadena ligera de las inmunoglobulinas ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) y (3) tienen una baja densidad de inmunoglobulinas de superficie (SIg). Estos elementos son adecuados para un diagnóstico preciso de la LLC y muy importantes para establecer el diagnóstico diferencial con otros síndromes linfoproliferativos (SLP) crónicos. En la mayor parte de los casos, expresan IgM de superficie con o sin IgD, raramente expresan IgG o IgA, o pueden expresar alteraciones tipo talasémicas de las SIg<sup>29,35</sup>. Además de los bajos niveles de SIg, en las LLCs también existe baja expresión de CD79a y CD79b, que representan las moléculas accesorias del complejo constituido por el receptor inmunoglobulínico<sup>36</sup>. Prácticamente en todos los casos se encuentra inmunoglobulina citoplasmática, incluyendo aquéllos que no expresan SIg.

Se ha señalado que casi todas las LLC expresan los antígenos CD5, DR, CD19, CD20 (a baja densidad), CD24, CD27, CD37, CD39, CD40, CD44, CD45RA, CDw75; muchas expresan también CD18, CD21 y CD23. Un número menor de casos expresan otros antígenos B. Los linfocitos de la LLC-B pueden en algunos casos coexpresar antígenos mielomonocíticos (CD11, CD13, CD14, CD15, CD33), y en pocas ocasiones algunos antígenos T asociados (CD1, CD2, CD3, CD4, CD8)<sup>37</sup>.

En líneas generales, podemos decir que los linfocitos B (CD19+) de la LLC expresan débilmente en su superficie SIg, CD22 y CD79b o los dos últimos marcadores son negativos, son positivos para CD5 y CD23 en el 95% de los pacientes y FMC7 es, por lo general, negativo<sup>37</sup>.

Como consecuencia de la importancia del fenotipo inmunológico en el diagnóstico de los SLP-B, Matutes y col<sup>37</sup> elaboraron un sistema de puntuación basado en la detección de cinco antígenos (Ag) de superficie (CD5, CD22, CD23, FMC7 y SIg). Unos años más tarde, el mismo grupo modificó este sistema de puntuación con el agregado de CD79b al panel en sustitución de CD22<sup>38</sup>. Este cambio aumentó significativamente el potencial para discriminar entre LLC-B y otros SLP-B. Este sistema asigna 1 punto cuando el resultado del marcador es típico de la LLC y 0 puntos cuando no lo es. La mayor parte de las LLC alcanzan una puntuación de 3 a 5, mientras que los otros síndromes linfoproliferativos crónicos varían entre 0 y 2. No se constatan diferencias significativas en cuanto al inmunofenotipo entre las LLC típicas y atípicas excepto por

una expresión más intensa de CD79b en las formas atípicas<sup>39</sup>. De hecho para definir una LLC-B atípica es importante disponer de la información del inmunofenotipo y constatar que es el de LLC con "scores" de 3 a 5 ya que una morfología y un inmunofenotipo atípicos sugieren con mayor posibilidad otro SLP de células B.

Se ha indicado que las alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión influyen en los patrones de localización y diseminación hemoperiférica de los síndromes linfoproliferativos crónicos, por lo que su caracterización en los clones neoplásicos puede contribuir al diagnóstico y pronóstico de estos procesos. En diferentes síndromes linfoproliferativos se han observado alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión. Sin embargo, la presencia de diferentes patrones de expresión en varias muestras del mismo paciente, indica que la variabilidad entre las muestras puede depender de la etapa de maduración y activación, y aún de la función que desempeña determinada molécula de adhesión, lo que sugiere que el grado de expresión de estas moléculas en una determinada muestra está en dependencia del estado en que las células se encuentren en ese preciso momento. El análisis de la expresión de diferentes moléculas de adhesión, que incluía las familias de las integrinas, selectinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas, en varios síndromes linfoproliferativos crónicos de tipo B reveló que en la LLC las células expresaban una intensidad muy tenue de todas las integrinas  $\beta$ , en comparación con los controles y con otros procesos linfoproliferativos<sup>40</sup>. Las integrinas  $\beta_{B_1}$ , tanto CD49d como CD29 se expresaban muy débilmente, pero se observó que la CD49d aumentaba según se incrementaba la masa tumoral, aunque su expresión se mantenía por debajo de la de los linfocitos normales, mientras que la de CD29 era significativamente mayor en los pacientes con esplenomegalia. El análisis de las integrinas  $\beta_2$  mostró que había una expresión muy baja de CD11a/CD18, así como de CD11b. Sin embargo, la CD11c se expresaba fuertemente y la expresión de CD11a era mayor en las etapas avanzadas de la LLC. El determinante CD54, que es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y representa al ligando de CD11a/CD18, sólo se manifestó en menos del 20 % de las células, aunque su expresión parece ser mayor en los estadios más avanzados de la enfermedad. De las selectinas estudiadas, la representada por CD62L estaba disminuida y la expresión de CD44 era similar a la de los linfocitos normales y a la de las células de otros síndromes linfoproliferativos. De acuerdo con estos datos, la LLC se podría caracterizar por la baja expresión de las integrinas  $\beta_1$ - $\beta_2$ , la correlación positiva que parece existir entre la intensidad de la expresión de CD49d/CD29, CD11a y CD54 y el volumen de la masa tumoral, mientras que la expresión de CD29 parece

ser mayor en los pacientes con esplenomegalia. La baja expresión de CD11a/CD18 en la LLC podría contribuir al diagnóstico diferencial con el linfoma linfocítico de células pequeñas que siempre es positivo para este marcador<sup>40</sup>.

El CD38 puede ser incluido en el inmunofenotipo, aunque en realidad también es considerado un biomarcador con valor pronóstico. En diferentes estudios se ha encontrado correlación entre los valores de expresión de CD38 como así también su intensidad de fluorescencia con el pronóstico de las LLCs<sup>18</sup>. Para utilizarlo como factor pronóstico se le han asignado diferentes valores de corte (7%, 20% y 30%,), aunque actualmente el valor más generalmente aceptado es el de 20%. Su expresión varía con el curso de la enfermedad y aunque muestra correlación con las mutaciones en el gen  $IgV_H$ , constituyen factores pronóstico independientes<sup>41</sup>.

#### **4.3. INMUNOGLOBULINAS DE MEMBRANA E ISOTIPOS**

Las células de LLC-B han sido clásicamente descritas como células con bajo nivel de expresión de Ig de superficie (BCR) en comparación con las células B normales. Esto ha sido interpretado como que son células que derivan de linfocitos B previamente estimulados. Durante o después de la transformación leucémica, algunos clones pueden convertirse en anérgicos, es decir que pierdan la capacidad de responder a estímulos externos, mientras que otros pueden continuar siendo efectivamente estimulados a través de sus BCRs<sup>1,42</sup>.

Las células de la mayoría de las LLC-B (90-95%) co-expresan IgM e IgD en relaciones que varían entre pacientes. Además, ciertos casos pueden presentar cambios de isotipo a IgG o IgA, siendo los casos IgG+ más comunes (primariamente expresan IgG1 e IgG3), por lo que el tipo de inmunoglobulina desplegada en la superficie celular puede servir como un marcador de subgrupo. Esto puede tener valor clínico dado que la mayoría de las células que no expresan IgM en su superficie son portadoras de genes de  $IgV_H$  mutados por lo que tienen un mejor pronóstico clínico, a pesar de algunas excepciones<sup>18,29</sup>.

#### **4.4. PERFILES DE EXPRESION GENICA EN LLC-B**

Con el advenimiento de la tecnología de micromatrices de ADN, ha sido posible generar perfiles de expresión génica de diferentes poblaciones celulares. Estos "chips" son capaces de albergar más de 1.000.000 de oligonucleótidos de entre 20 y 25 bases sobre una superficie de 1.20 x 1.20 cm. En general, en el diseño de los micromatrices de ADN se tiene en cuenta que por cada oligonucleótido, que debe tener una

hibridación perfecta con la secuencia blanco, se debe colocar al menos otro con 1bp no apareada ("mismatch") en una posición central, lo que servirá como control interno para asegurar la especificidad de la hibridación en cada punto de la matriz. En la actualidad los "chips" comerciales cuentan con 10 o más pares de oligonucleótidos para investigar cada transcritto, por lo que la densidad de las micromatrices ha ido aumentando en los últimos años haciendo que la tecnología permita "imprimir" cada vez un mayor número de sondas en una superficie cada vez más pequeña. Esto a su vez genera un número de datos enorme que hace que el análisis de los mismos se convierta en un procedimiento bastante complejo. En primer lugar, los datos deben ser normalizados contrastándolos entre ellos para corregir las diferencias sistemáticas en intensidad de fluorescencia. Luego, los valores de fluorescencia deben ser "traducidos" a valores numéricos de expresión génica, este paso también incluye alguna medida de corrección del "ruido" de fondo. Finalmente se deben aplicar pruebas estadísticas que generarán listas de genes que son expresados diferencialmente entre las poblaciones celulares estudiadas, y estas listas deberán ser interpretadas en el contexto biológico en el cual deben situarse. Cabe señalar que en cada uno de estos pasos se han propuesto diferentes métodos para hacerlo (normalización, análisis estadístico, corrección del ruido, incluso en la manera de traducir los valores de fluorescencia en datos de expresión génica), pero debe decirse que este campo está evolucionando de manera muy rápida y hasta el momento no existe consenso sobre qué algoritmos funcionan mejor para estos análisis, por lo que un único perfil de expresión génica "verdadero" no puede ser identificado hasta el momento <sup>23</sup>.

Los estudios de perfiles de expresión génica de células de LLC-B muestran a la enfermedad caracterizada por una única firma molecular que la diferencia de otros tipos de cáncer de órganos linfoides y de las subpoblaciones B normales <sup>31</sup>. Sin embargo, a pesar de tener una firma molecular única, dichos perfiles también encuentran diferencias entre los grupos que expresan genes de IgV<sub>H</sub> mutados y no mutados. Entre los genes diferencialmente expresados, la sobreexpresión de la tirosina-quinasa ZAP70 <sup>31,43</sup>, de la lipoprotein-lipasa (LPL), BCL7A, distrofina (DMD) y gravina es característica en los casos con IgV<sub>H</sub> no-mutado<sup>31</sup>, mientras que en los casos mutados se ha descrito sobreexpresión de los genes ADAM29 y NRIP1.

Tomados en su conjunto, los estudios de perfiles de expresión en LLC-B sugieren que los casos mutados indolentes y los no-mutados agresivos constituyen dos variantes de la misma enfermedad. Las grandes diferencias en el pronóstico clínico de estas dos variantes permanecen sin una explicación clara, tanto si se trata de células

en diferentes estadios de diferenciación, en el momento de la transformación maligna, como si las formas no-mutadas representan una forma más activada de la enfermedad, lo que favorecería el potencial proliferante del clon maligno, aunque se necesitan mayores evidencias experimentales para justificar tales hipótesis.

## **5. FACTORES PRONOSTICO EN LLC-B**

### **5.1. MARCADORES SERICOS**

Dada la heterogeneidad de los pacientes en estadios tempranos de la enfermedad en relación al tiempo de progresión de la enfermedad, y la incapacidad del sistema de estadificación de predecir el riesgo de una progresión temprana, otros parámetros tales como la  $\beta$ 2-microglobulina o la actividad de timidina quinasa sérica se pueden utilizar para predecir pronóstico en pacientes con LLC-B.

La timidina quinasa es una enzima involucrada en la síntesis de ADN, predominantemente en células en división y que correlaciona con la actividad proliferativa. Los niveles elevados de esta enzima pueden predecir una progresión temprana en pacientes no tratados.

La  $\beta$ 2-microglobulina es una proteína extracelular componente del sistema HLA de clase I que correlaciona con la masa tumoral en LLC. Además de la LLC, ha probado tener valor pronóstico significativo en linfoma y mieloma múltiple<sup>44</sup>. Valores elevados de  $\beta$ 2-microglobulina se correlacionan con mayor masa tumoral, mayor infiltración medular y menor supervivencia libre de progresión en la LLC-B<sup>45</sup>.

### **5.2. ESTADO MUTACIONAL DEL GEN DE IgV<sub>H</sub>**

Durante los últimos años, el estudio de la región variable (V) del gen de inmunoglobulinas ha recibido un interés particular, sobre todo para ayudar a delinear más correctamente la historia clonal de las células B malignas y como pronóstico de la enfermedad.

Las inmunoglobulinas son proteínas heterodiméricas compuestas de dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L). Cada cadena H y L contienen dominios V que definen los sitios específicos de unión al antígeno del anticuerpo, y un dominio constante, el cual tiene función efectora sin cambio de especificidad antigénica. Las células B maduras que han completado la recombinación funcional VDJ en sus genes de inmunoglobulinas (H y L), expresan IgM en su superficie y migran hacia los órganos linfoides secundarios

donde se produce el encuentro con los antígenos. Los linfocitos B activados por la estimulación antigénica proliferan y generalmente forman microambientes especiales denominados centros germinales, donde tienen lugar otras dos alteraciones genéticas en el gen de las inmunoglobulinas: hipermutaciones somáticas (SHM) y la recombinación de cambio de clases (CSR). El proceso de SHM ocurre en las regiones V de los genes de las cadenas H y L<sup>6</sup>. El análisis de los procesos de SHM y CSR, y el más reciente sobre la histidina-deaminasa inducida por activación, enzima con un rol clave en ambos eventos, ha ofrecido nuevas herramientas para la comprensión de la historia de las células B de la LLC.

Los dominios V de las inmunoglobulinas contienen tres regiones de gran variabilidad de secuencia denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Las tres regiones CDRs de las cadenas L y las tres de las cadenas H de las inmunoglobulinas se encuentran yuxtapuestas para formar el sitio de unión al antígeno. Las regiones CDRs son el blanco preferido del proceso de SHM, de manera que tanto la secuencia como la estructura del sitio de unión al antígeno pueden ser alteradas modificando la afinidad de unión y la especificidad del anticuerpo.

La gran mayoría de las células de LLC-B expresan CD5 e IgM/ IgD, lo que coincide con un fenotipo de células "naive" de la zona del manto, las cuales en condiciones normales tienen genes de inmunoglobulinas no-mutados. Sin embargo, estudios realizados sobre un gran número de pacientes con LLC-B han demostrado que un 50-70% de los casos de LLC-B son portadores de mutaciones en IgV<sub>H</sub><sup>46,47</sup> y que la presencia de dichas mutaciones define un subgrupo de pacientes con un curso clínico claramente más favorable<sup>5,18</sup>. Más aún, la presencia o ausencia de mutaciones en IgV<sub>H</sub> en LLC-B correlaciona con el uso de genes V<sub>H</sub> específicos y con ciertos rearrreglos V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub>. Por ejemplo, V<sub>H</sub>1-69 generalmente se encuentra en las formas no mutadas de LLC-B, mientras que V<sub>H</sub>3-07 y V<sub>H</sub>4-34 contienen frecuentemente mutaciones somáticas<sup>47</sup>.

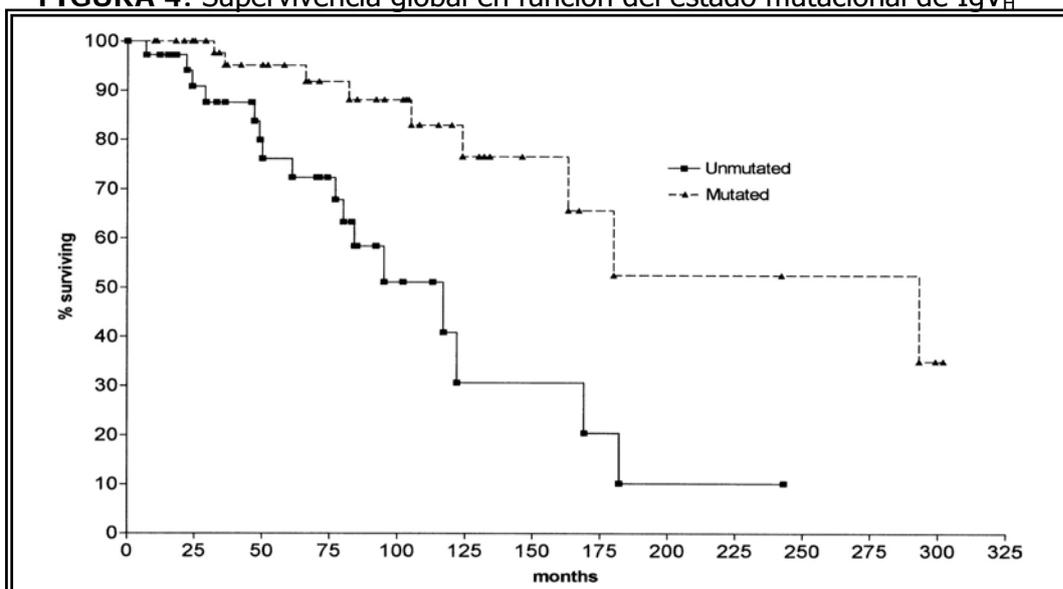
Como ya hemos mencionado, la presencia o ausencia de mutaciones en IgV<sub>H</sub> se asocia con diferente pronóstico clínico. En general, la ausencia de mutaciones está relacionada con una enfermedad más agresiva, menor supervivencia global (8 años para pacientes IgV<sub>H</sub> no mutado frente a 24 años o más en mutados<sup>5,18</sup>) – ver Figura 4- y necesidad de tratamiento más precoz.

Existe un grupo que merece una mención aparte, independientemente del estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub>, los casos que utilizan V<sub>H</sub>3-21 presentan una menor supervivencia global, con una mediana de entre 83 y 88 meses<sup>48,49</sup>. Estos datos de

supervivencia confirman que los casos  $V_H3-21$  no encajan dentro del agrupamiento pronóstico general mutado y no mutado en la LLC. Una gran proporción de casos  $V_H3-21$  han demostrado tener características únicas con regiones de CDR3 más cortas y con alta homología en sus secuencias aminoacídicas<sup>48,49</sup>. Un estudio de perfiles de expresión, también encuentra que este grupo puede diferenciarse de los grupos de LLC-B con  $IgV_H$  mutado y no mutado. Existen un grupo de genes que de manera consistente pueden distinguir entre muestras  $V_H3-21$  y no  $V_H3-21$ . Varios de estos genes están involucrados en regulación de la replicación del DNA/ control de ciclo celular, transcripción y actividad de proteína quinasa, los cuales podrían conferir a las células  $V_H3-21$  una mayor actividad proliferativa<sup>50</sup>.

Volviendo a la distinción clásica entre grupos  $IgV_H$  mutado y no mutado, la alta significación pronóstica del perfil mutacional de los genes de  $IgV_H$  abre una nueva cuestión sobre si aún son válidos los sistemas clásicos de estadificación establecidos por Rai y Binet. Una conclusión de esto nos lleva nuevamente a la idea de que la LLC en realidad se corresponde con dos enfermedades diferentes que comparten características morfológicas y fenotípicas. En las LLC mutadas, la célula B proliferante habría transitado a través del CG (sitio fisiológico donde ocurren las SHM), mientras que las LLCs no mutadas derivarían de una célula B con un BCR más polireactivo, probablemente constitutivamente activado, y que sería responsable de la mayor proliferación celular y por lo tanto del peor pronóstico clínico de este subgrupo molecular de LLC.

**FIGURA 4:** Supervivencia global en función del estado mutacional de  $IgV_H$ <sup>5</sup>



Mediana de supervivencia  $IgV_H$  no mutado: 117 meses:  $IgV_H$  mutado 293 meses ( $p < .001$ )  
 Gráfico extraído de Hamblin *y col*, 1999<sup>5</sup>.

### 5.3. MUTACIONES SOMATICAS EN EL GEN BCL-6

BCL-6 es una proteína que actúa como represor transcripcional con un papel importante en el desarrollo de los CGs. El silenciamiento del gen BCL-6 en ratones impide el desarrollo de CGs<sup>51,52</sup>, y animales que sobreexpresan esta proteína generalmente desarrollan tumores de células B<sup>53</sup> indicando un posible papel de BCL-6 en la génesis de leucemias/ linfomas.

BCL-6 es una diana del proceso de SHM en linfocitos B normales, tal como ocurre con el gen de IgV<sub>H</sub>. La región 5' no-codificante de este gen es la más frecuentemente afectada por estos cambios somáticos<sup>54</sup>. Se han identificado mutaciones en BCL-6 en un 20% de casos de LLC-B y, en general, se restringen al grupo que expresa mutaciones en IgV<sub>H</sub>.

En un trabajo previo de nuestro grupo, el estado mutacional de los genes de IgV<sub>H</sub> y BCL-6 se correlaciona con la progresión de la enfermedad. Aquellos pacientes con mutaciones en BCL-6 e IgV<sub>H</sub> tienen menor tiempo libre de tratamiento que los pacientes que presentan mutaciones en IgV<sub>H</sub> pero no en BCL-6<sup>55</sup> acercando el comportamiento clínico de este grupo al que tienen los pacientes con IgV<sub>H</sub> no mutado (ver Figura 5). En resumen, este estudio demuestra que el estado mutacional de BCL-6 aporta una información importante que se suma al estado mutacional de los genes IgV<sub>H</sub>. El estudio de estos dos genes podría predecir cual sería la distribución de pacientes con mayores posibilidades de progresión, en especial en el grupo de pacientes con mutaciones en IgV<sub>H</sub>. Si tenemos en cuenta que la región 5' no codificante del gen BCL-6 contiene importantes elementos regulatorios<sup>54</sup>, sería conveniente determinar si las mutaciones en esta región podrían ser responsables de una enfermedad más agresiva, o simplemente una consecuencia de su mayor inestabilidad genética, lo cual resultaría en la desregulación de otros genes responsables de la progresión de la LLC-B.

### 5.4. EXPRESION DE CD38

La expresión de CD38 en linfocitos leucémicos fue uno de los primeros marcadores que se encontró que correlacionaba con las mutaciones en IgV<sub>H</sub><sup>18</sup>, aunque actualmente son considerados factores pronóstico independientes<sup>56</sup>. Aquellos pacientes con células B con expresión elevada de CD38 tienen una supervivencia global significativamente menor que los pacientes con baja expresión de este marcador (ver figura 6). La expresión de CD38 en células B tiene doble significado: por un lado denota su estado de activación y por otro, el estadio de diferenciación. Su expresión es bastante

constante en la mayoría de los casos de LLC-B, aunque han sido descritos casos de cambios de la expresión en el tiempo, y dicha variabilidad está asociada con cambios en el comportamiento clínico del paciente<sup>57</sup>. En un estudio reciente se ha tratado de probar la existencia de subpoblaciones dentro de las células B de un mismo paciente, como manera de descubrir si existen células con diferente capacidad de proliferación. Así, se marcaron células en división *in vivo* con un isótopo no-radiactivo estable (<sup>2</sup>H) en forma de agua deuterada (<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O)<sup>58</sup> en nueve pacientes con LLC con clones leucémicos con diferente positividad para CD38 de manera que, midiendo la incorporación de <sup>2</sup>H al ADN, se puede estimar la velocidad de duplicación en células seleccionadas. Luego, en cada uno de estos nueve pacientes se aislaron células B de LLC CD38+ y CD38- y se analizó la incorporación de <sup>2</sup>H al ADN en cada una de estas subpoblaciones. En cada paciente se detectó una mayor incorporación de <sup>2</sup>H al ADN en la fracción CD38+. Estos hallazgos *in vivo* indican que, en un mismo paciente, las subpoblaciones leucémicas diferenciadas por la presencia del marcador de superficie CD38, contienen más células que han entrado en división celular que la fracción CD38-<sup>58</sup>. Este análisis cinético se complementa con el hallazgo de que las células CD38+ co-expresan más marcadores de activación celular y de proliferación (CD69, CD62L, Ki-67, ZAP-70) que las células CD38-<sup>59</sup>. Además, las células CD38+ responden más al entrecruzamiento ligando-BCR que las CD38- del mismo paciente. Por lo tanto, los análisis cinéticos, fenotípicos y funcionales indican que la fracción CD38+ es más activa e inducible que la CD38-, probándose así la existencia de subpoblaciones de células B con diferente capacidad de proliferación en un mismo paciente<sup>49</sup>.

**FIGURA 5:** Gráfico de Kaplan-Meier de Intervalo Libre de Tratamiento de acuerdo al estado mutacional de IgV<sub>H</sub> y BCL-6<sup>55</sup>

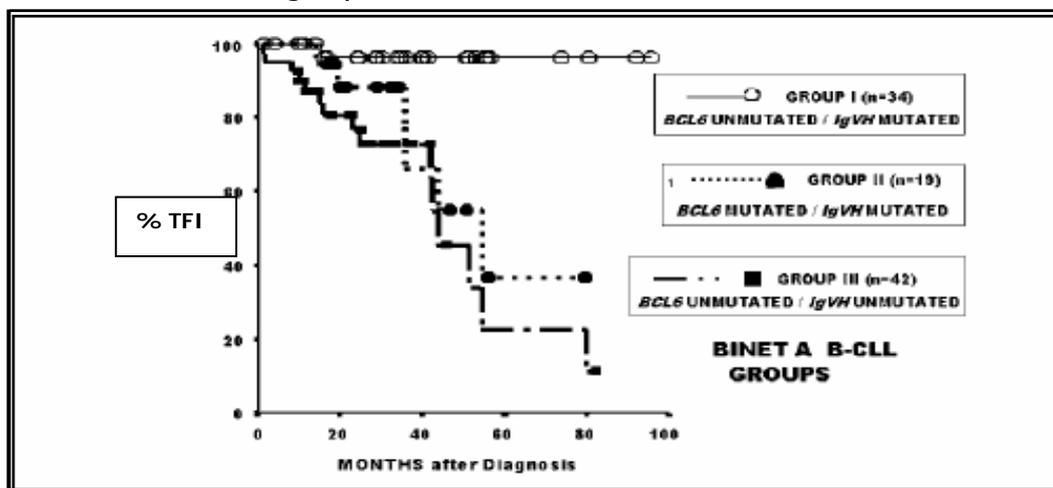


Gráfico extraído de Sarsotti y col, 2004<sup>55</sup>.

**FIGURA 6** : Gráfico de Kaplan-Meier de supervivencia global en función de la expresión de CD38 en pacientes con LLC-B<sup>18</sup>.

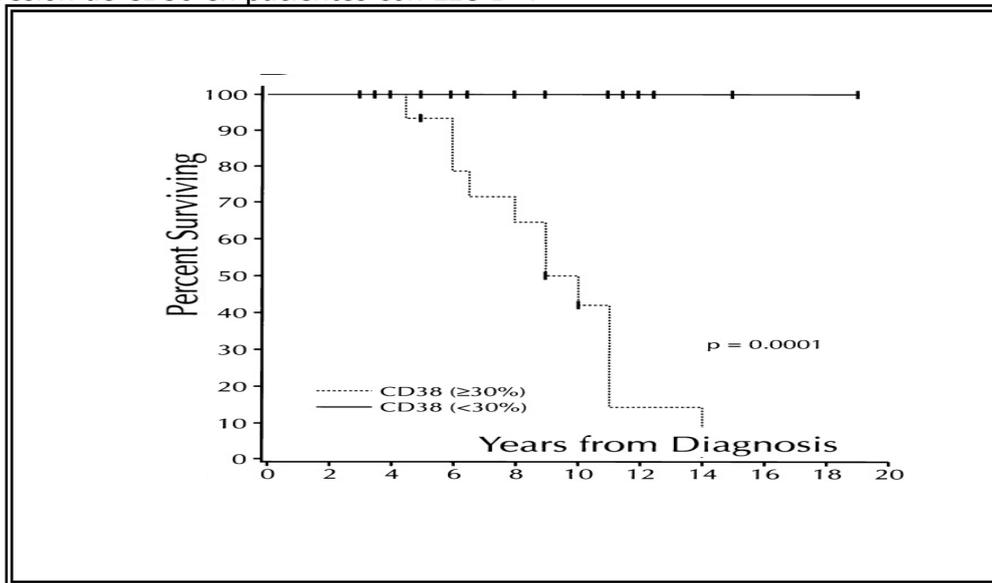


Gráfico extraído de Damle y col, 1999<sup>18</sup>.

### 5.5. ZAP70

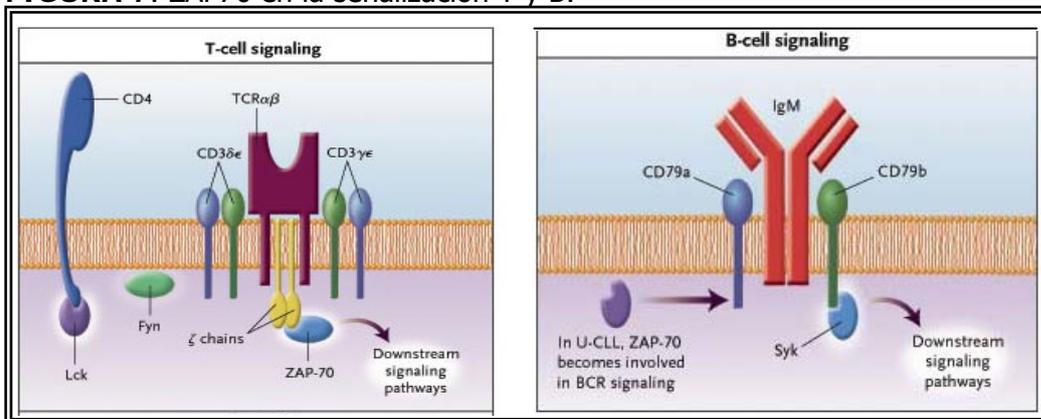
La proteína 70 asociada a cadena zeta (ZAP70) ha emergido a partir de los estudios de micromatrices de ADN como un marcador pronóstico potencial importante en LLC<sup>31</sup>. La detección de ZAP70 por citometría de flujo ha tomado relevancia dado que lo convierte en un buen marcador subrogante del análisis mutacional de los genes de IgV<sub>H</sub> ya que provee información pronóstica de manera rápida y con un costo bajo, lo cual puede ser asumido por cualquier laboratorio especializado de hematología<sup>60,61</sup>.

La proteína ZAP70 es una quinasa de tirosina de la familia Src, de conocida importancia para la transducción de señales en linfocitos T y NKs, pero ausente en linfocitos B normales, que aparece expresada en las células de LLC con IgV<sub>H</sub> no mutado (ver figura 7)<sup>60,62</sup>. Con respecto a la función de ZAP-70 en las células B, datos recientes sugieren que ZAP70 interviene en el desarrollo de precursores de linfocitos B en ratones<sup>63</sup>, hallazgo que ayudaría a explicar la presencia de ZAP70 en un gran número de casos de leucemia linfoblástica B. Las células B maduras normales usan una tirosina quinasa relacionada con ZAP70, denominada Syk, la cual es activada a través del complejo BCR (ver figura 7). Hay evidencias que señalan que Syk y ZAP70 son funcionalmente homólogos y que la expresión de ZAP70 puede reconstituir la función BCR en células B Syk negativas<sup>64</sup>. En LLC-B, se ha visto que ZAP70 puede estar asociada a BCR ya que, en células ZAP70 positivas, la unión del ligando a BCR, resulta en una rápida fosforilación de ZAP70, sugiriendo un papel de esta quinasa en la

transducción de señales vía BCR observada en pacientes con genes de Ig no-mutados 64-66.

Según Del Príncipe *y col.*, la expresión de ZAP70 está relacionada con una menor supervivencia global como así también menor tiempo libre de tratamiento (ver figura 8) y podría incluso ser un mejor predictor que las mutaciones de  $IgV_H$ <sup>67</sup>. Un estudio reciente, señala que la expresión de ZAP70 se correlaciona con la de CD38 pero no con la de CD5 (un marcador de células B de LLC) por lo que de acuerdo a la visión actual de la enfermedad que ve a las células B de LLC como células activadas, la expresión de ZAP70 refleja más una propiedad normal de células B activadas que una aberración neoplásica<sup>68</sup>.

**FIGURA 7: ZAP70 en la señalización T y B.**



En la señalización mediada por el receptor T (TCR), la colaboración entre ZAP70 y otras Src quinasas como Lck y Fyn, conduce a la activación de señales que incluyen a NFκB y MAP quinasas, resultando en proliferación celular. En las células B, ZAP70 normalmente no se encuentra asociado a ésta vía de señalización. La unión de un antígeno a su receptor de superficie (una molécula de inmunoglobulina), alerta a las moléculas asociadas al receptor CD79a y CD79b las cuales están asociadas a Syk y producen su fosforilación, activando así la señalización corriente abajo. En el caso de las LLCs con genes  $IgV_H$  no mutados, ZAP70 es reclutado como parte del complejo receptor de la célula B (BCR), y de alguna manera, todavía no muy bien dilucidada, aumenta ésta señalización. Imagen extraída de Hamblin *y col.*, 2004<sup>62</sup>.

**FIGURA 8: Supervivencia global en función de la expresión de ZAP-70 en LLC-B.**

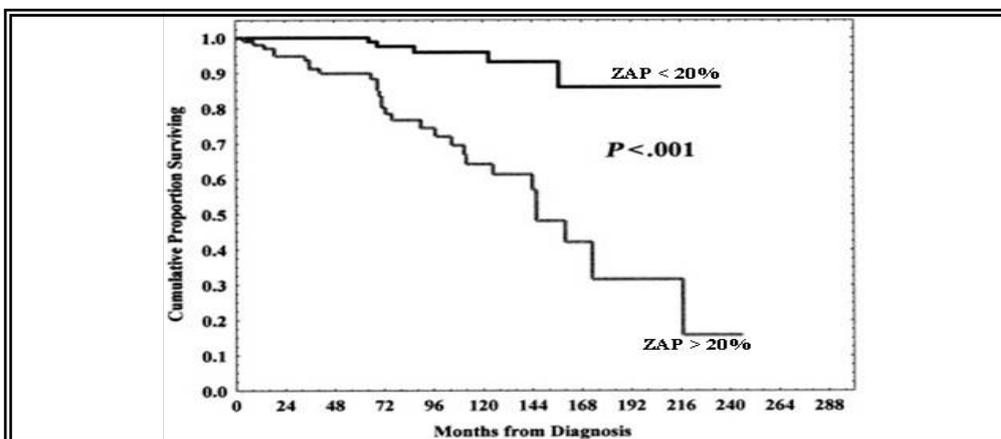


Gráfico extraído de Del Príncipe *y col.*, 2006<sup>67</sup>.

## 5.6. ANOMALIAS CROMOSOMICAS

La citogenética convencional puede identificar aberraciones cromosómicas en solo 30-50% de los casos de LLC-B debido a la baja actividad mitótica *in vitro* de estas células. La técnica de FISH ("fluorescent *in situ* hybridization") permite el examen de interfases por lo que ha aportado una mejora en la capacidad de detectar anomalías parciales como serían: trisomías (12q12, 3q27, 8q24), deleciones (13q14, 11q22-23, 6q21, 6q27, 17p13) y traslocaciones (banda 14q32). Por lo tanto, con ésta técnica se pueden detectar anomalías en más del 80% de las células de LLC-B <sup>69</sup>. Un estudio sobre una población de 325 pacientes permitió construir un modelo jerárquico consistente en 5 subgrupos genéticos discriminados mediante un análisis de regresión de las aberraciones cromosómicas en pacientes con LLC-B (ver figura 9). Aquellos pacientes que presentaban deleción 17p tenían una mediana de supervivencia de 32 meses y el intervalo libre de tratamiento más corto de todos los subgrupos estudiados, siendo de tan solo 9 meses. Luego siguen los pacientes con deleción 11q, con mediana de supervivencia de 79 meses e intervalo libre de tratamiento de 13 meses. La deleción 13q14 resulta ser beneficiosa para los pacientes, ya que presentan el intervalo libre de tratamiento más prolongado siendo de 92 meses y mediana de supervivencia de 133 meses, mientras que el grupo sin anomalías cromosómicas o con trisomía 12 caen en un grupo intermedio con medianas de supervivencia de 111 y 114 meses y tiempo libre de tratamiento de 33 y 49 meses, respectivamente <sup>69</sup>. Basados en este estudio, los pacientes pueden ser priorizados en un orden jerárquico que sería: del17p13> del11q22-q23> trisomía12> sin alteraciones citogenéticas> del13q14.

Las características clínicas de los pacientes con estas alteraciones citogenéticas también son diferentes. Así, los pacientes con del13q14 se encuentran generalmente en estadio A de Binet (72%), tienen el gen de IgV<sub>H</sub> mutado y tienen una velocidad de progresión muy lenta. En contraste, los pacientes con del17p o del11q se presentan con enfermedad más avanzada, con tiempo de duplicación linfocitario más rápido, esplenomegalia y linfadenopatía abdominal, mediastínica o periférica más extensa. Unas linfadenopatías extensas se observan de manera muy característica en los pacientes con del11q. Las del17p y del11q se asocian frecuentemente con IgV<sub>H</sub> no mutados, niveles séricos elevados de LDH y fosfatasa alcalina y albúmina baja, todos ellos indicadores de mayor masa tumoral. Las trisomías 12 se asocian con morfología atípica y desviaciones del inmunofenotipo clásico tales como: CD5-, FMC7+ y tinción de Ig fuerte<sup>44</sup>.

La delección 13q14 en LLC se encuentra situada cerca del *locus* del gen de retinoblastoma (gen supresor tumoral) y puede ser mono o bialélica. Este sitio ha sido extensamente estudiado identificándose varios genes comprendidos dentro de la delección: Leu-1, -2, -5; CLLD6; CLLD7 y 8, KPNA3 (Karioferina alfa 3) y LOC51131 (proteína putativa del tipo "dedo de zinc"), pero análisis exhaustivos no han podido demostrar la inactivación de estos candidatos a genes supresores tumorales. Los que sí han sido recientemente implicados en la patogénesis de la LLC son unos microARNs no codificantes para proteínas (miR15, miR16). Se ha observado pérdida alélica de miR15 y miR16 en más del 65% de los casos de LLC y se asocia con una sobreexpresión concomitante de Bcl-2<sup>70</sup>. En aquellos casos en los que existe delección de estos microARNs, se encontraron varios casos con mutaciones en línea germinal en los precursores primarios de miR16-1 y miR-15a, causando bajos niveles de expresión de estos microARNs *in vitro* e *in vivo*<sup>71</sup>. Dada la frecuencia con la que se observan estas deleciones, se deduce que confieren una ventaja selectiva, posiblemente predisponiendo a los clones B a sufrir mutaciones adicionales<sup>24</sup>.

El gen ATM está localizado en 11q22 y actúa corriente arriba de p53. Este gen codifica una proteína quinasa que coordina la respuesta celular ante rupturas de la doble cadena de ADN. La inactivación de ATM en LLC por delección o mutación es generalmente somática, pero puede estar presente en la línea germinal, generando una predisposición a padecer LLC-B. El papel de ATM en la patogénesis de la LLC es controvertido, ya que las mutaciones en la línea germinal no cumplen todos los criterios para ser considerada una mutación patogénica genuina y por otro lado, otros genes han sido identificados como candidatos para mediar los efectos de la del11q22. Así por ejemplo, la pérdida de esta región aumenta la expresión del receptor de transferrina por lo que aumenta la captación de hierro celular y hay crecimiento tumoral. Recientemente, el punto de ruptura 11q23 se vio que afectaba al gen ARHGAP20 que codifica para una proteína involucrada en la regulación de la familia de GTPasas Rho y que ha sido implicada en la génesis de la LLC<sup>72</sup>.

La anomalía en la trisomía 12 parece que está vinculada a la banda 12q13-q22, un segmento que está duplicado en la LLC. Los genes MDM2 y Ciclina D2 se encuentran localizados en esta región genómica, sin embargo, el significado de la sobreexpresión de éstos en LLC no ha sido totalmente aclarado.

El locus 17p13 contiene varios genes regulatorios, incluyendo el gen supresor tumoral p53. En LLC, la del17p se encuentra en un 7% de los pacientes y está asociada frecuentemente con mutación inactivante de p53 en el alelo homólogo. La

pérdida de la función de esta proteína se relaciona con estadio avanzado, resistencia al tratamiento con análogos de las purinas y alquilantes y peor pronóstico<sup>73,74</sup>.

**FIGURA 9:** Supervivencia global y anomalías citogenéticas en LLC-B<sup>69</sup>.

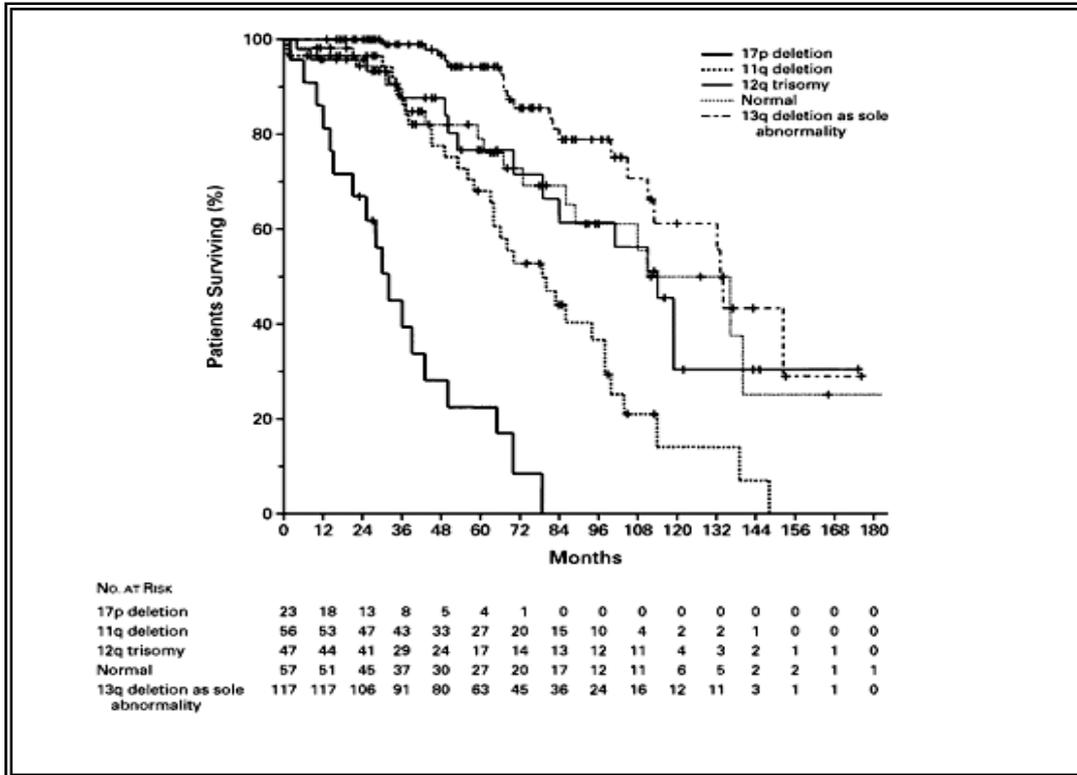


Gráfico extraído de Dohner *y col*, 2000<sup>69</sup>.

### 5.7. LONGITUD DE LOS TELOMEROS Y ACTIVIDAD TELOMERASA

Los telómeros son repeticiones hexaméricas que protegen los extremos de los cromosomas y se acortan en cada división celular, por lo que la longitud telomérica sirve como indicador de la historia de proliferación de una célula<sup>75</sup>. El hallazgo de que las células B de la LLC tienen telómeros más cortos que las células B normales de controles de la misma edad, no solo sugiere que las células leucémicas se dividen, sino que lo hacen de manera más frecuente que las células madre que dan origen a las células B normales. A su vez, las células leucémicas de los pacientes con peor pronóstico clínico (IgV<sub>H</sub> no-mutado) presentan telómeros de menor longitud que los del grupo de mejor pronóstico (IgV<sub>H</sub> mutado), implicando que la velocidad de entrada al ciclo celular en las células B de pacientes no mutados o de sus progenitores es más rápida que la de pacientes con formas mutadas de LLC<sup>76</sup>.

La telomerasa es la enzima responsable de restaurar la longitud del telómero. Los niveles de actividad telomerasa en los casos no-mutados es significativamente mayor

que en los mutados <sup>76</sup>, por lo tanto, la actividad telomerasa también divide los casos de LLC en subgrupos. En consecuencia, los pacientes con telómeros más cortos y mayor actividad telomerasa tienen peor pronóstico clínico<sup>76,77</sup>, aunque es necesario aún un estudio más exhaustivo en este campo para confirmar esta afirmación.

### 5.8. OTROS FACTORES PRONOSTICO EN LLC

A la determinación del estado mutacional de IgV<sub>H</sub>, expresión de ZAP70 o CD38 y alteraciones citogenéticas<sup>18,60,78-80</sup>, más recientemente se han sumado otros marcadores cuya eficacia pronóstica necesita ser validada más extensamente, tales como: CLLU1<sup>81</sup>, sindecán <sup>82,83</sup>, vimentina<sup>84</sup>, expresión de MCL-1<sup>85</sup>, activación de citidina deaminasa inducida (AID)<sup>6</sup>, expresión de lipoproteínlipasa (LPL)<sup>86</sup>, ADAM-29<sup>87</sup> o firma molecular de microARNs<sup>56</sup>. Todos estos factores han ayudado a aumentar la capacidad de asignar un pronóstico favorable o no de la enfermedad pero queda abierto aún el interrogante sobre los mecanismos subyacentes en estos grupos de pronóstico tan diferente.

## 6. COMPETENCIA DE LA SEÑALIZACION BCR

El abordaje del estudio del porqué las células de subgrupos moleculares de LLC se comportan de manera desigual, se puede realizar desde diferentes aproximaciones. Un aspecto que está siendo tratado con especial interés, es el estudio de la estructura y función del BCR usado por las células leucémicas en su relación con su entorno celular, que ha ayudado a redefinir algunos aspectos de la naturaleza de esta enfermedad <sup>1</sup>. En las células B normales, la estimulación del BCR conduce a la fosforilación del inmunoreceptor en las colas citoplasmáticas de la molécula de Ig. Esto causa el reclutamiento de Syk, la cual es activada iniciando la activación de enzimas efectoras cruciales como la fosfatidil 3- quinasa (PI3K) o la fosfolipasa2 (PLC-2). PI3K genera como segundo mensajero el trifosfato de fosfatidilinositol, el cual recluta otras moléculas ligadas a señalización BCR hacia la membrana y activa la quinasa Akt. La vía PI3K/Akt juega un papel importante en la supervivencia de las células B, induciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 y XIAP, e inactivando blancos celulares involucrados en la inducción de apoptosis, tales como BAD y Caspasa 9. La activación de PLC-2 conduce a la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular y activación de PKC, enzima crucial para la activación de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos

(MAPKs) entre ellas ERK, JNK y p38 MAPK, y de factores de transcripción como NFκB y NFAT. El balance entre estas moléculas de señalización determina qué ocurrirá con la célula B. En general, podemos decir que NFκB parece ser importante en la supervivencia de las células B estimuladas por antígeno, a través de la inducción de la expresión de varias proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL y Bfl-1A), por lo que la inhibición de esta vía de señalización podría ser una aproximación terapéutica interesante en LLC-B. El papel de las tres MAPKs es menos claro, ya que su activación en células B se correlaciona tanto con proliferación como con apoptosis<sup>88-90</sup>. Sin embargo, la activación de todas estas vías de señalización es necesaria para una respuesta inmunogénica completa tras la estimulación antigénica<sup>91</sup>. Así, una estimulación antigénica sub-óptima, como la que ocurre con autoantígenos solubles que se unen de manera más laxa al receptor, puede inducir señales tolerogénicas que inducen solo la activación de ERK y NFAT<sup>85</sup>.

Algunos estudios aparecidos en los años 90 indicaban que los pacientes con LLC-B se dividían en dos grupos de transducción de señales y ambos involucraban al receptor BCR<sup>92-94</sup>. En un grupo, las células eran anérgicas a la estimulación vía BCR, y en el otro, las células respondían de manera similar a las células normales. Parece entonces, que hay una capacidad diferencial de algunos casos de LLC-B de transducir señales de manera continua a través de BCR durante la fase leucémica de la enfermedad. Sería interesante estudiar de manera mas exhaustiva las consecuencias que tienen determinados estímulos provenientes del microentorno sobre el comportamiento *in vivo* de las células B de LLC, dado que se conoce que son capaces de conferirles ventajas de crecimiento y aumento de supervivencia<sup>95</sup>, y en relación con este tópico, también deberían investigarse de qué manera actúan estos estímulos cuando se trata de células leucémicas con genes IgV<sub>H</sub> mutados o no.

Cuando se comparan los BCRs de pacientes con LLC, se encuentran similitudes estructurales entre ellos, sugiriendo que los antígenos que se unen a dichos receptores son semejantes y relevantes en la patogénesis de la LLC-B. La extensión de estas similitudes varía entre grupos de pacientes. Casi el 10 % de los casos de LLC pueden agruparse en categorías marcadas por similitudes en sus bolsillos de unión al antígeno, y la mayoría de estos casos son no-mutados con mal pronóstico. Estos hallazgos son muy interesantes ya que dado el número de combinaciones posibles de los segmentos V que codifican los dominios de unión al antígeno, no se esperaría encontrar 2 casos de LLC con tales similitudes estructurales en más de un millón de casos<sup>96</sup>. Análisis moleculares detallados han demostrado que las células leucémicas tienen un uso

preferencial de genes de la región variable de las Ig, en al menos uno de cada cinco casos, expresan secuencias de CDR3 similares cuando no idénticas, tanto para la cadena ligera como la pesada, dando origen a los llamados receptores estereotipados. Todas estas observaciones sugieren la existencia de un conjunto limitado de elementos antigénicos que podrían ser reconocidos por los receptores leucémicos<sup>97</sup>. Estos casos sugieren que un limitado conjunto de antígenos promueven la división de células leucémicas aumentando la posibilidad de aparición de mutaciones peligrosas. Hay datos acerca de que el uso de genes V<sub>H</sub> específicos se relaciona con un patrón de expresión génica determinado, por lo que se apunta al reconocimiento antigénico y la estimulación BCR continua como un factor patogénico en subgrupos de LLC<sup>96</sup>.

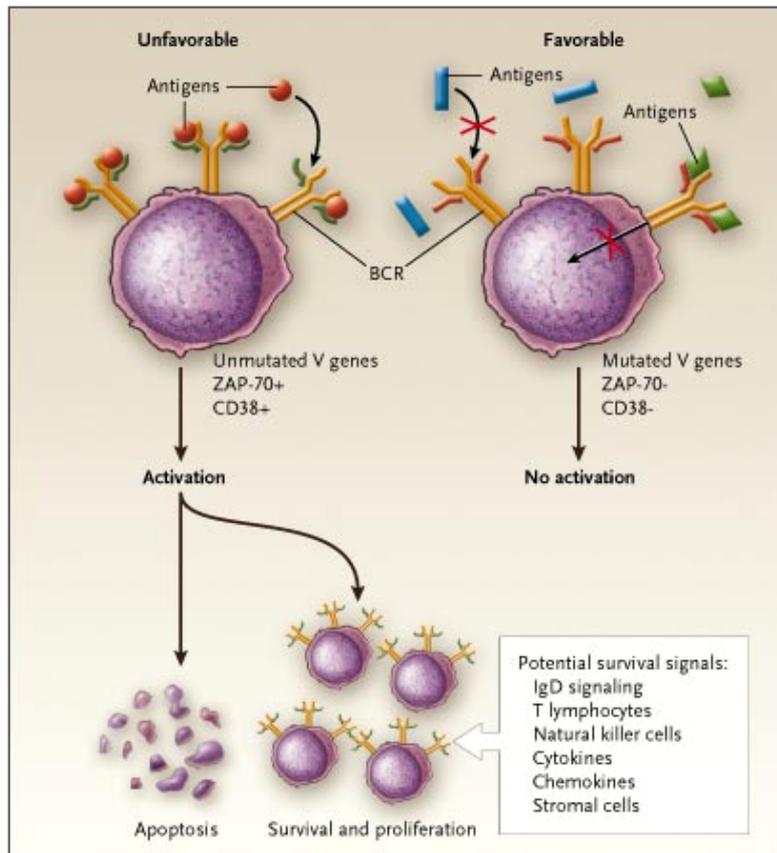
La siguiente cuestión a plantearse es ¿cuáles o de qué tipo de antígenos se trata? Aunque son aún desconocidos, es muy posible que se trate de virus latentes o bacterias comensales que de manera repetitiva activan clones particulares de células B a través del BCR. La LLC podría resultar, directa o indirectamente, de infecciones específicas y podría perpetuarse a través de ellas de una manera similar a lo que ocurre en los linfomas gástricos que evolucionan en respuesta a *Helicobacter pylori*<sup>24</sup>. Otra alternativa es que antígenos ambientales, o autoantígenos puedan estar involucrados en disparar la expansión clonal. Las células de LLC frecuentemente tienen receptores polireactivos, capaces de unirse a múltiples antígenos, incluyendo autoantígenos, permitiendo la estimulación tanto por autoantígenos como por antígenos microbianos. Este mecanismo es factible en casos de LLC no-mutados y en unos pocos casos mutados, dado que la mayoría de las Ig no-mutadas y algunas pocas mutadas codifican para tales receptores polireactivos. En el caso de las LLCs que cursan con enfermedad indolente (mayoría de casos mutados), puede demostrarse que, o bien hay un desacople en la activación de la señalización generada a partir del BCR, apoyando entonces la vieja hipótesis del proceso de anergia inducida por antígeno que ocurriría en este grupo de pacientes<sup>97</sup> o bien, serían incapaces de responder a antígenos debido a cambios en la estructura de su BCR causados por el proceso de SHM<sup>98</sup>. En contraste, los pacientes restantes, principalmente aquellos con pronóstico clínico desfavorable, pueden ser estimulados *in vitro* a través de sus BCRs, como puede demostrarse por un aumento en la fosforilación global de tirosinas, sugiriendo que son portadores de receptores más competentes con capacidad de recibir señales de supervivencia y proliferación (ver Figura 10). Un análisis proteómico sobre células de LLC purificadas reveló que los pacientes con mal pronóstico son portadores de una firma molecular característica de la activación BCR, apoyada por el

hallazgo de una fosforilación constitutiva de HS1, una proteína central en la cascada de señalización generada a partir de la estimulación BCR<sup>97</sup>. Por el contrario, solo una fracción minoritaria de proteína fosforilada se ha encontrado en células de pacientes pertenecientes al grupo de buen pronóstico, sugiriendo la presencia de una estimulación persistente, mediada por BCR, en aquellos pacientes con enfermedad más agresiva. Resulta interesante resaltar que HS1 interacciona con diferentes adaptadores del citoesqueleto, incluyendo a HIP-55 y cortactina, dando así una base molecular al acoplamiento entre señal inducida por antígeno-BCR y regulación del citoesqueleto en células B leucémicas. Por otro lado, ZAP70, otra molécula involucrada en la vía de señalización BCR y con fuerte valor pronóstico, es parte de este complejo multiproteico, sugiriendo un papel importante de los componentes del citoesqueleto en la regulación del comportamiento de la LLC<sup>97</sup>. Otros experimentos, que apoyan lo expuesto anteriormente, se basan en la estabilización de la unión BCR con anticuerpos contra IgM *in vitro*; de esta manera se logra transmitir la señal al núcleo en aproximadamente el 50% de los casos de LLC y parece ser que este fenómeno ocurre más frecuentemente en células de LLC no mutadas<sup>98</sup>.

Estos hallazgos podrían ser cruciales para una correcta interpretación del patrón de recirculación, migración y acumulación de las células leucémicas dentro de los órganos linfoides. También podrían ser relevantes en el contexto de eventos que ocurren en los llamados centros de proliferación que representan los compartimientos de proliferación tisulares de la enfermedad, y están constituídos por agregados focales de células proliferantes, generalmente intercaladas con linfocitos T activados. Estos tejidos son probablemente los sitios donde las células leucémicas son inicialmente expuestas a la estimulación antigénica, donde reciben la ayuda adecuada de las células T, cuando es necesario, y son seleccionadas para la expansión clonal para interactuar finalmente con las células estromales que favorecen su acumulación progresiva en la periferia.

En conclusión, los receptores de superficie de las células B parecen jugar un papel central en la LLC ya que son capaces de controlar y dirigir a la célula leucémica hacia la anergia o hacia la activación funcional luego de una estimulación adecuada, y si además concurren otros estímulos originados a partir del microambiente tumoral pueden llegar a definir el comportamiento biológico de la célula maligna, el cual finalmente se ve reflejado en pacientes con diferentes comportamientos clínicos<sup>97</sup>.

**FIGURA 10:** Rol de la estimulación antigénica y de las señales accesorias del microambiente en la promoción de la LLC-B.



Las células B de pacientes con LLC con marcadores pronóstico desfavorables (parte izquierda de la figura) son estimuladas por la unión de autoantígenos a sus BCRs. El balance dinámico entre señales positivas y negativas generadas a partir del BCR y las señales de supervivencia transducidas por la IgD y producidas por otras células, citoquinas y quimioquinas determinan que la célula leucémica proliferé o muera por apoptosis. Las células B de pacientes con marcadores pronóstico favorables (lado derecho de la figura) son menos capaces de iniciar señales apoptóticas, de supervivencia o de proliferación debido a su incapacidad de unir antígenos debido a los cambios en su BCR debido a las mutaciones sufridas en  $IgV_H$ . La menor capacidad de señalización BCR se puede deber a que: los antígenos (representados por rectángulos en azul) no encajan en los receptores B, condición conocida como "ignorancia clonal", o bien debido a un defecto en la transducción de la señal post-BCR (a pesar de un encaje adecuado del antígeno romboidal verde a su receptor B). Esta pérdida de estimulación del BCR puede ser un factor asociado a una forma menos agresiva de la enfermedad. Imagen tomada de Chiorazzi y *col*, 2005<sup>24</sup>.

### 6.1. Inducción de Apoptosis por señales mediadas por BCR

Se conocen dos vías por las cuales se puede iniciar el proceso apoptótico. La vía intrínseca es iniciada por daño mitocondrial con la consecuente liberación de citocromo C, el cual luego se une a Apaf-1 citosólico y causa la activación de caspasa 9, la que activa una cascada de caspasas efectoras. En contraste, en la vía extrínseca, las caspasas efectoras son activadas por la caspasa 8 a través del reclutamiento de la proteína FADD-Mort, la cual es activada por la unión a receptores de la familia TNF de

sus los ligandos específicos, algunos de los cuales son: TNF-R1 (CD120a), DR3, DR4 (Trail-R1), DR5 (Trail-R2), DR6 y Fas (CD95).

En el caso de las células de LLC-B se sabe que la unión a las Igs de superficie está invariablemente acompañada de daño mitocondrial y activación de caspasa 9 y ésta parece ser la vía de activación de apoptosis operativa.

## **7. EFECTOS DEL MICROAMBIENTE CELULAR SOBRE LAS CELULAS DE LLC-B**

Una característica que ya hemos mencionado de las células de LLC-B es la acumulación de estas células maduras escapando del proceso de muerte celular programada. Sin embargo, en contradicción con los estudios *in vivo*, una vez que las células se cultivan *in vitro*, estas mismas células sufren apoptosis, sugiriendo un papel importante del microambiente celular en la supervivencia de estas células<sup>99</sup>.

Las células de LLC mantienen su facultad de responder a determinados estímulos externos capaces de conferir a las células leucémicas ventajas de crecimiento y una mayor supervivencia *in vivo*. De acuerdo con estos hechos, tanto componentes solubles como celulares del microentorno de las células leucémicas parecen estar implicados en la progresión de la enfermedad<sup>100</sup>. Las interacciones con células de estroma medular<sup>101</sup> o células nodriza<sup>102,103</sup> o las interacciones entre CD38 y su ligando natural el CD31<sup>104</sup> rescatan a las células de LLC de la apoptosis *in vitro* y probablemente hagan lo mismo *in vivo*. En el caso de interacciones entre células, pueden realizarse a través de mediadores anclados a membrana, interacciones adhesivas o uniones de tipo Gap (Gap junction)<sup>105</sup>. En particular, las células de estroma medular parecen tener capacidad de sostener de manera prolongada la viabilidad de clones leucémicos cuando son cultivados *in vitro*<sup>101</sup>. Otras células capaces de proteger a las células de LLC de la apoptosis espontánea que sufren al ser cultivadas son las denominadas células nodriza ("nurse like")<sup>103</sup>, células adherentes que pueden obtenerse a partir de sangre periférica de pacientes con LLC-B. También las células dendríticas son capaces de enviar señales que previenen la apoptosis en las células del CG, y la vía de señalización Hedgehog parece ser una de las involucradas en estos procesos<sup>106</sup>. Otro hecho bien conocido es que células T normales activadas (CD3+, CD4+ CD40L+) se encuentran frecuentemente en tejidos ligados a la LLC y esto de alguna manera recuerda a la activación mediada por células T que ocurre de manera

normal *in vivo*. Varios autores han señalado a las interacciones CD40/CD40L como un punto relevante en la patogenia de la LLC. La estimulación vía CD40 puede rescatar a las células de LLC de la apoptosis e inducir su proliferación y activación como se puede evidenciar por la mayor expresión de moléculas como CD80 y CD95 sobre la superficie celular y la producción de quimioquinas (CCL-22/MDC, CCL-17/TARC)<sup>107,108</sup>. Cabe aclarar que no todos los clones de LLC responden a la estimulación vía CD40 *in vitro*, indicando la existencia de un subgrupo de LLC no-responder a CD40L<sup>107,109</sup>.

Finalmente, algunas citoquinas, como la IL-4<sup>110</sup> y quimioquinas, como el factor derivado de estroma (SDF-1)<sup>111</sup>, también han sido capaces de soportar la expansión de clones de LLC.

La mayoría de las señales enumeradas anteriormente estarían dirigidas a favorecer los mediadores anti-apoptóticos en lugar de los pro-apoptóticos, concediendo a la célula leucémica una mayor supervivencia. En apoyo de esto se ha visto una regulación positiva de los genes BCL-2, survivina y MCL-1 en células de LLC<sup>4,112</sup>. Este rescate de la apoptosis ocurriría preferentemente en los pseudofolículos de los nódulos linfáticos y en determinados "cluster" de la médula ósea, evidenciados por marcadores de ciclo celular como el Ki-67 en las células leucémicas en estos sitios<sup>4</sup>.

Estas observaciones plantean un cuadro en el que el contacto célula maligna/microambiente genera señales importantes para el mantenimiento y expansión de las células B leucémicas. Además, como las células de LLC secretan quimioquinas, pueden de manera activa seleccionar su microentorno escogiendo las moléculas/ células accesorias de acuerdo a sus necesidades, las cuales a su vez les proveen de señales útiles para la expansión del clon leucémico.

## 8. LLC-B PATOGENESIS

La observación de que la LLC-B está más relacionada con las células B de memoria o de la zona marginal que con cualquier otro tipo de células B normales, sugiere que el proceso que conduce a la expansión clonal podría iniciarse en éstas células. Esta idea se basa en el perfil citogenético particular de la LLC-B cuando se lo compara con el de otras enfermedades malignas de células B que se originan a partir de la transformación de células B derivadas del CG. El grupo de tumores derivados del CG, entre los que se encuentran: linfoma difuso de células grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de Burkitt (BL) y mieloma múltiple (MM), se caracteriza por poseer genes de IgV<sub>H</sub>

mutados de manera extensiva y por poseer traslocaciones cromosómicas balanceadas específicas. Varias de estas traslocaciones involucran al *loci* de Ig, y la localización de puntos de ruptura dentro del *loci* de Ig sugiere que las alteraciones genómicas pueden ser resultado de errores en la recombinación de los segmentos V, D y J del gen de Ig, del cambio de clase o por el proceso de SHM<sup>113</sup>. El proceso de SHM "en marcha" observado en FL y en grupos de BL y DLBCL sugiere que la célula que origina este tipo de tumores proviene del CG sin embargo, para el caso del MM, su origen estaría en una célula post-CG. Por el contrario, a pesar de que existen un porcentaje de casos de LLC-B con genes de IgV<sub>H</sub> mutados, la LLC-B no presenta de manera característica traslocaciones recíprocas específicas, a pesar de algunas excepciones<sup>74,114</sup>, sin embargo encontramos que la mayoría de las alteraciones genéticas son del tipo deleciones o amplificaciones. Esta observación, sumada a la del fenotipo de células B de la zona marginal insinúa que las células de LLC-B no tienen traslocaciones cromosómicas porque los mecanismos involucrados en este tipo de aberraciones como las SHM y CSR, no se encuentran activos en estas células.

Varios trabajos recientes sobre el repertorio de genes de IgV usados en LLC, aportan fuertes indicios acerca del papel fundamental que tiene la estimulación antigénica en el desarrollo de la LLC-B<sup>1</sup>. Así se sabe, como ya lo señaláramos anteriormente, que existe una selección particular de combinaciones de cadenas H y L de Ig<sup>29</sup> y que determinados subgrupos de LLC-B tienen regiones CDR3 de cadenas L y/o H similares (receptores estereotipados)<sup>115</sup>, observaciones que sugieren que la unión de BCRs específicos a determinados antígenos foráneos o a autoantígenos provee de una señal estimuladora continua a través del BCR que mantiene a la célula de LLC-B en ciclo celular durante largos períodos de tiempo y provocaría, eventualmente, la adquisición de aberraciones genómicas<sup>30</sup>.

Ahora, sobre la cuestión de cómo sería el mecanismo que conduce al desarrollo de la LLC-B, podemos decir, aún sin tener una respuesta satisfactoria, que hay datos experimentales que plantean al menos dos escenarios posibles para explicar la patogénesis en LLC-B.

1. La estimulación antigénica tiene un papel promotor en la expansión del clon leucémico, en el cual la señalización BCR está aparentemente intacta transduciendo señales que facilitan la propagación de las células que, debido a lesiones genéticas, son más susceptibles a la proliferación y concomitantemente

activan mecanismos celulares anti-apoptóticos, estando este escenario preferentemente vinculados a LLCs con IgV<sub>H</sub> no mutado.

2. El otro escenario relaciona a las células que son no-respondedoras a las señales mediadas por BCR debido a lesiones todavía no bien caracterizadas en la vía de transducción de señales o porque se han vuelto anérgicas y han sido “congeladas” por el proceso neoplásico en un estado no-respondedor<sup>1</sup> y que en general involucra a las LLCs con IgV<sub>H</sub> mutado. En este caso, la expansión del clon maligno parece estar promovida primariamente por alguna lesión citogenética aún no bien determinada responsable de la transformación neoplásica. Dado que estas células son menos susceptibles a apoptosis, serán menos dependientes de la asistencia de células o moléculas accesorias.

## 9. INVESTIGACION TRASLACIONAL EN LLC-B

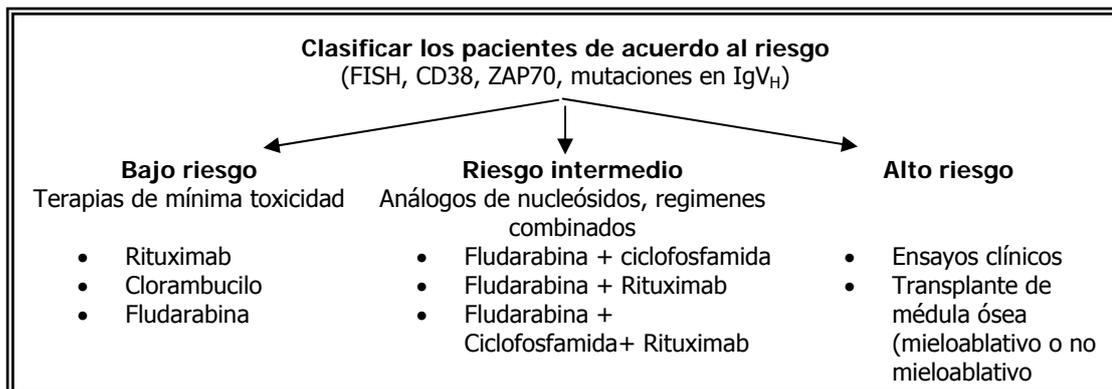
Con la intención de mejorar la comprensión de mecanismos patogénicos y el pronóstico en LLC-B, hemos visto que un gran número de parámetros pueden estudiarse para ayudar a pronosticar supervivencia y tiempo libre de enfermedad en esta leucemia. Así, la combinación del estudio del estado mutacional de IgV<sub>H</sub>, expresión de ZAP70 y CD38, niveles plasmáticos de β2 microglobulina y CD23 soluble, y la presencia de anomalías cromosómicas tales como del17p o del11q mediante técnica de FISH, permiten diferenciar pacientes con enfermedad moderada de aquellos que seguirán un curso clínico más agresivo, y por lo tanto, la traducción de la información derivada de la biología de la enfermedad, ha ayudado a generar herramientas para identificar pacientes con necesidad de tratamiento temprano o incluso poder seleccionar el agente farmacológico más adecuado para determinado grupo de pacientes<sup>116</sup>.

### 9.1. TRATAMIENTOS

En la elección de la terapia a utilizar en determinado paciente, hay que aclarar que, luego de la estratificación según su riesgo y agrupados los pacientes de acuerdo a los parámetros mencionados anteriormente, ninguna de las aproximaciones que se pueda utilizar se ajusta de manera general a todos los pacientes. Un intento de ordenar las posibilidades terapéuticas existentes en la LLC-B se encuentra reseñado en la Figura 11. Dentro de las consideraciones importantes se deberían incluir la edad y la toxicidad

a corto y largo plazo del régimen de tratamiento escogido. La especificidad de la terapia elegida variará de un paciente a otro y es un punto controvertido dado que aún no existen datos disponibles de resultados que soporten la noción de "estrategia adaptada al riesgo". Sin embargo, la terapia de elección para pacientes de más de 80 años, con factores de pronóstico favorables y cercanos a una expectativa de vida normal, será muy diferente a la de un paciente de 40 años con anomalías en p53 (del17p) y una supervivencia anticipada de menos de 3 años. Afortunadamente, la mayoría de los pacientes con LLC tienen una supervivencia anticipada de más de 3 años, y pueden clasificarse en algún lugar entre las dos situaciones descritas anteriormente. Para éstos pacientes se deben considerar, de manera cuidadosa, los riesgos y beneficios de la elección de cada tratamiento, ya que los mismos se relacionan con el pronóstico de cada paciente en particular<sup>117</sup>.

**FIGURA 11:** Propuesta de manejo inicial de pacientes sintomáticos con LLC-B<sup>117</sup>.



Modificado de Byrd *y col*, 2004 <sup>117</sup>.

**9.1.1. Agentes alquilantes:** Históricamente, los tratamientos han consistido en usar un agente alquilante, siendo el más comúnmente usado el clorambucilo solo o combinado. Este tipo de tratamiento resulta en una remisión parcial (PR) y es intermitente y prolongado. Las terapias basadas en agentes alquilantes tienen una remisión completa (CR) menor del 10%, la respuesta global (OR) es de aproximadamente un 50-60% y una supervivencia media de 50-70 meses.

**9.1.2. Análogos de purinas:** La Fludarabina es el análogo de purinas más extensamente usado para el tratamiento de pacientes con LLC-B. El tratamiento en primera línea con fludarabina como agente único indujo un 20-30 % de CR y la OR fue de un 80% aproximadamente<sup>118,119</sup>. Dos estudios randomizados<sup>120,121</sup> compararon

combinaciones basadas en el uso de agentes alquilantes con el uso de fludarabina como agente único en el caso de pacientes previamente no-tratados. Ambos estudios demostraron mejores tasas de CR y OR y superior duración de la remisión, pero no mostraron ventajas en la supervivencia global (OS) del tratamiento con fludarabina con respecto a los agentes alquilantes.

**9.1.3. Tratamientos combinados con análogos de purinas + agentes alquilantes:** La fludarabina inhibe la reparación por escisión de bases del ADN que ha sufrido entrecruzamiento intercatenario inducido por ciclofosfamida, potenciando su actividad, sustentando así el uso combinado de ambos agentes. Ensayos de fase II combinando fludarabina con ciclofosfamida sugieren incremento en la eficacia cuando se compara con los pacientes tratados con fludarabina sola<sup>122-124</sup>. Dos estudios independientes llevados a cabo por el Intergroup E2991 y el UK Leukemia Research Fund (LRF), indicaron que existe una mayor actividad y un tiempo libre de progresión más prolongado cuando se usa la ciclofosfamida en esquemas combinados que cuando se la utiliza como agente único en el caso de pacientes con LLC-B que no hayan sido sometidos a un tratamiento quimioterápico previo<sup>61,125,126</sup>.

Cladribina (2-CdA) y Pentostatina (2-deoxicoformicina) también han sido usados como agentes únicos para el tratamiento de pacientes con LLC<sup>127</sup>. El uso combinado de Cladribina con ciclofosfamida y mitoxantrona como terapia inicial demostró ser más eficaz en la obtención de remisiones completas que el uso de Cladribina sola o en combinación con ciclofosfamida. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la PFS y OS entre estos tres tipos de tratamiento<sup>127</sup>.

**9.1.4. Anticuerpos Monoclonales:** El anticuerpo monoclonal (mAb) humanizado anti-CD52 conocido como Alemtuzumab, está dirigido contra un antígeno altamente expresado en las células B de la LLC y los linfocitos T y B normales. Este mAb es el único fármaco aprobado por la FDA que ha demostrado tener actividad en el tratamiento de pacientes con células leucémicas que han perdido la funcionalidad de p53. Así, pacientes con LLC que presentan del17p, son resistentes a los tratamiento antileucémicos estándar con drogas tales como clorambucilo, análogos de purinas o rituximab (antiCD20), pero pueden beneficiarse del tratamiento con Alemtuzumab<sup>78</sup>.

Rituximab es otro mAb, dirigido contra el antígeno de superficie CD20, y fue aprobado por la FDA para su uso en recaídas de pacientes con linfoma no Hodgkin de bajo grado. Los niveles relativamente bajos de expresión de CD20 que expresan las

células B de la LLC, y la presencia de CD20 soluble en el plasma de pacientes con LLC, serían las causas de su actividad limitada en pacientes con LLC a dosis estándar. Sin embargo, el uso de dosis mayores de Rituximab como agente único ha demostrado tener una eficacia terapéutica mayor<sup>31,124</sup>.

**9.1.5. Quimioinmunoterapia:** El uso de Rituximab mejora la actividad de las terapias con análogos de purinas por lo que ha sido incorporado en regímenes combinados de quimioinmunoterapia. Este efecto se basa en la disminución de la expresión de la proteína antiapoptótica bcl-2 producida por Rituximab lo cual podría sensibilizar a las células a la apoptosis inducida por fludarabina. A su vez, la fludarabina reduce la expresión de las proteínas de resistencia a complemento CD46, CD55 y CD59 en las células B malignas, volviéndolas más susceptibles a la citotoxicidad dependiente de complemento inducida por rituximab<sup>128</sup>.

**9.1.6. Tratamiento de la enfermedad residual:** En el caso de pacientes con enfermedad residual, la eliminación de la misma puede mejorar la duración de la remisión y el resultado global del tratamiento. Debido a que ha demostrado actividad significativa en la eliminación de la enfermedad a nivel de sangre periférica y de médula ósea, varios estudios han evaluado la efectividad del Alemtuzumab en la eliminación de enfermedad residual luego de la quimioterapia<sup>129,130</sup>. Un estudio en pacientes previamente tratados que recibieron Alemtuzumab demostró la erradicación de enfermedad residual en sangre y médula ósea en un 20%. Aquellos pacientes que después del tratamiento fueron negativos para enfermedad residual tuvieron un tiempo más prolongado libre de enfermedad hasta la progresión y una supervivencia global mayor que los que persistieron con enfermedad residual<sup>131</sup>.

**9.1.7. Transplante autólogo y alogénico:** El transplante autólogo y alogénico de células madre es una opción terapéutica cada vez más considerada en el manejo médico de los pacientes con LLC activa. Este tipo de procedimientos pueden conceder varios beneficios a los pacientes, pero como contrapartida conllevan costos elevados y toxicidad considerable. La eficacia de un transplante autólogo recae solo en la citotoxicidad de la terapéutica administrada. El transplante ofrece el beneficio adicional del efecto inmune de injerto *versus* leucemia, pero también es portador de la posibilidad de desarrollar una enfermedad de injerto contra huésped. Es por ésta última causa que se hace necesario identificar factores que puedan ayudar a

determinar si un paciente es un candidato para transplantar y, en tal caso, si la mejor opción sería un trasplante autólogo o alogénico. Los datos que surgen de estudios prospectivos en ensayos con trasplante autólogo, han demostrado que éste tipo de tratamiento es seguro, mejorando el tiempo de remisión después del trasplante y con supervivencias prolongadas. Cuando se compara al trasplante alogénico con el autólogo, como primera ventaja terapéutica luego de las menores dosis de acondicionamiento que se deben usar, encontramos el efecto injerto *versus* leucemia, el cual ofrece un control de la enfermedad a más largo plazo y una eventual cura de la misma<sup>61</sup>.

#### **9.1.8. Nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la LLC.**

**Flavopiridol:** Es una flavona sintética, que inhibe las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) 1, 2, 4 y 9, con propiedades potenciales de anti-proliferante e inductor de apoptosis. La inducción de apoptosis se realiza vía inhibición de la transcripción génica, afectando profundamente a las proteínas cuyos transcritos tienen una vida media corta. Usando este agente se obtuvo una tasa de respuesta de más de un 50% en pacientes previamente tratados, en asociación con el síndrome de lisis tumoral, lo que indica actividad terapéutica<sup>132</sup>.

**Inhibidores de proteasoma:** En leucocitos B, el factor de transcripción NFκB regula de manera positiva la transcripción de genes que codifican para miembros anti-apoptóticos de la familia BCL-2<sup>133</sup>. Por lo tanto, se ha sugerido que la prevención de la activación de NFκB podría ser una nueva opción para el tratamiento de varias neoplasias. Los inhibidores de NFκB que están disponibles actualmente se pueden dividir en tres grupos basados en sus mecanismos de acción: inhibidores del proteasoma que es el sitio de degradación de IκB, inhibidores de la fosforilación de IκB e inhibidores de la traslocación de NFκB del citoplasma al núcleo. Los inhibidores de proteasoma que actúan, en parte, estabilizando la proteína IκB y, por lo tanto inhiben la activación de NFκB, son interesantes como agentes quimioterápicos de nueva generación en una gran variedad de tumores humanos. En su mecanismo de acción, parece intervenir la inducción de apoptosis dependiente de caspasas<sup>134</sup>. Uno de ellos, Bortezomib (Btz) es un derivado dipeptídico del ácido borónico cuya diana de acción es el sitio quimotriptico de la unidad 26S del proteasoma y que está siendo utilizado actualmente en ensayos clínicos, aunque son resultados variables<sup>135</sup>.

**mAb anti-CD40 (CHIR-12.12):** CD40 es una molécula de superficie expresada ubicuamente en las células B, con significado funcional en la LLC; así, la unión con su

ligando específico (CD154) podría proveer a los linfocitos B de la LLC de las señales de supervivencia y de proliferación que éstas células necesitan. Se ha visto que el mAb anti-CD40 humanizado (CHI-12.12) tiene actividad *in vitro* bloqueando la unión CD40-CD154, induciendo apoptosis y mediando reacciones de citotoxicidad mediada por anticuerpos contra células de LLC-B CD40+<sup>136</sup>. Actualmente, este anticuerpo está siendo usado en un ensayo clínico de fase I para pacientes con LLC previamente tratados<sup>116</sup>.

**Vacunas para el tratamiento de la LLC.** El fundamento del uso de vacunas como estrategia terapéutica consiste en inducir en el huésped respuesta inmune mediada por células contra las células malignas autólogas como una manera de eliminar el tumor y conseguir una protección a largo plazo contra recurrencias. Una de las estrategias de vacunación que se está utilizando se basa en el uso de células leucémicas autólogas modificadas *ex vivo*. Para ello se ha usado un vector adenoviral para transducir células de LLC-B de manera que sean capaces de expresar el gen que codifica para CD154 (ligando de CD40). Aparte de la expresión de CD154, CD40 es anclado de manera efectiva a la membrana de las células transducidas y de células leucémicas vecinas (efecto "bystander"), induciéndolas a que expresen antígenos co-estimulatorios tales como CD80 y CD86, permitiendo que ambas puedan presentar antígenos a las células T autólogas de manera de inducir una respuesta inmune productiva. En los casos estudiados en ensayos clínicos de fase I, no hubo una dosis limitante de toxicidad y se obtuvieron respuestas clínicas significativas, incluyendo reducción en el número de células leucémicas y en el tamaño de nódulos linfáticos y bazo utilizando este tipo de estrategias<sup>128</sup>.

## **9.2. INVESTIGACION CLINICA FUTURA EN LLC-B.**

Existen varias áreas en las cuales se centraliza la investigación clínica en la LLC-B. En primer lugar está el hecho de cómo evaluar e incorporar los nuevos factores pronóstico en el manejo de la terapéutica de estos pacientes. Un hecho importante incluye el estudiar si alguno o varios de estos factores vinculados a pronóstico pueden ser usados en la identificación de pacientes de alto riesgo, y si una intervención temprana en este tipo de pacientes podría tener impacto en mejorar su supervivencia. Además, la identificación de factores que puedan dirigir un determinado tratamiento, tal como lo es la presencia de del17p y el uso de Alemtuzumab, es otra de las áreas más atractivas en este tipo de investigación.

Las investigaciones actuales también están centradas en la comprensión de los defectos inmunes que desarrollan los pacientes con LLC e intentan desarrollar inmunoterapias activas y efectivas para corregir estos defectos y tratar la enfermedad. Actualmente, una estrategia potencialmente "curativa" es el trasplante alogénico de células madre, que tiene como base terapéutica el desarrollo de una respuesta inmune en el paciente contra el clon leucémico. Por esta y otras razones, la inmunoterapia sigue siendo la promesa para la eventual cura de la enfermedad.

Sin dudas, una mejora en la comprensión de la biología de esta patología, incluyendo sus bases moleculares, identificando mecanismos patogénicos diferenciales entre los subgrupos moleculares de la enfermedad, permitirá el desarrollo de tratamientos más efectivos y precisos y sobre todo, eventualmente curativos.

## **II. HIPOTESIS y OBJETIVOS**

## 1. HIPOTESIS

La LLC-B es una patología que comprende formas clínicas muy heterogéneas, que se corresponden con variables como el estado mutacional de IgV<sub>H</sub>, mutaciones en BCL-6, alteraciones cromosómicas o expresión de CD38 y ZAP70. Estas diferencias influyen en la supervivencia y tiempo libre de tratamiento en los estadios A de la enfermedad. La hipótesis de este trabajo se basa en encontrar diferencias a nivel de perfiles genómicos y funcionales de los diferentes grupos moleculares de LLC-B y, haciendo uso e integrando la información obtenida a partir de los datos que se pudieran encontrar a nivel de expresión génica y ensayos funcionales (sistemas de co-cultivo, resistencia a la inducción de apoptosis por fármacos) hallar genes y rutas implicados en la génesis de los distintos grupos moleculares de LLC-B en estadio A que permitieran identificar posibles dianas diagnósticas/ pronósticas para cada uno de éstos grupos.

Uno de los puntos interesantes a valorar es el de los mecanismos de apoptosis de las células LLC-B de pacientes en estadio A de Binet, en especial, a través de la implicación del sistema NF $\kappa$ B, tanto en condiciones de cultivo clásico, como también en modelos de co-cultivo *in vitro*, que intentan reproducir el microambiente de las células de LLC *in vivo*, correlacionando los resultados con diferentes variables biológicas y moleculares. El estudio de quimiosensibilidad a nuevos fármacos que actúan bloqueando NF $\kappa$ B (como el Bortezomib), usando estos modelos, intenta aproximarnos a conocer su mecanismo de acción en LLC y ver cómo influye el microentorno celular en la respuesta a este tipo de agentes en los diversos compartimentos celulares. Además conocer cómo está condicionada por las características biológicas de cada subgrupo molecular de LLC-B, ya que actualmente la LLC-B se considera una enfermedad con cierta heterogeneidad y con evoluciones clínicas diferentes dependiendo del estado mutacional de los genes de IgV<sub>H</sub> y BCL-6. Hasta el momento, la biología subyacente en estos grupos no se conoce extensamente por lo que sería necesario explicar qué procesos biológicos o vías metabólicas/ de señalización están involucrados en el comportamiento diferencial que muestran tanto *in vivo* como *in vitro* las células de LLC-B.

Tanto los estudios de caracterización de mutaciones somáticas, estudios funcionales, como los sistemas de co-cultivo y el estudio de sensibilidad a drogas, podrían aclarar aspectos vinculados a los mecanismos o vías metabólicas y de

señalización implicados en el comportamiento diferencial de los grupos. Asimismo, el conocimiento del perfil genómico de los pacientes pertenecientes a los distintos grupos, de acuerdo al estado mutacional de IgV<sub>H</sub> y BCL-6, no solo permitirá conocer los genes marcadores de dichas diferencias sino también las posibles vías implicadas en los fenómenos de resistencia a la apoptosis y proliferación celular, las que pueden sugerir nuevas vías de abordaje terapéutico en esta patología y nuevos marcadores de pronóstico y dianas terapéuticas en la LLC-B.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Valorar la implicación de las mutaciones en IgV<sub>H</sub> y BCL-6 como responsables de la heterogeneidad en el comportamiento biológico, respuesta a fármacos y expresión génica en la LLC-B e identificar nuevos marcadores subrogados de las mutaciones en IgV<sub>H</sub> y de pronóstico en estadios tempranos de la enfermedad.

### 2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Evaluar el estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub> en muestras de LLC-B mediante el protocolo BIOMED2 modificado y valorar su utilidad.
2. Realizar secuenciación de la región 5' no codificante del gen BCL-6 y correlacionar polimorfismos y mutaciones en este gen con su expresión determinada por PCR a tiempo real (RTqPCR).
3. Realizar estudios de quimiosensibilidad a Btz y BAY11 (inhibidores de proteasoma y NFκB) en sistemas de cultivo *in vitro* y correlacionarlos con las mutaciones en IgV<sub>H</sub> y BCL-6.
4. Realizar estudios de supervivencia *vs.* apoptosis en sistemas de cultivo a fin de evaluar la contribución del microentorno en los mecanismos de apoptosis en LLC-B y correlacionarlos con el estado mutacional de IgV<sub>H</sub> y BCL-6.
5. Estudiar la firma molecular de la LLC-B mediante el uso de micromatrices de alta densidad, identificando vías metabólicas o términos de ontología génica que estuvieran sobrerrepresentados en esta patología.

6. Estudiar el perfil de expresión génica en distintos grupos moleculares de LLC-B con el fin de identificar genes y vías metabólicas diferencialmente expresados como probables responsables del comportamiento heterogéneo de esta leucemia.
7. Validar los resultados obtenidos del estudio transcritoómico, mediante el uso de la tecnología de RTqPCR.
8. Validar biológicamente los marcadores identificados en un grupo independiente de muestras.
9. Valorar la utilidad de los genes seleccionados como marcadores de pronóstico en LLC-B.

### **III. PACIENTES Y METODOS**

## 1. PACIENTES Y MUESTRAS

Este estudio fue aprobado por los Comités de Ética de los Hospitales intervinientes, y sigue los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes fueron informados acerca de la realización de este estudio y firmaron un consentimiento autorizando el uso en investigación de las muestras que les fueron extraídas. Se recogieron muestras de sangre de 74 pacientes diagnosticados de LLC-B, en estadio A de Binet (36 usadas para la caracterización inicial y 38 en el grupo de validación), con edad media de 67.4 años (42 - 86), de los cuales el 56.7 % (42/74) eran varones. El diagnóstico clínico de todos los pacientes se basó en criterios morfológicos e inmunofenotípicos estándar.

En el estudio de perfiles genómicos se incluyeron 36 pacientes, distribuidos de la siguiente manera según el estado mutacional de los genes  $IgV_H$  y BCL-6: 15 eran mutados para  $IgV_H$  y no mutados para BCL-6 (G1), 9 eran mutados para ambos genes (G2) y los restantes 12 eran no mutados tanto en  $IgV_H$  como en BCL-6 (G3). Las características clínicas y biológicas de los pacientes incluidos en el estudio transcriptómico se detallan en la Tabla 4.

Para la validación de los resultados obtenidos de las micromatrices de ADN se usaron muestras de otros 38 pacientes, no incluidos en el estudio de perfiles de expresión génica, al que denominaremos grupo de validación ( $IgV_H$  mutado= 30;  $IgV_H$  no mutado= 8).

En todos los casos, las muestras de sangre venosa heparinizada extraídas por venopunción, fueron usadas para obtener células mononucleadas (PBMC) por gradiente de centrifugación en Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™) y aquellas muestras que contenían al menos un 80% de células B CD5+/CD19+ (medidas por citometría de flujo) fueron analizadas posteriormente. Las muestras fueron criopreservadas en  $N_2$  líquido en medio RPMI con 40% de suero bovino fetal y 10 % de DMSO hasta su utilización.

Como material de referencia para la comparación de perfiles de expresión, se utilizaron 11 bolsas de sangre provenientes de donantes sanos anónimos procedentes del Centro de Transfusión de Valencia.

**TABLA 4:** Características de los pacientes incluidos en el estudio de perfiles genómicos

Muestra	SEXO <sup>a</sup>	EDAD <sup>b</sup>	LEU <sup>c</sup> X10 <sup>9</sup> /l	LINF <sup>d</sup> X10 <sup>9</sup> /l	MORF <sup>e</sup>	Score <sup>f</sup>	HB <sup>g</sup> g/l	Plaq <sup>h</sup> X10 <sup>9</sup> /l	TDL <sup>i</sup>	LDH UI/l	β2m <sup>j</sup> mg/l	FISH <sup>k</sup>	IgV <sub>H</sub>	BCL-6	ZAP70 %	CD38 %
H1	F	60	9,2	5,3	2	2	11,7	242	>12m	151,46	1,9	0	Mut	No mut	69	85
H2	M	69	13,4	6,4	1	4	14,2	157	>12m	146,25	1,5	13q-	Mut	No mut	9	3
H3	F	42	12,2	7,5	1	4	14,1	205	>12m	135,83	1,0	13q-	Mut	Mut	11	3
H4	F	58	21,3	15,1	1	4	13,0	220	>12m	131,46	1,6	ND	Mut	Mut	18	22
H5	M	57	13,6	9,9	1	4	14,6	138	>12m	116,25	2,6	11q-	No mut	No mut	10	95
H6	M	80	16,2	10,5	2	4	15,9	149	>12m	243,33	2,0	ND	No mut	No mut	93	86
H7	M	59	14,7	9,2	1	3	15,0	166	>12m	143,96	1,2	0	Mut	No mut	3	18
H8	F	68	56,4	49,5	1	4	13,9	152	>12m	161,46	1,2	0	Mut	Mut	7	98
H9	M	67	12,7	8,1	1	4	15,7	155	>12m	141,88	1,2	0	Mut	No mut	12	6
H10	M	55	17,6	12,2	2	3	16,2	166	>12m	115,42	1,8	0	No mut	No mut	96	14
H11	M	67	18,2	12,7	1	4	15,2	136	>12m	154,38	1,5	13q-	Mut	No mut	1	1
H12	F	70	19,0	14,4	1	5	12,6	288	>12m	92,29	ND	0	Mut	No mut	3	14
H13	M	72	9,9	9,8	2	4	14,6	214	ND	115,42	2,0	+12	No mut	No mut	27	59
H17	M	60	17,9	9,5	1	4	16,2	382	>12m	ND	1,2	ND	No mut	No mut	23	42
H18	M	77	60,2	49,0	1	4	14,4	151	>12m	148,75	1,7	ND	No mut	No mut	10	25
H20	F	55	11,8	8,3	1	5	12,7	222	>12m	126,67	1,8	0	No mut	No mut	9	6
H22	F	67	10,0	8,4	ND	3	ND	215	>12m	ND	ND	+12	Mut	Mut	7	3
H23	F	50	13,4	7,1	1	4	13,4	207	>12m	125,83	1,2	0	No mut	No mut	42	4
H24	M	58	12,2	6,5	1	5	14,7	204	>12m	154,38	1,2	0	Mut	No mut	4	1
H26	M	58	12,7	5,6	ND	4	14,0	254	>12m	115,42	2,1	0	Mut	No mut	9	6
H27	M	64	44,7	37,3	1	4	14,0	191	>12m	109,79	1,1	13q-	Mut	Mut	3	7
H31	F	68	26,2	18,1	2	4	12,8	198	>12m	135,83	1,3	0	Mut	Mut	ND	11
H32	F	53	13,0	8,0	ND	4	12,1	268	ND	140,21	0,7	0	Mut	Mut	58	4
H35	M	66	13,2	8,8	1	4	13,7	214	>12m	132,29	8,9	ND	Mut	Mut	7	7
H36	M	85	12,0	6,0	2	4	11,3	276	>12m	ND	ND	11q-	Mut	No mut	87	79
H37	M	61	11,7	7,59	1	4	15,2	226	>12m	117,50	1,4	ND	No mut	No mut	10	2
H38	M	70	14,8	7,8	2	4	14,8	265	>12m	160,42	1,2	+12	No mut	No mut	95	30
H39	F	79	11,7	7,1	2	4	14,5	232	>12m	258,33	3,4	0	No mut	No mut	30	95
H40	M	55	9,4	5,8	1	2	13,2	122	<12m	108,54	1,3	13q-	Mut	Mut	1	1
H42	F	64	27,4	20,4	1	4	13,3	263	>12m	98,13	0,2	ND	Mut	No mut	0	1
H43	F	74	11,3	5,5	ND	4	12,8	204	ND	183,13	1,3	0	Mut	No mut	7	27
H47	M	82	19,2	16,3	ND	4	13,7	195	>12m	111,46	2,9	13q-	Mut	No mut	5	14
H48	F	65	10,6	7,4	ND	5	13,0	186	ND	ND	ND	13q-	Mut	No mut	52	22
H49	M	71	18,9	11,9	1	4	16,6	292	>12m	124,38	1,7	13q-	Mut	No mut	11	4
H51	M	73	15,7	10,0	2	4	12,3	226	ND	156,25	2,5	+12	No mut	No mut	25	34
H52	M	47	14,40	10,0	1	5	14,8	210	>12m	98,33	1,2	0	Mut	No mut	15	ND

Todas las muestras corresponden a pacientes en estadio A de Binet, <sup>a</sup> Sexo: F=mujer, M=varón; <sup>b</sup> Edad al diagnóstico expresada en años; <sup>c</sup>LEU: nº de leucocitos, <sup>d</sup>LINF: linfocitos, <sup>e</sup>Morfología: 1= típica, 2= atípica, ND= no se disponen de datos; <sup>f</sup>Score inmunológico según Moreaux y Matutes (Am J Clin Pathol, 1997; 108:378); <sup>g</sup> HB: hemoglobina, <sup>h</sup>Plaq: nº de plaquetas, <sup>i</sup>TDL: tiempo de duplicación linfocitario >12m : mayor de 12 meses, < 12 meses: menor de 12 meses, ND: no hay datos; <sup>j</sup>β2m: beta-2 microglobulina; <sup>k</sup>FISH: 13q- = del 13q, 11q- = del 11q22-q23:ATM, +12= trisomía 12, 0= sin alteraciones con las sondas utilizadas, ND= no hay datos disponibles.

## 2. ANALISIS MUTACIONAL DE GENES IgV<sub>H</sub> y BCL-6

Se extrajo ADN genómico a partir de muestras de células mononucleares criopreservadas utilizando el GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (GE Healthcare) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron amplificaciones por PCR de los genes IgV<sub>H</sub> y BCL-6 siguiendo los protocolos descritos por Matthews *et al*<sup>137</sup> y Migliazza *et al*<sup>138</sup>, respectivamente (ver secuencias en las Tablas 5 y 6). Brevemente, para realizar la amplificación por PCR de IgV<sub>H</sub> se usaron los siguientes reactivos: cebadores del protocolo Biomed2<sup>139</sup>, y en caso de ser necesario, cebadores correspondientes a la región líder<sup>140</sup> a una concentración 0.2 μM, 500 ng de ADN, 2 U de Taq ADN polimerasa Platinum (New England Biolabs) y 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>. La PCR consistió en 35 ciclos de: desnaturalización a 95°C 30 seg, anillado a 58°C 30 seg y extensión a 72°C 30 seg. Para BCL-6 se utilizaron 200 ng de ADN, cebadores a concentración 0.5 μM, e iguales cantidades de MgCl<sub>2</sub>, Taq polimerasa y condiciones de ciclado que en IgV<sub>H</sub>.

**TABLA 5: Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del gen IgV<sub>H</sub>.**

<b>Cebadores específicos de familia (región FR1) (sentido)</b> <sup>137, 139</sup>	
VH1-FR1	5' GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG 3'
VH2-FR1	5' GTCTGGTCTACGCTGGTCAAACCC 3'
VH3-FR1	5' CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG 3'
VH4-FR1	5' CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG 3'
VH5-FR1	5' CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT 3'
VH6-FR1	5' TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG 3'
<b>Cebadores correspondientes a la región líder (sentido)</b> <sup>140</sup>	
VH1	5' TCACCATGGACTGGACCTGGAG 3'
VH2	5' ATGGACATACTTTGTTCCACGCTC 3'
VH3	5' CCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGG 3'
VH4	5' ACATGAAACAYCTGTGGTTCTTCC 3'
VH5	5' ATGGGGTCAACCGCCATCCTCCG 3'
VH6	5' ATGTCTGTCTCCTTCTCATCTTC 3'
<b>Cebadores consenso (antisentido)</b> <sup>137, 139</sup>	
JH consensus	5' CTTACCTGAGGAGACGGTGACC 3'
JH consensus 2	5' ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT 3'

**TABLA 6: Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del gen BCL-6<sup>138</sup>.**

<b>E1.21C</b> (sentido)	<b>5' CTCTTGCC AA GC TTG 3'</b>
E1.24 (antisentido)	5' TAATTCCCCTCCTTCCT 3'
E1.23 (sentido)	5' AGGAAGGAGGGGAATTAG 3'
E1.P1.6 (antisentido)	5' AAGCAGTTTGCAAGCGAG 3'
E1.P1 (sentido)	5' TTCTCGCTTGCAAAGTGC 3'
<b>E1.26</b> (antisentido)	<b>5' CACGATACTTCATCTCATC 3'</b>

En negrita, el par de cebadores utilizados en la amplificación inicial. En caso de detectarse mutaciones, se procede a secuenciar nuevamente con cebadores internos para confirmación.

Después de purificar los productos de PCR, se realizó secuenciación directa de ambas cadenas, en todos los casos. Las mutaciones en el gen BCL-6 fueron identificadas por comparación con la secuencia germinal (GenBank AF191831). Las secuencias de IgV<sub>H</sub> se alinearon con las de la línea germinal más cercana usando las bases de datos BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>), V-Base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), e IMGT ([http://imgt.cines.fr/IMGT\\_vquest/vquest](http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest)), considerándose mutadas aquellas secuencias con una desviación >2% de la secuencia germinal. En el caso de encontrar homologías cercanas al 98%, se realizó una nueva secuenciación usando cebadores correspondientes a la región líder.

### 3. DETERMINACION DE ZAP70 POR CITOMETRIA DE FLUJO

La determinación de ZAP70 por citometría de flujo, se realizó siguiendo el protocolo de Crespo *y col* modificado<sup>60</sup>. Básicamente, PBMC fueron fijadas y permeabilizadas usando el IntraStain kit (Dako), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron incubadas con 1.5 µg de anticuerpo anti-ZAP, clon 2F3.2 (Upstate) o control de isotipo: anti-Mouse IgG2a, clon GC270 (Chemicon) durante 20 min a temperatura ambiente, seguido de lavados y tinción con anticuerpo anti Mouse F(ab')<sub>2</sub>-FITC (Dako) durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se realizaron nuevos lavados y se incubaron las muestras 10 minutos a 37°C con suero normal de ratón al 20%, seguido de lavado e incubación final con los anticuerpos CD3-PE, CD56-PE y CD19PerCP (BD Biosciences), durante 10 minutos más en oscuridad. Luego se procedió a un nuevo lavado y lectura en un citómetro Cytomics F500 (Beckman Coulter). El análisis de las muestras se realizó usando el programa Cytomics CXP (Beckman Coulter). Los análisis se realizaron solo sobre la población linfocitaria, excluyendo "debris", dobletes o monocitos. Se realizaron gráficos biparamétricos para

cuantificar la expresión de ZAP70 en la población T y NK (tinción con CD3+ y CD56+) y en la población B (CD19+). El control de isotipo se utilizó como control de negatividad. Los resultados  $\geq 20\%$  se consideraron positivos.

#### 4. CULTIVOS CELULARES

Células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) se cultivaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 15% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomicina, 4mM de L-Glutamina (todos de Invitrogen) a una densidad de 1.0 x10<sup>6</sup> células/ml. El día del análisis, las células fueron descongeladas, centrifugadas y lavadas dos veces con tampón fosfato (PBS). En las pruebas de respuesta a dosis, las células se cultivaron como se describió previamente con 0.1, 1.0 y 10  $\mu$ M de Bortezomib (Btz) (Velcade®, Millenium Pharmaceuticals) o 5, 10 $\mu$ M BAY 11-7082 (BAY11) (Calbiochem) durante 24 horas; en el caso del ensayo de respuesta a lo largo del tiempo, las células se trataron con 0.1  $\mu$ M Btz o 10 $\mu$ M BAY11 durante 5, 12, 24, 48 y 72 horas. En los experimentos donde se utilizaron inhibidores de caspasas, las células se pre-incubaron durante 1 hora con 100  $\mu$ M de Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK, o Z-LEHD-FMK (Calbiochem) seguido del agregado de Btz o BAY11.

En el caso de los sistemas de co-cultivo, se cultivaron células HS-5 (derivadas de estroma medular) o células HK (derivadas de células dendríticas) en placas de 12 pocillos hasta lograr 80% de confluencia. Luego se agregaron PBMC de 10 pacientes con LLC-B (1 x 10<sup>6</sup>/ml) en medio RPMI 1640 (con 15 % suero bovino fetal, 100 U/ml penicilina, 0.1 mg/ml estreptomicina, 4 mM L-glutamina) con o sin agregado de 0.1  $\mu$ M Btz o 10  $\mu$ M BAY, seguidas de incubación durante 24 – 72 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Luego se determinó apoptosis en las células de LLC mediante citofluorometría.

#### 5. MEDICION DE APOPTOSIS

La apoptosis se analizó mediante doble tinción con AnexinaV-FITC e Ioduro de Propidio (PI) usando el Apoptosis Detection Kit (BD, Pharmingen), y se siguieron las instrucciones del fabricante para su utilización. Se adquirieron 10000 eventos en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). El análisis de datos se realizó usando

el programa Cell Quest. Se definieron como apoptóticas las células con tinción Anexina-V positiva, ya sean PI negativas (apoptosis temprana) o positivas (apoptosis tardía).

## **6. ENSAYO DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA (EMSA)**

Los extractos nucleares para el ensayo de EMSA fueron obtenidos utilizando un kit de aislamiento nuclear (Nuclear isolation kit, Sigma). El oligonucleótido con el sitio de unión consenso para NFkB (Promega) estaba marcado en 3' con digoxigenina 11-ddUTP. El ensayo de retardo se realizó usando el DIG Gel Shift kit, 2nd generation (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 2 µg de extracto nuclear durante 20 minutos a temperatura ambiente en tampón de unión conteniendo 1µg poli d(I-C), 0.1 µg poli L-lisina y 0.8 ng de oligonucleótido marcado. Los complejos ADN-proteína fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida 5% en tampón TBE (0.5X). Luego el gel fue transferido a una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) y los complejos conteniendo oligonucleótido marcado fueron visualizados mediante un ensayo de inmunoenzimología que utiliza un anticuerpo anti-digoxigenina, unido a fosfatasa alcalina, el cual actúa sobre el sustrato CSPD emitiendo quimioluminiscencia.

## **7. EXTRACCION DE ARN E HIBRIDACION CON MICROMATRICES**

Se seleccionaron linfocitos B a partir de muestras de sangre periférica provenientes de 36 pacientes con LLC y 11 muestras de donantes sanos, mediante el uso de Anticuerpos CD19 (BD) y bolas inmunomagnéticas (Microbeads, Miltenyi), obteniéndose una pureza mayor al 97% después de la separación. Se extrajo ARN total a partir de 7-10 x10<sup>6</sup> linfocitos B utilizando columnas de sílica (RNeasy kit de Qiagen). La calidad del ARN fue evaluada mediante medición de absorbancia a 260/280 nm aceptándose solamente aquellas muestras con una relación superior a 1.8. Previo a su hibridación con las micromatrices de ADN, las muestras fueron analizadas mediante un bioanalizador (Agilent) con el fin de verificar la integridad del ARN, procesándose únicamente aquellas en las que no se observó degradación y que además tenían una relación de integridad (cociente 18S/28S) mínima de 1.4.

La hibridación se realizó con el "chip" HG U133 Plus 2.0 (Affymetrix) siguiendo el protocolo de amplificación de un ciclo utilizando 1 µg de ARN total de partida, siendo la cantidad de ARNc biotinilado hibridado de 20 µg. Tanto la hibridación como los lavados

y la captura de lecturas fluorescentes se realizaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las micromatrices de ADN fueron escaneadas en un GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix), actualizado con parche de alta resolución sistema 7G.

## 8. PCR A TIEMPO REAL

Un grupo de genes con expresión diferencial fueron seleccionados para ser validados por PCR cuantitativa a tiempo real (RTqPCR) en 35 muestras (en un caso no se contaba con ARN suficiente). Para ello, se sintetizó ADNc a partir de 1.5µg de ARN usando hexámeros al azar (Invitrogen) y SuperScriptII (Invitrogen), siguiendo el protocolo estándar propuesto por el fabricante. En las reacciones de RTqPCR se usó como gen de control endógeno GUS, según las siguientes condiciones: 750 nM de cebador GUS Forward (GAA AAT ATG TGG TTG GAG AGC TCA TT), 750 nM de cebador GUS Reverse (CCG AGT GAA GAT CCC CTT TTT A) y 200 nM de sonda GUS (6FAM - CCA GCA CTC TCG TCG GTG ACT GTT CA - TAMRA). Los niveles de expresión de los genes que querían validarse, se determinaron usando los ensayos TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) correspondientes a los genes seleccionados: FUT8 (Hs00189535\_m1), ITGA9 (Hs00174408\_m1), CD82 (Hs00174463\_m1), ZAP70 (Hs00277148\_m1), PDLIM5 (Hs00179051\_m1), IFT57 (Hs00215973\_m1), BCL11A (Hs00256254\_m1), BCL7A (Hs00277139\_m1), LPL (Hs00173425\_m1), CRY1 (Hs00172734\_m1), DUSP22 (Hs00169616\_m1), SVH (Hs00259089\_m1), FAHD1 (Hs00540098\_m1) y MGC9913 (Hs00383625\_m1) (los números entre paréntesis corresponden a la identificación de cada ensayo). También realizamos RTqPCR para cuantificar expresión del gen BCL-6 (Hs00153368\_m1). Las reacciones de PCR se hicieron usando 1µl de ADNc proveniente de una dilución 1:5 de la RT realizada sobre 1.5 µg de ARN, TaqMan® Universal Master Mix y TaqMan® Gene Expression Assay, en un volumen final de 20µl, siguiendo las condiciones de preparación de la mezcla y de ciclado recomendadas por el fabricante, en un termociclador LC480 (Roche).

Las eficiencias para cada reacción de amplificación fueron calculadas usando una curva de diluciones seriadas de un calibrador, aplicando la fórmula  $E = (10^{-1/\text{pendiente}})$ . La cuantificación se realizó usando el método de cuantificación relativa con corrección de eficiencia y normalización (Valor Expresión Normalizado =  $E_T^{C_{pT}(C)-C_{pT}(S)} \times E_R^{C_{pR}(S)-C_{pR}(C)}$ , siendo  $E_T$  la eficiencia de amplificación del gen diana;  $E_R$  la eficiencia de amplificación del gen de referencia;  $C_{pT}$  ciclo umbral de detección para el gen diana;  $C_{pR}$  ciclo umbral de detección para el gen de referencia; C Calibrador y S muestra problema). Para ello

los valores del gen diana se normalizaron respecto al valor del gen control endógeno (GUS) de cada muestra, y las variaciones inter-ensayo fueron minimizadas mediante normalización frente a un calibrador externo (muestra que se repite en todos los ensayos, puede ser un cDNA de una línea celular o de un pool de muestras). En la Figura 12 mostramos esquemáticamente como ocurre la reacción de RTqPCR.

La misma metodología de RTqCR fue aplicada en un grupo independiente de 38 muestras (grupo de validación), para corroborar biológicamente si los genes seleccionados sirven como marcadores de pronóstico en la LLC-B. En este grupo se incluyeron 30 muestras con IgV<sub>H</sub> mutado (de las cuales, 17 eran mutadas también en BCL-6) y 8 con IgV<sub>H</sub> no mutado.

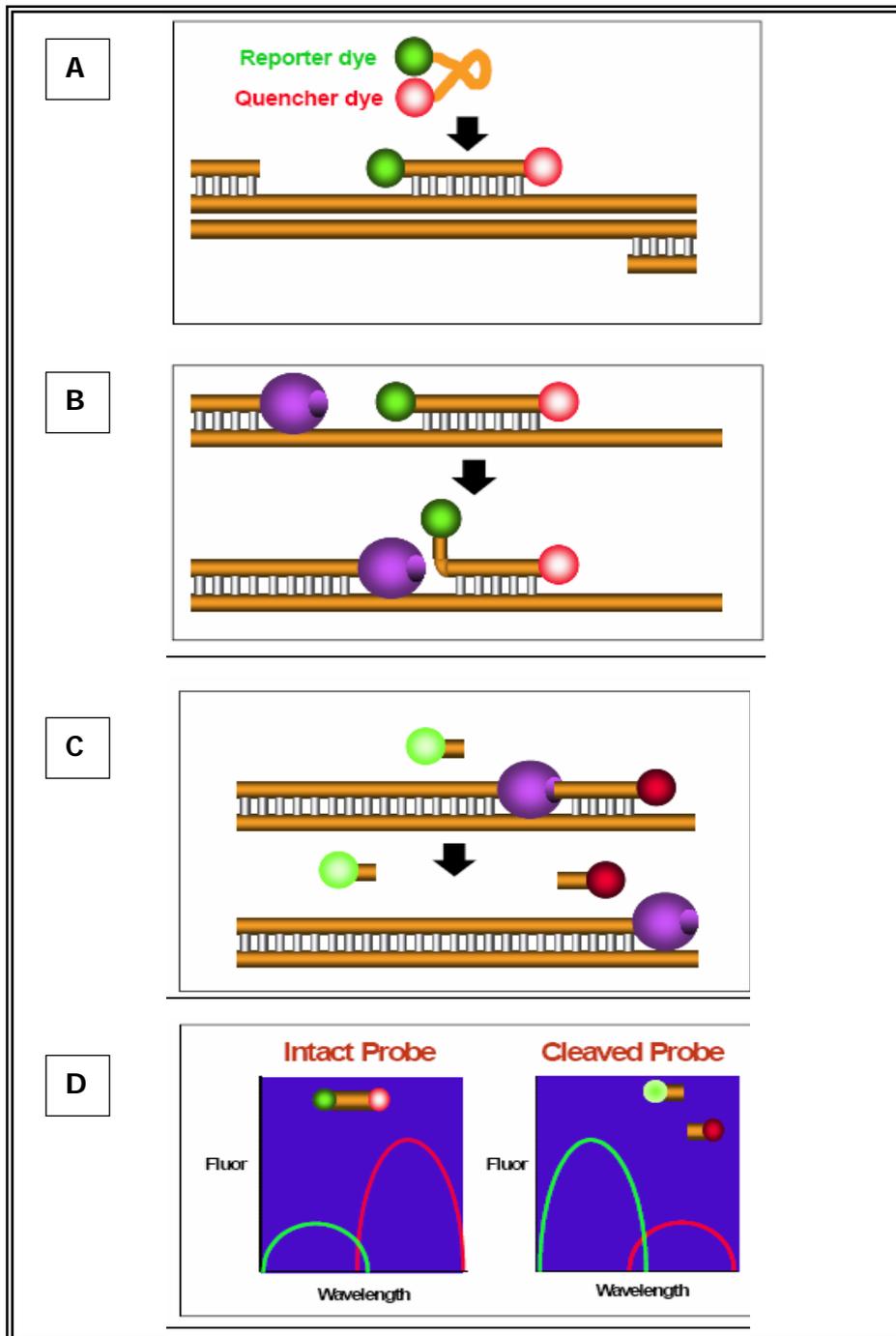
## 9. ANALISIS DE DATOS DE EXPRESION

Para el análisis de los datos de expresión génica hemos utilizado la suite bioinformática GEPAS (Gene Expression Profile Analysis Suite, <http://www.gepas.org>)<sup>141</sup>. En la Figura 13 se muestra una representación esquemática de las prestaciones y utilidades de GEPAS. El módulo GEPAS para normalización y preprocesamiento de datos provenientes de micromatrices de Affymetrix usa la biblioteca "affy" del proyecto Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>). En este caso se utilizaron las opciones rma ("robust multichip análisis"), "quantiles", "pmonly" y "medianpolish". Los 47 archivos .CEL de datos de Affymetrix (controles y pacientes) fueron normalizados de manera conjunta, no existiendo valores perdidos y todos los datos provenientes de las 54675 sondas usadas en la micromatriz de Affymetrix fueron utilizados para el análisis.

Los métodos UPGMA<sup>142</sup> y SOTA<sup>143</sup> fueron usados para asignar similitudes entre condiciones biológicas, demostrando que la expresión génica puede discriminar, al menos entre muestras controles y leucémicas.

La prueba t de Student fue usada para evaluar la expresión diferencial entre dos grupos de pacientes. El método de Benjamini y Hochberg<sup>144</sup> fue usado para corregir los valores de p para pruebas múltiples, controlando la relación de descubrimientos falsos (FDR). El estadístico t fue usado también para ordenar los genes de acuerdo a su expresión diferencial entre dos grupos de pacientes. Los genes son ordenados desde aquellos más expresados en un grupo (valores positivos del estadístico t) hasta los más expresados en el segundo grupo (valores negativos de t), pasando en el medio por los genes que no muestran ninguna expresión diferencial entre los grupos (valores de t cercanos a 0).

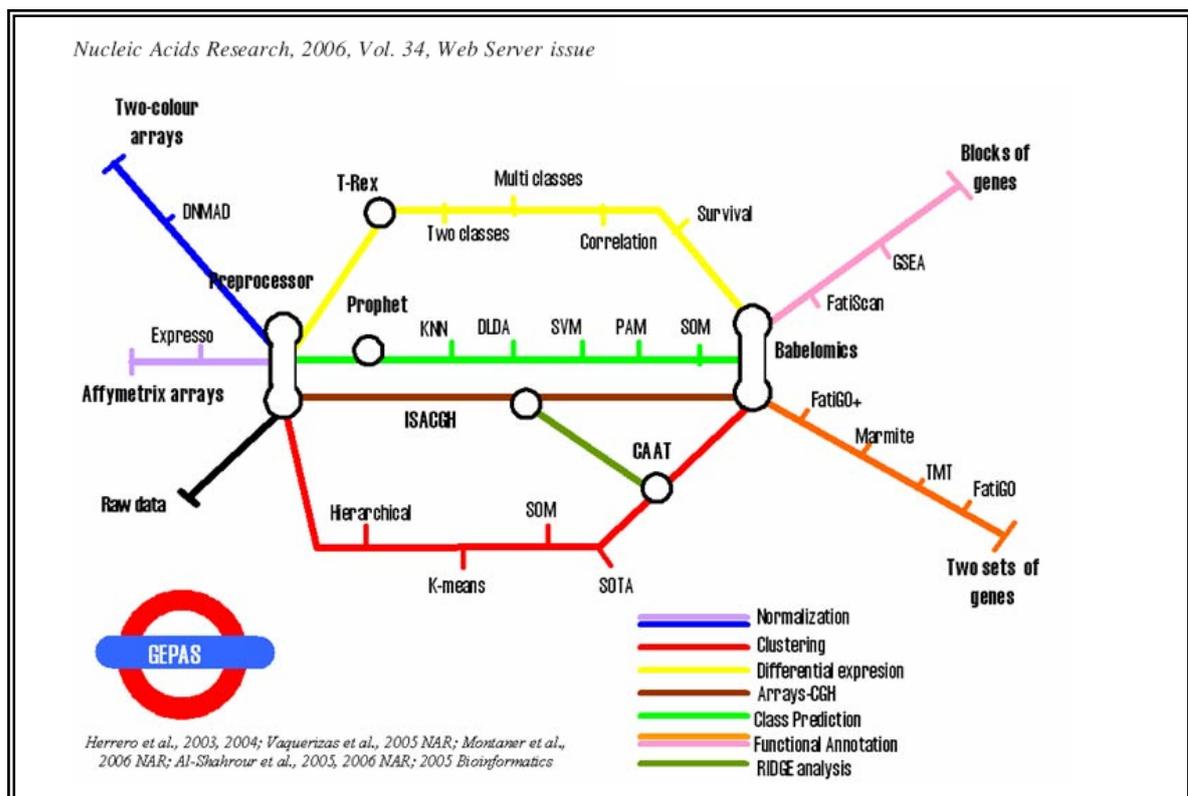
**FIGURA 12:** Detalle de la reacción de 5'-3' exonucleasa utilizada en las RTqPCRs con tecnología TaqMan®



**A.** Un oligonucleótido marcado con un colorante fluorogénico, denominado sonda TaqMan® se agrega a la mezcla de la PCR. Esta sonda híbrida con la secuencia blanco ubicada entre los dos cebadores. **B.** Los cebadores sentido y antisentido son extendidos por la Taq polimerasa como en una reacción de PCR tradicional. A medida que la polimerasa extiende el primer, la sonda es desplazada. **C.** La actividad nucleasa inherente a la polimerasa, es capaz de liberar el marcador fluorogénico (reportero) de la sonda. **D.** Una vez que éste es liberado de su captura (por el secuestrador) se genera una señal fluorescente.

Esta lista ordenada de genes fue luego analizada con la herramienta FatiScan en Babelomics (<http://www.babelomics.org/>)<sup>145</sup> en búsqueda de bloques de genes funcionalmente relacionados y coordinadamente sobreexpresados en uno u otro grupo de pacientes. En el estudio de perfiles funcionales se incluyen términos de ontología génica (GO) (<http://www.geneontology.org/>) y vías metabólicas o de señalización KEGG (<http://genome.jp/kegg/>). FatiScan implementa un algoritmo de segmentación basado en la prueba exacta de Fisher e incluye una corrección de p valores por el método de Benjamini y Hochberg<sup>144</sup>. Esta metodología tiene dos ventajas principales, en primer lugar, aumenta el poder de las pruebas estadísticas aplicadas anteriormente al analizar bloques de genes que tal vez de manera aislada no lleguen a tener significación estadística, y en segundo lugar, desvía el centro de interés del estudio del estudio de genes de manera individual hacia un estudio de bloques funcionales, ayudándonos en la interpretación de los resultados.

**FIGURA 13:** Mapa de las funcionalidades de las herramientas de la suite bioinformática GEPAS.



Los datos (Affymetrix, arrays de dos colores) son introducidos desde el lado izquierdo y pasan a través de un pre-procesador. Luego se pueden realizar diferentes tipos de análisis supervisados: selección de genes (T-rex) en diferentes situaciones (dos o mas clases, correlación o supervivencia) o descubrimiento de clases (Tnasas). Los datos de Arrays-CGH pueden analizarse a través de ISACGH. También se pueden realizar análisis no supervisados, usando diferentes métodos: CAAT permite encontrar genes co-expresados en sus coordenadas cromosómicas permitiendo el estudio de RIDGES. Todas las herramientas finalizan en Babelomics, que permite dos tipos de análisis diferentes: comparación de dos grupos de genes o bloques de genes funcionalmente relacionados.

## 10. ANALISIS ESTADISTICOS

Todas las pruebas estadísticas realizadas (excluyendo el análisis de los datos de micromatrices de ADN) se hicieron usando el paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows. Se empleó la prueba no-paramétrica de Mann-Whitney para evaluar la significación estadística de las diferencias entre dos grupos de pacientes (por ejemplo casos mutados vs. no-mutados) tanto en los experimentos de susceptibilidad a la apoptosis inducida por fármacos, cocultivos, como en los de RTqPCR. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

Para la evaluación de los marcadores seleccionados usamos el área bajo la curva ROC y las mediciones de sensibilidad y especificidad. La elección del valor de corte óptimo se realizó mediante índice de Youden<sup>146</sup>.

Dado que el evento más frecuentemente observado en nuestra población (todos estadios A de Binet) fue la progresión de la enfermedad, hemos evaluado el tiempo desde el diagnóstico hasta la progresión o bien hasta la fecha del último seguimiento. Los análisis de supervivencia libre de progresión se realizaron, entonces, considerando como evento la necesidad de instaurar tratamiento, y para la construcción de las curvas se utilizó el método de Kaplan-Meier y la significación estadística fue calculada mediante prueba de log-rank. Dado el seguimiento limitado de la serie no se realizaron los análisis de supervivencia global.

**IV. RESULTADOS: CAPITULO I  
ESTUDIOS FUNCIONALES EN LLC-B**

## 1. CARACTERIZACION DE LAS MUTACIONES EN IgV<sub>H</sub> y BCL-6. CORRELACIONES CON EXPRESION Y FUNCION.

### 1.1. MUTACIONES EN IgV<sub>H</sub>.

Se realizó secuenciación de la región variable de la cadena pesada del gen de las inmunoglobulinas en 74 muestras de pacientes con LLC-B en estadio A. De todas las muestras analizadas, 54 resultaron mutadas en IgV<sub>H</sub> (73.0%) mientras que las 20 restantes fueron no mutadas (27.0%). En el caso de que la homología con la línea germinal más cercana fuera cercana al 98%, se realizó una nueva secuenciación con cebadores flanqueando la región líder para confirmar el porcentaje de homología.

En toda la cohorte, los fragmentos más utilizados fueron: VH3 (33/74), VH1 (18/74) y VH4 (14/74) (ver detalles en la Tabla 7).

Entre las muestras mutadas, las familias VH3 (48.1%), VH4 (22.2%) y VH1 (14.8%) fueron las más comúnmente usadas. Los genes más utilizados en este grupo de muestras fueron VH2-5 (11.1%), VH3-7 (11.1%) seguidos de VH3-23 (9.3%), VH3-30, VH1-3 y VH4-34 (7.4% cada uno).

Entre las muestras no mutadas en IgV<sub>H</sub>, el gen más usado fue el VH1-69 en el 30% de los casos (6/20), seguido del VH3-33 en el 15 % de las muestras estudiadas (3/20).

La mayoría de las células tumorales utilizó el fragmento JH6 o JH4.

Resulta interesante comentar que en un caso hemos detectado una duplicación de 12 bp, la cual se encontró en un paciente con IgV<sub>H</sub> mutado y, debido a que la duplicación contenía un número de bases múltiplo de 3, el marco de lectura original no se vio afectado.

En general, hubo coincidencia entre las homologías obtenidas al comparar las secuencias de las muestras con las de las líneas germinales publicadas en las bases de datos de IMGT, V-BASE y BLAST. En algunos casos, existieron pequeñas divergencias en los porcentajes de homología asignados por cada base, pero en ningún caso estas divergencias fueron tales como para cambiar el estado de una muestra mutada a no mutada o *vice-versa*.

Cabe destacar que en el caso de la duplicación, debido al tipo de alineamiento que se realiza en cada base de datos, solo BLAST fue capaz de hacerlo correctamente.

### 1.2. MUTACIONES EN EL GEN BCL-6.

BCL-6 es un gen blanco del proceso de SHM en linfocitos B normales, tal como ocurre con el gen de IgV<sub>H</sub>. La región 5' no-codificante de este gen es la más frecuentemente afectada por estos cambios somáticos<sup>54</sup>.

**TABLA 7:** Distribución de las mutaciones en IgV<sub>H</sub> en muestras de LLC-B en estadio A de Binet

VH (n=74)	Familia	IgV <sub>H</sub> mutado	IgV <sub>H</sub> no mutado
VH3 n=33	3-7	6	
	3-23	5	
	3-30	4	1
	3-30-3	1	
	3-33		3
	3-9	1	1
	3-72	2	
	3-74	2	
	3-11	1	
	3-20		1
	3-21	1	
	3-48	1	
	3-53	1	
	3-64		1
3-66	1		
		<b>26</b>	<b>7</b>
VH1 n=18	1-69		6
	1-3	4	
	1-2	3	2
	1-8	1	1
	1-58		1
		<b>8</b>	<b>10</b>
VH4 n=14	4-34	4	
	4-61	3	
	4-39	1	2
	4-31	2	
	4-59	2	
		<b>12</b>	<b>2</b>
VH2 n=6	VH2-5	6	
		<b>6</b>	<b>0</b>
VH5 n=2	VH5-51	1	1
		<b>1</b>	<b>1</b>
VH6 n=1	VH6-1	1	
		<b>1</b>	<b>0</b>
<b>TOTAL</b>		<b>54 (73%)</b>	<b>20 (27%)</b>

n= nro de casos, entre paréntesis los porcentajes respecto del total de muestras analizadas

En este trabajo, hemos estudiado las mutaciones en un fragmento de 741 bp del intrón 1 del gen BCL-6, localizado 126 bp corriente abajo del primer exón no-codificante<sup>138,147</sup> (figura 14). El análisis de la secuencia se realizó por secuenciación directa de los productos purificados de PCR, en 69 muestras de nuestra cohorte de

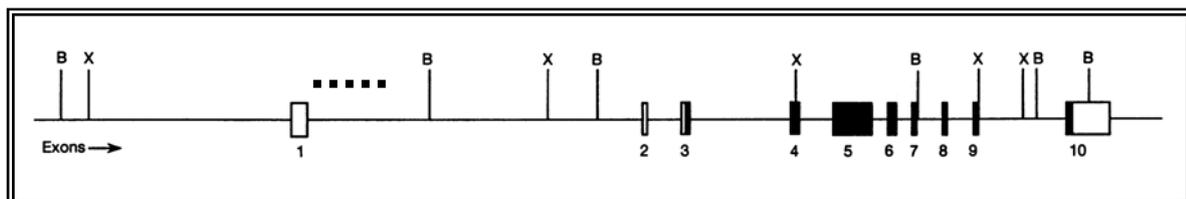
pacientes con LLC-B, en estadio A. De ellas, 20 resultaron mutadas (29.0%), entre las que se observaron un total de 34 mutaciones, de las cuales 3 se repitieron en diferentes casos (31 mutaciones diferentes, en total). Cabe destacar que en todos los casos, las muestras con mutaciones en BCL-6 correspondían a pacientes con mutaciones en el gen  $IgV_H$ .

Las mutaciones en BCL-6 estuvieron representadas por simples sustituciones de nucleótidos, no detectándose inserciones ni deleciones. La base más frecuentemente mutada fue C (12/34, 35.3%), seguida de T (10/34, 29.4%) y G (9/34, 26.5%), en cambio A se encontró mutada en tan solo 3 casos (8.8%). Hemos encontrado dos mutaciones recurrentes en más de un paciente (en las posiciones 88 y 423), y mutaciones a diferentes nucleótidos pero en las mismas posiciones (nucleótidos 105 y 432). La mayoría de las mutaciones encontradas, han sido descritas previamente en linfocitos normales del CG, LLC-B, o bien en otros síndromes linfoproliferativos, reforzando la idea de que este subgrupo de patologías derivarían de células post CG (ver Tabla 8).

También se detectaron tres polimorfismos de línea germinal descritos previamente en muestras de sangre periférica de donantes sanos<sup>34,138,147-150</sup>. La deleción T en posición 520 ( $\Delta T520$ ) fue el polimorfismo más frecuentemente detectado (20/ 69, 29.0%), seguido del cambio de base G>C en la posición 397 (12/ 69, 17.4%, de las cuales dos muestras eran homocigotas 397C) y del cambio G>A en la posición 502 (5/ 69, 7.2%). Los polimorfismos se encuentran distribuidos equitativamente entre muestras BCL-6 mutadas y no mutadas, a excepción del 397 G>C que aparece más frecuentemente en muestras mutadas (5/20, 25%) que en no mutadas (7/49, 14.3%).

La Figura 15 muestra una distribución de las mutaciones a lo largo de la región 5' no codificante del gen BCL-6, en la que se evidencian dos zonas con mayor frecuencia de mutaciones, la primera ubicada entre los nucleótidos 400-499 y la segunda entre los nucleótidos 100-149, referidas a la secuencia germinal GenBank AF191831.

**FIGURA 14:** Representación esquemática del gen BCL-6<sup>138</sup>.



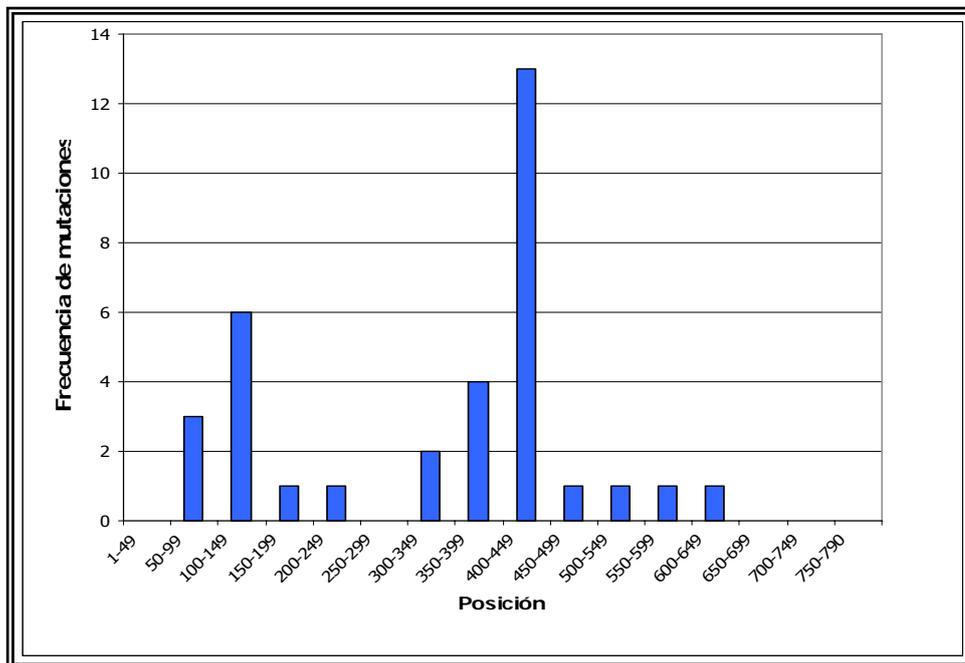
Los exones codificantes y no codificantes se representan por rectángulos llenos y vacíos, respectivamente. La región que sufre SHM y que hemos analizado aparece indicada en línea de puntos (.....).

**TABLA 8:** Mutaciones halladas en el presente estudio en la región 5' no codificante del gen BCL-6. Hallazgos recurrentes en otros síndromes linfoproliferativos.

Nº	Posición	Mutación	Referencias
1	88	C>G	DLBCL <sup>150,151</sup> , FL <sup>151</sup>
2	105	T>C	FL <sup>152</sup> , DLBCL <sup>151</sup>
3	105	T>G	
4	116	A>C	FL <sup>148</sup>
5	122	G>C	DLBCL <sup>150,151</sup> , B-CLL <sup>33,151</sup> , MCL <sup>151</sup> , FL <sup>148,151</sup> , BL <sup>150</sup> , HD <sup>153</sup> , PMBL <sup>154</sup> , GC-B <sup>155</sup>
6	123	C>G	FL <sup>148</sup> , DLBCL <sup>138,151</sup> , HCL <sup>151</sup> , HD <sup>153</sup>
7	138	A>G	
8	189	T>G	DLBCL <sup>138,151</sup> , FL <sup>151</sup>
9	201	T>C	DLBCL <sup>150</sup> , FL <sup>148</sup>
10	347	G>A	DLBCL <sup>151</sup>
11	348	C>T	DLBCL <sup>150</sup>
12	350	T>G	DLBCL <sup>150,151</sup> , FL <sup>151</sup> , BL <sup>150</sup>
13	358	G>T	
14	377	G>A	MALT-NHL <sup>156</sup> , B-CLL <sup>157</sup> , DLBCL <sup>151</sup> , LPL <sup>138,151</sup>
15	396	C>T	
16	401	A>G	B-CLL <sup>157</sup>
17	402	G>C	
18	422	G>A	GC-B <sup>147</sup>
19	423	C>G	DLBCL <sup>138,151</sup> , PMBL <sup>154</sup> , FL <sup>148</sup>
20	426	T>C	PMBL <sup>154</sup>
21	429	C>T	MCL <sup>151</sup> , DLBCL <sup>151</sup>
22	430	T>C	
23	432	C>A	DLBCL <sup>150,151</sup> , BL <sup>150</sup>
24	432	C>T	GC-B <sup>147</sup> , DLBCL <sup>151</sup> , FL <sup>151</sup>
25	433	T>A	DLBCL <sup>151</sup> , FL <sup>148</sup>
26	444	T>C	DLBCL <sup>151,158</sup> , B-CLL <sup>33,151</sup> , MALT-NHL <sup>156</sup>
27	448	G>T	DLBCL <sup>151</sup>
28	474	G>C	
29	501	T>C	
31	597	C>A	B-CLL <sup>34</sup> , DLBCL <sup>151</sup>
31	607	G>A	HD <sup>153</sup>

Abreviaturas: DLBCL: linfoma difuso de células grandes, FL: linfoma folicular, MCL: linfoma del manto, BL: linfoma de Burkitt, HD: linfoma de Hodgkin, PMBL: linfoma de células B primario mediastínico, GC-B: células B de centro germinal, HCL: leucemia de células vellosas, MALT-NHL: linfoma MALT, LPL: linfoma linfoplasmocitoide.

**FIGURA 15:** Distribución de las mutaciones a lo largo de la región 5' no codificante del gen BCL-6.



Las posiciones están referidas a la secuencia germinal GenBank AF191831 que se encuentra localizada corriente abajo del primer exón no codificante del gen.

### 1.3. EXPRESION DEL GEN BCL-6. CORRELACION CON LAS MUTACIONES.

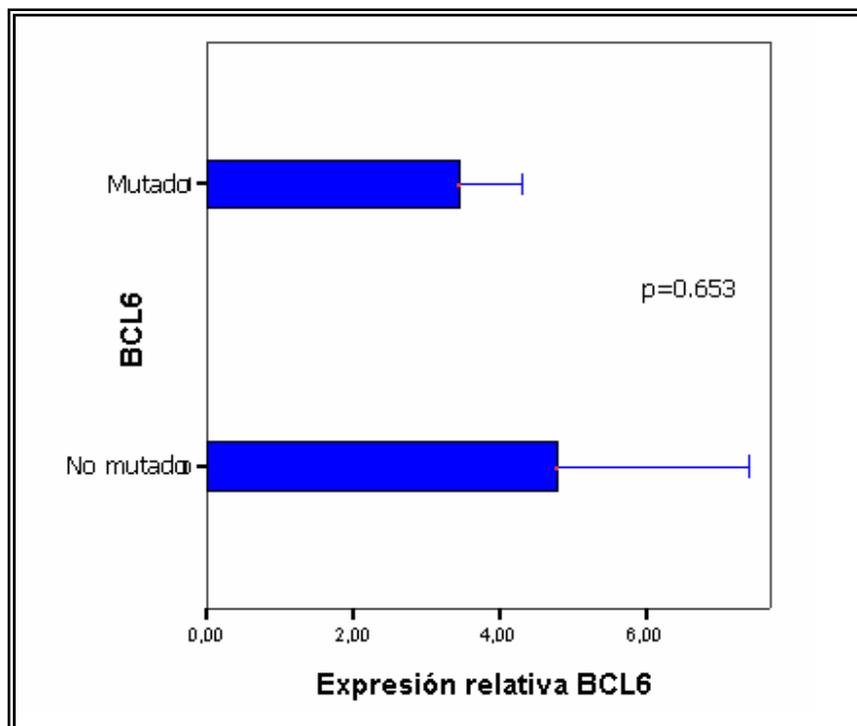
En un trabajo previo de nuestro grupo, se demostró que los pacientes que presentaban mutaciones en los genes BCL-6 e IgV<sub>H</sub> tienen menor tiempo libre de tratamiento que aquellos que presentan mutaciones en IgV<sub>H</sub> pero no en BCL-6<sup>55</sup>, demostrándose que el estudio de ambos genes es importante en el pronóstico de pacientes en estadios tempranos de la LLC-B. Si tenemos en cuenta que la región 5' no codificante del gen BCL-6 contiene importantes elementos regulatorios<sup>54</sup>, sería conveniente determinar si las mutaciones en esta región podrían ser responsables de una expresión diferencial del gen, o simplemente una consecuencia de su mayor inestabilidad genética, marcando solamente su paso a través del CG. Por lo tanto, hemos estudiado los niveles de expresión génica del gen BCL-6 mediante RTqPCR en 69 muestras de pacientes con LLC-B y correlacionado dichos niveles de expresión con la presencia y localización de polimorfismos y mutaciones somáticas dentro de la región 5' no codificante de este gen.

La expresión de BCL-6 a nivel de ARNm fue estudiada en las muestras de LLC en estadio A, agrupadas de acuerdo a la presencia o no de polimorfismos ( $\Delta T520$ , 307

G>C y 502 G>A). En ningún caso pudimos correlacionar diferencias en la expresión del gen BCL-6 con la presencia de un determinado genotipo entre las muestras analizadas.

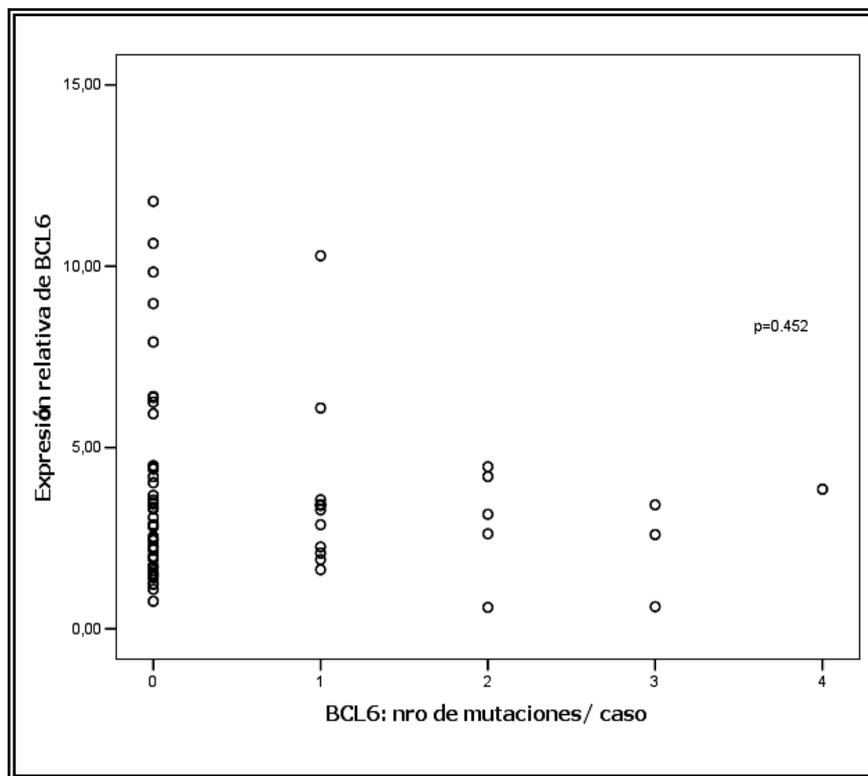
Cuando se realizó un análisis similar, relacionando la expresión relativa de BCL-6 con la presencia o no de hipermutaciones somáticas en este gen (Figura 16), o con el número de mutaciones por caso (Figura 17), tampoco pudimos demostrar diferencias significativas en la expresión entre los grupos estudiados. Otra correlación que se ha analizado es la expresión de BCL-6 con la presencia o no de mutaciones en IgV<sub>H</sub>, y tampoco en este caso se pudo comprobar la existencia de diferencias de expresión entre estos dos grupos. Aún así, llama la atención la observación de niveles desiguales de expresión entre las muestras, que oscilan en un rango entre 0.59 y 11.79, medidos en unidades relativas de expresión, aunque la causa de estas diferencias no la podemos explicar, al menos con este número reducido de pacientes estudiados; quizás al aumentar el tamaño muestral, se pudieran obtener respuestas a esta cuestión.

**FIGURA 16:** Expresión de BCL-6 de acuerdo a la presencia de hipermutaciones somáticas en la región 5' no codificante del gen



La expresión de BCL-6 fue determinada por RTqPCR, expresándolo como concentración relativa respecto a la del gen GUS utilizado como control endógeno y normalizando su valor en relación a un calibrador. Las barras representan la media  $\pm$  2 SEM de cada grupo. La significación estadística fue calculada por prueba de Mann Whitney.

**FIGURA 17:** Correlación entre expresión de BCL-6 y número de mutaciones por caso.



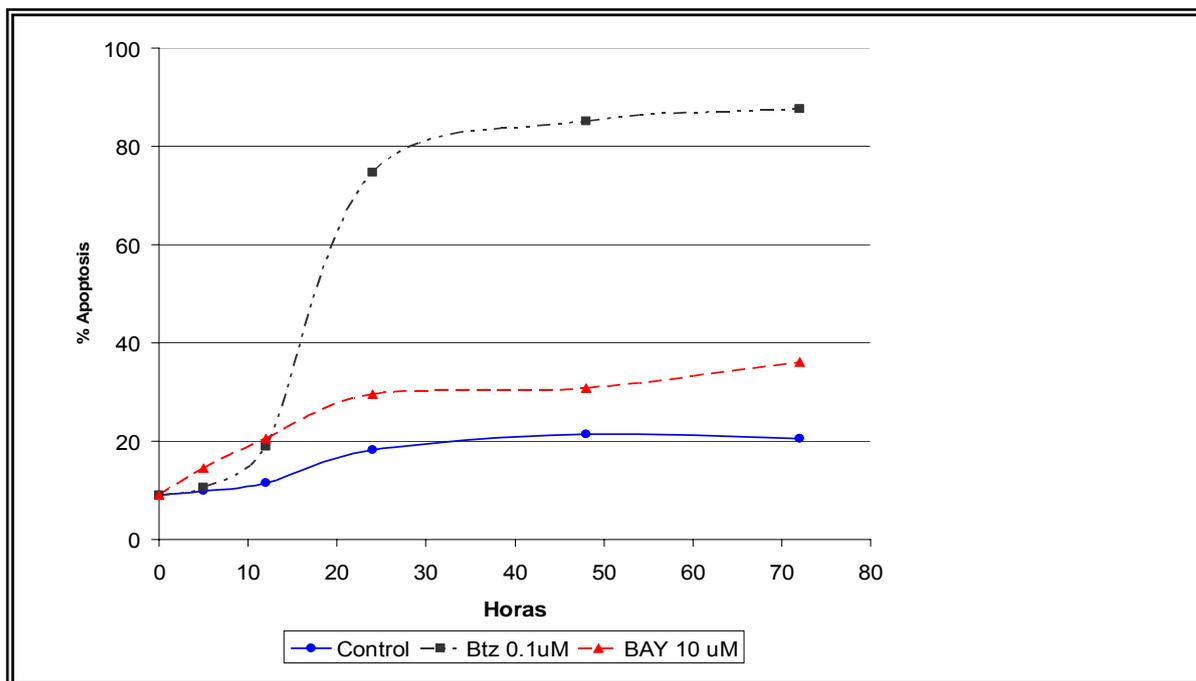
La significación estadística de la correlación fue calculada por prueba de Pearson.

## 2. ENSAYOS FUNCIONALES EN LLC-B: Susceptibilidad a la apoptosis mediada por fármacos que afectan NFκB<sup>159</sup>

### 2.1. RESPUESTA EN EL TIEMPO

Células mononucleadas de sangre periférica de 5 pacientes con LLC-B fueron cultivadas en presencia de 0.1μM de Btz o 10μM BAY o solo con medio de cultivo (células control) y se midió el porcentaje de células apoptóticas después de 5, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación. Después de 12 horas de tratamiento, se pudo constatar una proporción significativa de células apoptóticas, obteniéndose el efecto máximo entre las 24-48 horas de incubación (ver Figura 18).

**FIGURA 18:** Cinética de la inducción de apoptosis por Btz y BAY11-7082 en células de LLC-B.

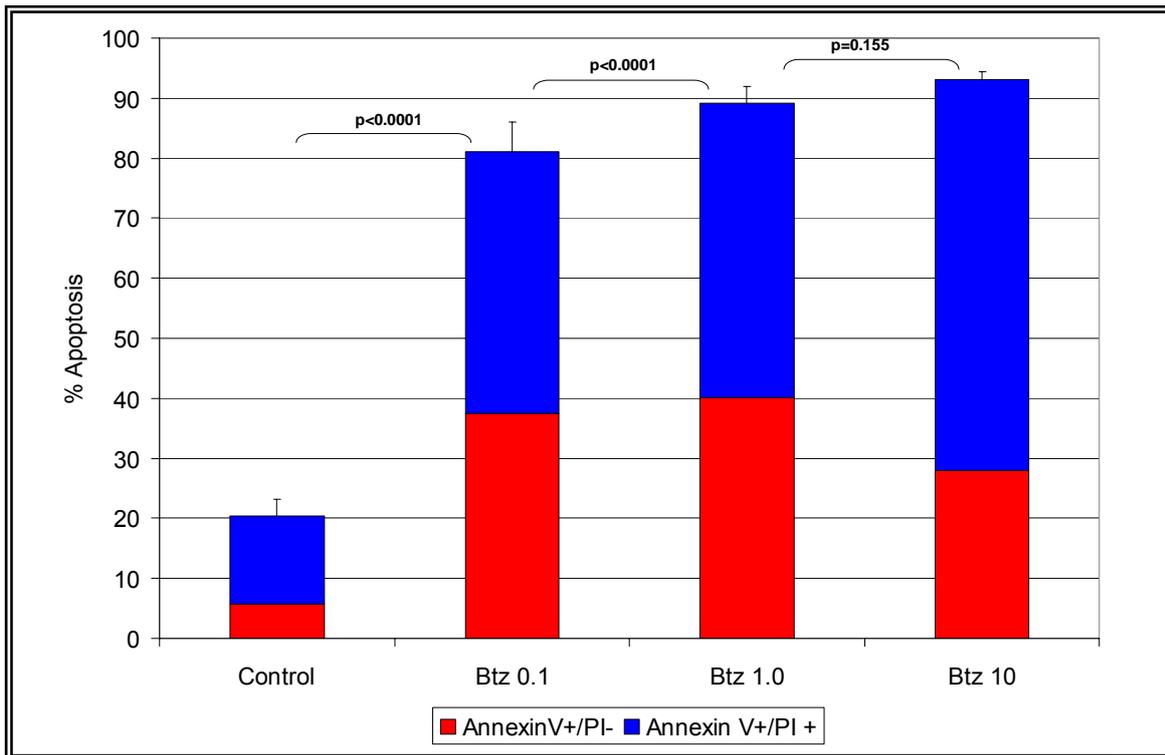


Células de LLC-B aisladas fueron incubadas de 0 a 72 h., solo con medio de cultivo (●) o en presencia 0.1 µM Btz (■) o BAY (▲). Los puntos representan la media de cinco muestras diferentes. Se consideraron apoptóticas las células Anexina V+.

## 2.2. RESPUESTA DOSIS DEPENDIENTE

Los experimentos de respuesta dependiente de la dosis fueron realizados usando diferentes concentraciones de Btz: 0.1µM (n= 27), 1.0µM (n= 23) y 10µM (n= 17) y 24 horas de incubación. En general, se observó una clara diferencia en la inducción de apoptosis entre células tratadas con el fármaco y células control ( $p < 0.0001$ ), y también cuando se usaban dosis crecientes de Btz ( $p < 0.0001$ ), excepto entre las dosis de 1 y 10 µM donde las diferencias encontradas no fueron significativas (ver Figura 19). A partir de estos datos, se escogió la dosis de 0.1µM Btz y un tratamiento de 24 horas de incubación (condiciones en las cuales se encontró un efecto pro-apoptótico considerable) para los experimentos subsecuentes. El cálculo de los porcentajes de apoptosis (células AnexinaV+) se realizó restando al porcentaje de células apoptóticas obtenidas post-tratamiento el de la apoptosis espontánea (células no tratadas).

**FIGURA 19:** Dosis-dependencia de la inducción de apoptosis por Btz en LLC-B.



Células de LLC-B aisladas fueron incubadas 24 h., con medio de cultivo o con 0.1, 1.0 y 10  $\mu\text{M}$  de Btz. Se consideraron apoptóticas las células Anexina V+. Las barras representan la media  $\pm$  2 SEM

### 2.3. DEPENDENCIA DE $\text{NF}\kappa\text{B}$ DE LOS EFECTOS DEL BTZ

Para investigar si los efectos del Btz son dependientes de manera exclusiva de la inhibición de la vía de  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , o bien, si otros mediadores pro/ antiapoptóticos podrían estar involucrados, tratamos las células con BAY11, un inhibidor específico de la fosforilación de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ . Para ello, las células fueron cultivadas en presencia de 0,1 $\mu\text{M}$  Btz o 10 $\mu\text{M}$  BAY11 durante 24 horas (esta dosis de BAY11 era la que demostró tener el máximo efecto en los ensayos de dosis-dependencia, datos no mostrados) para luego ser recogidas y poder medir el porcentaje de células apoptóticas. Los resultados mostraron que ambos compuestos eran capaces de promover apoptosis, pero la magnitud de las respuestas fue significativamente diferente (60.91% vs. 34.79% para Btz y BAY, respectivamente,  $p < 0.001$ ).

Para verificar si tanto Btz como BAY11 eran inhibidores efectivos de la actividad de  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , se realizó ensayo de EMSA a partir de extractos nucleares de células de LLC-B tratadas. De manera consistente con los ensayos de inducción de apoptosis, los resultados mostraron una inhibición de la traslocación de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  al núcleo en células tratadas con Btz y BAY11 en muestras de extractos nucleares de cuatro pacientes

afectados de LLC-B (en la Figura 20 se muestran los resultados correspondientes a un paciente representativo).

**FIGURA 20:** Inhibición de la activación de NF $\kappa$ B por Btz y BAY11-7082 en células de LLC-B.



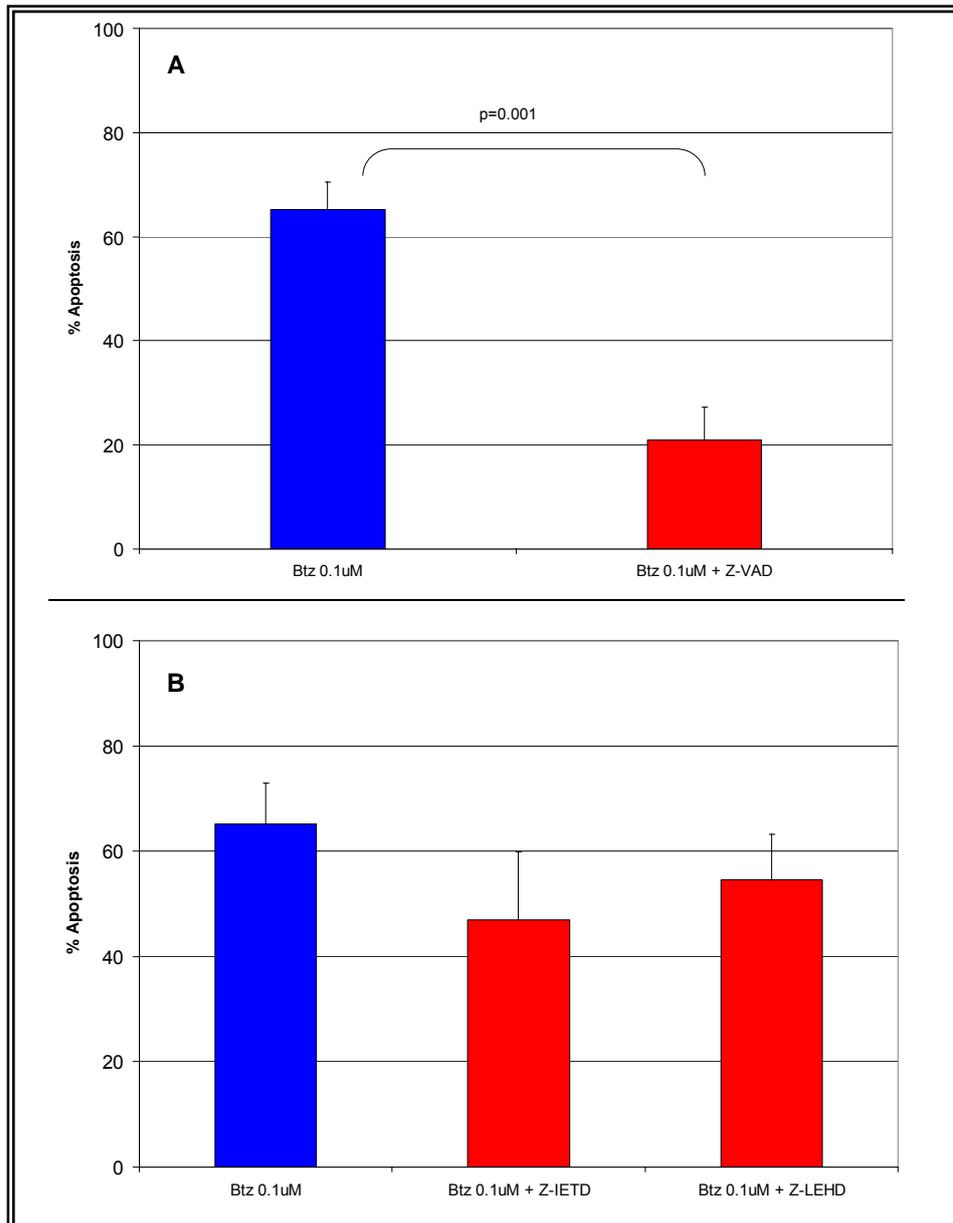
Células de LLC-B fueron tratadas con 0.1 $\mu$ M Btz o 10  $\mu$ M BAY 11-7082 durante 6 h. 2  $\mu$ g de extractos nucleares fueron analizados para evaluar su unión a secuencias consenso en el ADN, mediante un ensayo de tipo EMSA. La flecha llena señala la unión específica del oligonucleótido marcado a su secuencia consenso, lo que provoca un retardo en la movilidad de la banda, la flecha vacía señala el oligonucleótido libre.

#### **2.4. PAPEL DE LAS CASPASAS EN LA INDUCCION DE APOPTOSIS POR BTZ**

Para evaluar el papel de las caspasas en la inducción de apoptosis por Btz, las células de LLC-B fueron pre-incubadas con inhibidores de caspasas, una hora previa a la adición de 0.1  $\mu$ M Btz. Se observó una notable reducción de la apoptosis cuando se utilizó el inhibidor de caspasas de amplio espectro, Z-VAD-FMK (100  $\mu$ M), siendo la apoptosis en presencia de Btz de 65.2% y reduciéndose a 21.0% en presencia del inhibidor ( $p= 0.001$ ,  $n= 13$ ). Estos datos sustentan la idea de que las caspasas efectoras son necesarias para la fase de ejecución de la inducción de apoptosis por Btz (Figura 21A). Para tratar de discriminar cuál de las vías de activación de caspasas (extrínseca o intrínseca/ mitocondrial) está involucrada en la actividad pro-apoptótica del Btz, se pre-incubaron 6 muestras con inhibidores específicos de caspasa 8 y 9 (Z-

IETD-FMK y Z-LEHD-FMK, respectivamente) previo al agregado de Btz, y después de 24 horas de incubación se determinaron los porcentajes de apoptosis. Ambos inhibidores fueron capaces de disminuir de manera moderada la apoptosis inducida por Btz, indicando que ambas vías podrían estar involucradas (Figura 21B).

**FIGURA 21:** Papel de las caspasas en la inducción de apoptosis por Btz.



**A) Inhibición general de caspasas:** Muestras de LLC-B (n=13) fueron incubadas con medio solo (control), con 0.1  $\mu$ M de Btz o pre-incubadas con un inhibidor de caspasas de amplio espectro ZVAD-fmk (100 $\mu$ M) una hora antes del agregado de Btz al medio de cultivo. Hubo una diferencia significativa entre las células tratadas con el inhibidor y aquellas tratadas solo con Btz ( $p=0.001$ )

**B) Evaluación de vías específicas de activación de caspasas:** 6 muestras fueron incubadas solo con medio, con 0.1  $\mu$ M de Btz o pre-incubadas con inhibidor de caspasa 8, Z-IETD (100  $\mu$ M) o de caspasa 9, Z-LEHD (100  $\mu$ M) una hora antes de añadir Btz al medio de cultivo. Ambos tratamientos causaron una reducción significativa de la inducción de apoptosis por Btz ( $p=0.028$  en ambos casos). En todos los experimentos, la apoptosis se determinó después de 24 h. de incubación. Las barras representan la media  $\pm$  2 SEM.

## 2.5. APOPTOSIS INDUCIDA POR BTZ EN FUNCION DEL ESTADO MUTACIONAL DE IgV<sub>H</sub> Y BCL-6:

Dentro de las tasas de inducción de apoptosis por Btz, encontramos un marcado grado de heterogeneidad entre muestras, mostrando, algunas muestras una gran sensibilidad al fármaco, mientras que otras presentaban una respuesta mas moderada.

Por lo tanto, hemos analizado la correlación entre la tasa de apoptosis y variables biológicas en LLC, como son el estado mutacional de IgV<sub>H</sub>/ BCL-6 y la expresión de CD38 o de ZAP70, dado el impacto que tienen estos parámetros en el comportamiento clínico en esta patología. El efecto pro-apoptótico del Btz fue diferente de acuerdo al estado mutacional de los genes IgV<sub>H</sub> y BCL-6. En células con IgV<sub>H</sub> mutado, las mutaciones en BCL-6 claramente mostraron diferencias en la tasa de respuesta a la inducción de apoptosis por Btz (ver resultados en Tabla 9). Resulta muy interesante observar que las células con IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL-6 mutado responden significativamente menos a la inducción de apoptosis por Btz que el subgrupo con IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL-6 no mutado. No se pudo establecer una correlación significativa entre la intensidad de respuesta al Btz y los niveles de expresión del antígeno de superficie CD38 o la proteína ZAP70, aunque parece haber una tendencia a tener una respuesta menor en los casos con CD38 y/ o ZAP70 positivos.

**TABLA 9:** Inducción de apoptosis por Btz en células con IgV<sub>H</sub> mutado: correlación con mutaciones en BCL-6.

Tratamiento	Células con IgV <sub>H</sub> mutado: Mutaciones en BCL-6	n	% Apoptosis (media ± SEM)	p*
Btz 0.1 μM	IgV <sub>H</sub> mut/ BCL-6 no-mut	9	67.66 ± 1.91	0.032
	IgV <sub>H</sub> mut/ BCL-6 mut	11	51.59 ± 4.61	
Btz 1.0 μM	IgV <sub>H</sub> mut/ BCL-6 no-mut	8	73.84 ± 2.59	0.034
	IgV <sub>H</sub> mut/ BCL-6 mut	9	62.12 ± 3.44	

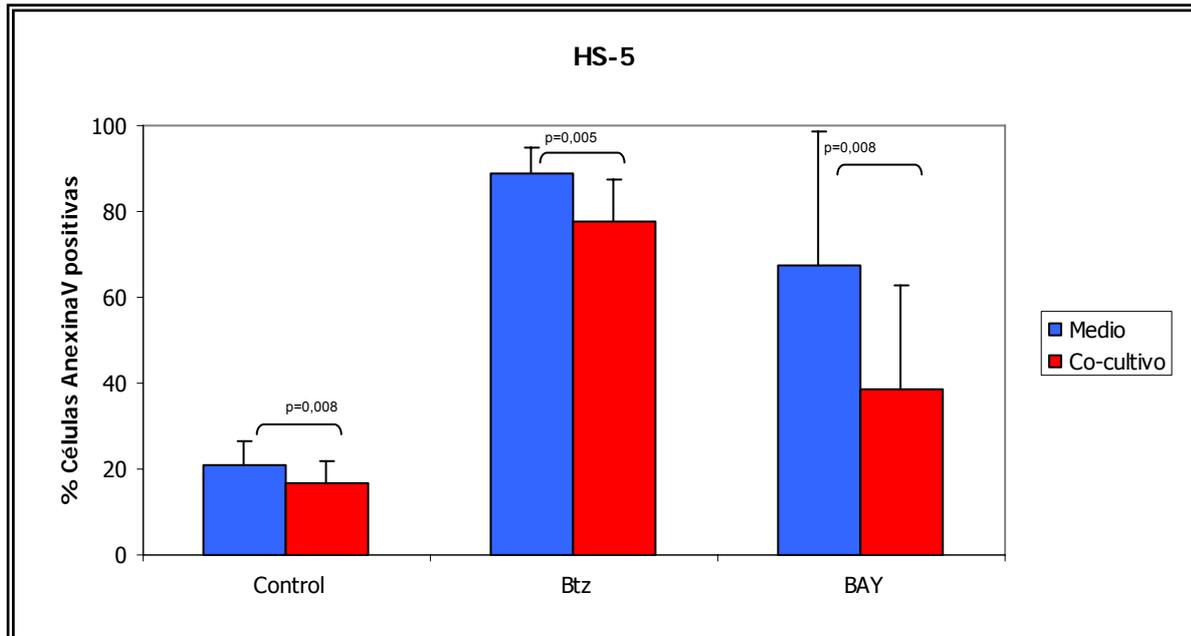
\*Prueba de Mann Whitney.

## 3. EFECTO DEL MICROAMBIENTE CELULAR EN LA SUPERVIVENCIA DE CELULAS DE LLC-B: Sistemas de co-cultivos.

Con el objeto de evaluar el efecto del microentorno celular sobre la apoptosis en células de LLC-B, cocultivamos células mononucleares provenientes de pacientes, con las líneas celulares: HS-5 y HK, derivadas de estroma medular y de células dendríticas,

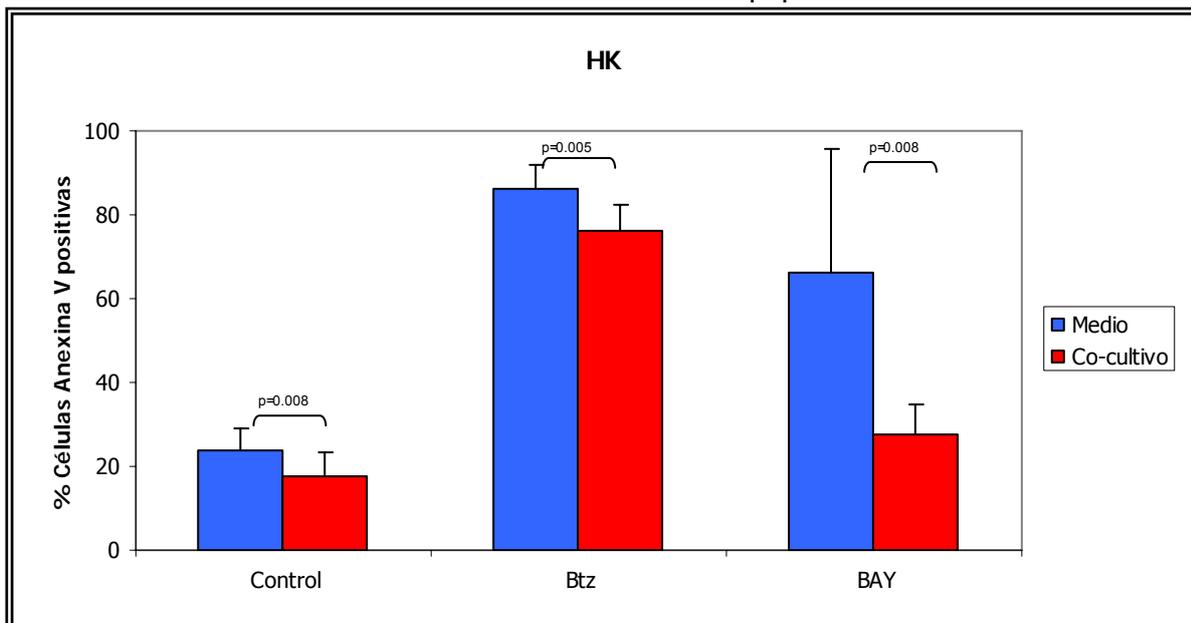
respectivamente. Con los resultados obtenidos concluimos que las muestras en cocultivo fueron significativamente más resistentes a la apoptosis espontánea que las células de LLC sin cocultivar tanto a las 24 horas ( $p=0.008$  y  $p=0.005$  para HS-5 y HK, respectivamente) como a las 72 horas ( $p=0.043$  y  $p=0.018$  para HS-5 y HK, respectivamente).

**FIGURA 22:** Efecto de la línea celular HS-5 sobre la apoptosis de células de LLC



Determinaciones realizadas tras 24 h. de incubación. Las barras representan media  $\pm$  2SD (n=10) de la apoptosis medida.

**FIGURA 23:** Efecto de la línea celular HK sobre la apoptosis de células de LLC



Determinaciones realizadas tras 24 h. de incubación. Las barras representan media  $\pm$  2SD (n=10) de la apoptosis medida.

Asimismo, las células en cocultivo también fueron más resistentes a la inducción de apoptosis por Btz y BAY11 cuando se compararon con el efecto de estos fármacos sobre las células de LLC solas. En las figuras 22 y 23 se muestran los resultados de los experimentos de cocultivos con células HS-5 y HK tras 24 horas de incubación.

Se correlacionó a continuación este efecto protector del microentorno celular contra la apoptosis espontánea e inducida con el estado mutacional de IgV<sub>H</sub> y BCL-6. No se encontró una correlación significativa entre la presencia o no de mutaciones en IgV<sub>H</sub> con la mayor o menor resistencia a la apoptosis en los sistemas de co-cultivos, y tampoco en el caso de considerar a las muestras según los subgrupos clínicos definidos en nuestro estudio (1: IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL6 no mutado, 2: IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL6 mutado y 3: IgV<sub>H</sub> no mutado/ BCL6 no mutado). En cambio, cuando se consideraron solo las mutaciones en el gen BCL-6, las muestras de LLC-B mutadas en este gen cuando fueron co-cultivadas con células HK durante 24 horas, mostraron de manera significativa una mayor resistencia a la apoptosis que las células sin cocultivar ( $p=0.017$ , prueba de Mann-Whitney)



**V. DISCUSION: CAPITULO I  
ESTUDIOS FUNCIONALES EN LLC-B**

# 1. CARACTERIZACION DE LAS MUTACIONES EN IgV<sub>H</sub> y BCL-6. Correlaciones con Expresión y Función.

## 1.1.MUTACIONES EN IgV<sub>H</sub>.

Las mutaciones en IgV<sub>H</sub> se producen en el CG de los folículos linfoides secundarios. La formación de estas estructuras implica la interacción de la célula B estimulada con linfocitos T y con otras células accesorias como las células dendríticas<sup>160</sup>. Dado que las mutaciones en IgV<sub>H</sub> implican algún grado de estimulación/ selección, la explicación del origen de las células con IgV<sub>H</sub> no mutado podría ser el de células vírgenes o células que habiendo tenido contacto con un antígeno no presentan mutaciones. Esta última opción podría ser así, dado que se ha observado en ciertos experimentos humanos y animales que algunas células B responden a la estimulación de antígenos T independientes, como es el caso de los polisacáridos o lipopolisacáridos fuera del CG. Durante este proceso estas células no acumulan una cantidad significativa de mutaciones<sup>32</sup>.

En el grupo de pacientes estudiado, un 73 % presentaba clones IgV<sub>H</sub> mutados, mientras que el resto eran no mutados (ver detalles en tabla 7). Estos porcentajes son un poco diferentes de los publicados en estudios previos<sup>5,18,137,161</sup>, dado que en la mayoría de ellos se incluyen pacientes en diferentes estadios de la enfermedad, mientras que en el presente estudio solo fueron seleccionados los pacientes en estadios tempranos (estadio A de Binet), permitiéndonos trabajar con un grupo más homogéneo. Además, con respecto a la distribución de las familias usadas por los clones leucémicos, se sabe que existe un uso desequilibrado de ciertos genes de V<sub>H</sub><sup>5,47</sup>. Por ejemplo, los genes VH1-69, VH3-07 y VH4-34 se encuentran más frecuentemente en LLC-B que en la población general de células B normales o CD5+. El gen VH3-07 se encuentra más frecuentemente en células mutadas, mientras que VH1-69 en la mayoría de los casos se encuentra en células no mutadas. Para VH4-34 la distribución se reparte entre las dos formas<sup>5,47</sup>. En concordancia con estos estudios, en el grupo de pacientes estudiado, el gen VH1-69 correspondió exclusivamente a casos no mutados, mientras que el VH3-07 solo se encontró en casos mutados, sin embargo el VH4-34 solo se encontró en las muestras mutadas y no repartido entre las dos formas como señalábamos anteriormente.

Por otra parte, debemos destacar que la determinación del estado mutacional de IgV<sub>H</sub> en el presente estudio, usando el protocolo propuesto por BIOMED-2<sup>139</sup>, ha demostrado ser menos complejo que otros métodos utilizados anteriormente,

permitiendo que sea más fácilmente implementado en laboratorios de diagnóstico, aunque sigue requiriendo disponer de instalaciones que permitan la secuenciación de ácidos nucleicos. En cuanto al análisis de las secuencias obtenidas, en general, hubo coincidencia entre las homologías obtenidas al comparar las secuencias de las muestras con las de las líneas germinales publicadas en las bases de datos de IMGT, V-BASE y BLAST (aunque la base más actualizada y completa corresponde a la de IMGT). En los casos en los que se observó alguna pequeña divergencia en los porcentajes de homología asignados por cada base de datos éstas no comprometían un cambio en el estado mutacional de las muestras.

## 1.2. MUTACIONES EN GEN BCL-6.

El gen BCL-6 codifica un potente represor transcripcional que ha sido localizado en el cromosoma 3 en la banda q27. Es una fosfoproteína nuclear que se expresa a altos niveles exclusivamente en las células B maduras y esta expresión está específicamente regulada durante la diferenciación de la célula B en el CG<sup>162,163</sup>.

El proceso de hipermutaciones somáticas se sabe que ocurre dentro del CG de los nódulos linfáticos, que también es el sitio de expresión de BCL-6. El gen BCL-6 de células B normales de CG ha sido secuenciado para ver si aquellos genes con transcripción activa en esta localización son objeto de mutaciones puntuales, encontrándose mutaciones puntuales a lo largo de la secuencia de este gen<sup>164</sup>. Las mutaciones en la región reguladora del gen se encuentran no sólo en células B normales del CG sino también en células memoria y en tumores linfoides con fenotipo CG/ post CG, pero no en tumores de células B vírgenes<sup>147</sup>. Estas mutaciones pueden ser múltiples y heterogéneas y presentan características comunes con las mutaciones somáticas en IgV<sub>H</sub>, lo cual orienta a un mecanismo común de producción<sup>33,34,147</sup>. A pesar de que los cálculos de la tasa de mutaciones en BCL-6 son complicados por el bajo número absoluto de mutaciones, podría ser posible que BCL-6 mute a menores tasas que el gen de las inmunoglobulinas en células B normales<sup>147,164</sup>. Sobre la base de estos descubrimientos, la expresión de BCL-6 se ha considerado un marcador fenotípico de CG de células B y las mutaciones en el gen han sido propuestas como un marcador molecular de tránsito de estas células por el CG.

Se ha publicado que las mutaciones de BCL-6 en LLC-B se encuentran en un 20-30% de pacientes estudiados<sup>33,34</sup>. Estos porcentajes coinciden con los observados en otros tipos de tumores B (Linfoma de Burkitt, Linfoma asociado a Mucosas –MALT- y Mieloma Múltiple), mientras que su frecuencia es mucho mayor en Linfoma Folicular y Linfoma Difuso de Células Grandes (50-73%), probablemente como consecuencia de

un proceso de mutación mucho más activo durante la transformación en el CG<sup>31</sup>. En el presente trabajo, hemos detectado un 29% de muestras mutadas, correspondiendo todas ellas a pacientes con mutaciones en IgV<sub>H</sub>, lo que concuerda con datos previos<sup>33,34,55</sup>. Los porcentajes de mutaciones en BCL-6 encontrados en la LLC, también son comparables con los que se encuentran en células del CG normales y células B de memoria<sup>147,155</sup>, por lo tanto, el número de casos de LLC-B portadores de mutaciones en BCL-6 podría estar reflejando la fracción de células B normales en las que ocurre el proceso de SHM en este gen<sup>34</sup>.

Las mutaciones detectadas fueron en todos los casos sustituciones de una base, y en algunos casos encontramos mutaciones recurrentes o bien mutaciones a diferentes nucleótidos pero que afectan a la misma posición, y una gran mayoría de ellas han sido descritas previamente en LLC-B o en otros síndromes linfoproliferativos B (linfomas linfocíticos pequeños, leucemias de células peludas, etc.)<sup>138,147,148,150,154,157,165</sup>. En su conjunto, el patrón de mutaciones en BCL-6 e IgV<sub>H</sub> en la LLC-B refuerza la idea de que esta leucemia es histogenéticamente heterogénea y que un subgrupo sustancial de estas linfoproliferaciones deriva de células que han pasado a través del CG<sup>33,151</sup>.

Las mutaciones en BCL-6 parecen estar agrupadas en dos regiones (las correspondientes a los nucleótidos 400-449 en primer lugar y 100-149 en segundo término), dichas regiones ya han sido descritas en otros síndromes linfoproliferativos como las que mayor número de mutaciones acumulan<sup>148,150,152</sup>.

Entre las 69 muestras estudiadas, se detectaron también tres cambios polimórficos ( $\Delta T520$ , 397G>C, 502G>A), previamente descritos en muestras de donantes sanos<sup>34,138,147-150</sup>, siendo  $\Delta T520$  el polimorfismo más frecuentemente encontrado (29.0%) en nuestra serie. Estos polimorfismos se distribuyeron de manera equilibrada entre muestras mutadas y no mutadas a excepción del 397 G>C que aparecía más frecuentemente en muestras BCL-6 mutadas.

### **1.3. EXPRESION DEL GEN BCL-6. CORRELACION CON LAS MUTACIONES.**

Se sabe que la expresión de BCL-6 es desregulada por traslocaciones cromosómicas en aproximadamente el 40% de los linfomas difusos de células grandes (DLBCLs). Las secuencias regulatorias de BCL-6 también son objeto del proceso de SHM en las células B del CG y en una fracción de linfomas derivados del CG (incluido un subgrupo de las LLCs). Sin embargo, las consecuencias funcionales de dichas mutaciones son hasta el momento desconocidas<sup>166</sup>. Se ha publicado que un subgrupo de mutaciones

asociadas de manera específica a los DLBCL causa una transcripción desregulada de BCL-6. Estas mutaciones afectan dos sitios adyacentes de unión de BCL-6 localizados dentro del primer exón no codificante del gen, e impiden la unión de BCL-6 a su propio promotor, inhibiendo así su circuito autoregulatorio negativo<sup>166</sup>. Otras evidencias derivan de ensayos de retardo de movilidad en geles (EMSA), que han demostrado la presencia de complejos proteicos de unión al DNA específicos, apoyando la idea de que el primer intrón es un blanco de unión de factores de transcripción<sup>164</sup>, por lo que una posibilidad es que, alteraciones en la región que sufre SHM, puedan conducir a la pérdida del mecanismo normal de control de este gen. En concordancia con esto, un estudio en el cual se transfectó un alelo BCL-6 mutado derivado de una neoplasia B, indicó que las mutaciones en 5' podrían estar asociadas con una actividad transcripcional desregulada de este gen y que dicha desregulación estaría causada por una única mutación<sup>167</sup>. Sin embargo, en cinco casos de LLC-B, la expresión de la proteína BCL-6 (medida por "Western Blot"), no demostró ser diferente cuando se compararon muestras de pacientes con alelos BCL-6 mutados o salvajes<sup>34</sup>, aunque en este caso se trata de un número reducido de muestras. En el presente estudio hemos analizado la relación entre la presencia de polimorfismos o mutaciones generadas por el proceso de SHM en la región 5' no codificante del gen con la expresión de BCL-6.

En el grupo de pacientes estudiados, el proceso de SHM produjo mutaciones en BCL-6 en el 29% de los casos. Estas mutaciones parecen agruparse en regiones diana que ya han sido descritas en otros síndromes linfoproliferativos como aquellas que acumulan mayor número o frecuencia de mutaciones<sup>148,150,152</sup>. Al realizar la correlación entre la expresión y la presencia de mutaciones en BCL-6, el número de mutaciones de BCL-6 por caso o las mutaciones en IgV<sub>H</sub>, no hemos podido encontrar diferencias significativas entre los niveles de expresión hallados en los grupos de muestras estudiados. Tampoco existió correlación entre la expresión y los polimorfismos encontrados en el gen BCL-6 en nuestra serie de pacientes. Estos hallazgos concuerdan con resultados previos en los que se estudió la expresión de BCL-6 y, a pesar de que se observó cierta variabilidad en la expresión de ARN de BCL-6 entre los casos de LLC estudiados, no obtuvieron diferencias detectables entre los subgrupos identificados por la presencia de mutaciones en IgV<sub>H</sub> y BCL-6<sup>34</sup>, aunque el grupo de muestras de LLC-B analizado fue muy pequeño. Estos autores tratan de explicar estos resultados señalando que es posible que las mutaciones que afectan la región 5' no codificante del gen no sean funcionalmente significativas, o bien, confieran solo una regulación muy fina en la expresión de este gen<sup>34</sup>. De todas maneras, la expresión de

BCL-6 en LLC es muy baja y se corresponde con 1/10 a 1/20 de los valores detectados en células B del CG normales o transformadas, aunque es mayor que en las células B de memoria, las cuales pierden la expresión de BCL-6. Tampoco en los casos de linfoma folicular fue posible establecer una relación entre la expresión de BCL-6 y el genotipo o el estado mutacional del gen, distribuyéndose de manera equitativa los pacientes con alta y baja expresión de proteína BCL-6 entre los grupos BCL-6 mutado y no mutado<sup>148</sup>.

## **2. ENSAYOS FUNCIONALES EN LLC-B: Susceptibilidad a la apoptosis mediada por fármacos que afectan NFκB<sup>159</sup>.**

El Bortezomib, un fármaco actualmente efectivo en el tratamiento del mieloma múltiple, podría ser un agente terapéutico potencialmente útil en el tratamiento de la LLC-B. Nuestros resultados muestran que este inhibidor del proteasoma es efectivo como inductor de apoptosis en un grupo de 31 muestras de pacientes con LLC-B, cuando fue probado *in vitro*, de acuerdo con hallazgos previos realizados sobre un número mas reducido de muestras<sup>168</sup> y también en cultivos primarios de MCL<sup>169</sup>.

La acción pro-apoptótica del Btz se manifestó de manera dependiente de la dosis y del tiempo de exposición de las células a este agente farmacológico, alcanzándose en algunas muestras más del 90% de células apoptóticas después de 24 horas de exposición. El mecanismo de inducción de apoptosis puesto en marcha por los inhibidores de proteasoma no está todavía muy bien dilucidado, y es probable que sea producto de una compleja cascada de eventos. En particular, se lo atribuye a la inhibición de la señalización mediada por NFκB, evento que impide la expresión de factores antiapoptóticos dependientes de NFκB tales como cIAP1/2 y xIAP. Otros compuestos con efecto inhibitorio sobre la fosforilación de IκB, como es el caso del BAY11, también han demostrado tener actividad pro-apoptótica sobre células tumorales *in vitro*<sup>135</sup>. Sin embargo, comparando los efectos en su actividad antitumoral de los inhibidores de la fosforilación de IκB con los inhibidores de proteasoma, podemos decir que solo el bloqueo de la señalización NFκB no parece explicar todos los efectos citotóxicos de estos agentes farmacológicos<sup>170,171</sup>. Nuestros resultados muestran que, tanto Btz como BAY11 tienen efectos inhibitorios sobre la activación de NFκB, medidos por ensayos de tipo EMSA, pero la extensión de la inducción de apoptosis obtenida después de tratar las células de LLC con Btz y BAY11 fue

significativamente diferente, siendo mayor en las células tratadas con Btz. Esto puede explicarse puesto que la inhibición farmacológica de la actividad del proteasoma suprime la degradación de I $\kappa$ B, pero también afecta la estabilidad de otras proteínas que se degradan por esa vía, y por lo tanto, la actividad pro-apoptótica de los inhibidores del proteasoma solo pueden relacionarse parcialmente con la actividad de NF $\kappa$ B<sup>172</sup>. Se ha publicado que la apoptosis mediada por Btz y MG-132 (otro inhibidor del proteasoma) en células de LLC-B está asociada con una inactivación temprana de Notch2 y regulación negativa de su gen blanco, CD23<sup>127</sup>. Resulta sorprendente entonces el hallazgo en una serie de casos de LLC-B con afectación nodular con niveles aumentados de expresión de pI $\kappa$ B (un marcador subrogado de activación de NF $\kappa$ B) y que se correlacionan con mayor supervivencia global cuando se los comparaba con los casos de baja expresión de este marcador<sup>173</sup>.

Es un hecho bien conocido que la apoptosis es causada por la activación de proteasas intracelulares, denominadas caspasas. Las caspasas -2, -3, -7, -8 y -9 están presentes en células de LLC-B no tratadas de manera no procesada como pro-enzimas y, cuando las células de LLC-B entran en contacto con agentes tales como prednisolona o clorambucilo (dos fármacos usados de manera usual en el tratamiento de la LLC), las caspasas efectoras son activadas prosiguiéndose luego con la cascada de eventos que lleva a la muerte celular. Almond y *col*<sup>134</sup> han demostrado que células de LLC tratadas con inhibidores del proteasoma (lactacystina y MG-132) también desencadenan eventos apoptóticos dependientes de caspasas. En nuestro caso, Btz también demuestra que su actividad antiapoptótica es dependiente de caspasas ya que el uso de un inhibidor de caspasas de amplio espectro es capaz de bloquear de manera significativa la inducción de apoptosis que ejerce el Btz sobre células de LLC. Debido a que existen dos vías mayoritarias para activar a las caspasas: una intrínseca (que utiliza caspasa -9 como caspasa iniciadora) y otra extrínseca (que usa caspasa -8), decidimos estudiar cuál de las dos vías era la responsable de los efectos del Btz. El uso de inhibidores específicos de caspasa 8 y 9, previo a la adición de Btz, mostraron efectos discretos de bloqueo de la acción del fármaco por lo que Btz podría estar usando ambas vías de activación de caspasas para la inducción de apoptosis. En otros estudios se ha publicado que los inhibidores de proteasoma activan la vía intrínseca a través de la liberación de citocromo c y del activador de caspasas derivado de mitocondria (SMAC/Diablo), disparando de esta manera la cascada de las caspasas y en consecuencia la apoptosis<sup>170</sup>. Resulta interesante mencionar que se ha descrito que la inhibición del proteasoma causa también acumulación de Mcl-1, una consecuencia

molecular no deseada de estos agentes, porque tendría un efecto protector sobre las células, y enlentecería los efectos pro-apoptóticos de estos fármacos, lo que debería tenerse en cuenta como posible causa de pérdida de actividad citotóxica en su uso *in vivo*<sup>170</sup>.

Kelley y *col* encontraron que diferentes pacientes parecían responder con diferente intensidad a la acción del Btz<sup>168</sup>. En el grupo de muestras que hemos estudiado, también encontramos cierta heterogeneidad en los datos, por lo que buscamos si podíamos correlacionar la magnitud de la respuesta al Btz con las mutaciones en los genes de IgV<sub>H</sub> y BCL-6, ya que es sabido que éstas son capaces de diferenciar pacientes con curso clínico muy diferente. En esta parte del estudio, encontramos que, cuando las células de pacientes con IgV<sub>H</sub> mut eran expuestas a Btz en condiciones de cultivo, era posible diferenciar dos grupos de muestras de acuerdo a cómo respondían al fármaco: aquellas muestras que también eran mutadas en BCL-6 tenían respuestas apoptóticas al Btz mucho menores que cuando BCL-6 era no mutado. En relación con estos hallazgos, hay estudios que sugieren claramente que BCL-6 puede promover apoptosis *in vivo* en diferentes modelos celulares<sup>174,175</sup>, y por lo tanto, la expresión de este gen está asociada con mejor pronóstico en DLBCL. Podría especularse que en LLC-B, el gen BCL-6 podría estar sobreexpresado o reprimido como consecuencia de las mutaciones adquiridas durante el tránsito a través del GC en la región 5' del gen que contiene importantes elementos regulatorios<sup>54</sup>, sin embargo, nosotros hemos determinado mediante RTqPCR los niveles de expresión de BCL-6 y si bien, existen diferencias notorias en la expresión del gen entre muestras de LLC-B, éstas no guardan relación con la presencia de un patrón de mutaciones determinado. Otra posibilidad es que las mutaciones en esta región del gen sean consecuencia de una estabilidad genética alterada, la cual a su vez podría resultar en la desregulación de otros genes, que sean los verdaderos responsables de la mayor progresión observada en los pacientes con mutaciones en BCL-6<sup>55</sup>.

En el presente trabajo, otros marcadores biológicos correlacionados con pronóstico clínico desfavorable en la LLC-B tales como la expresión elevada de ZAP70 y CD38, no muestran correlación con la intensidad de la respuesta a Btz, pero podemos decir que existe una tendencia a ser menos sensibles a la apoptosis inducida por Btz que los casos rotulados como ZAP70 o CD38 negativos, en concordancia con lo descrito por Duechler y *col*<sup>127</sup>.

En conclusión, podemos decir que el Btz, que actúa en parte a través de la inhibición de la señalización mediada por NFκB, y que utiliza caspasas activadas como

efectores finales del proceso apoptótico, podría ser un agente farmacológico prometedor para el tratamiento de la LLC-B. Su eficacia, al menos *in vitro*, parece estar relacionada con el estado mutacional de los genes IgV<sub>H</sub> y BCL-6, teniendo mayor actividad pro-apoptótica en el grupo IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL-6 no mutado. Sin embargo, su efecto *in vivo* debe evaluarse más cuidadosamente, debido a que se sabe que el microentorno celular ejerce un efecto protector contra la inducción de apoptosis mediada por fármacos.

### 3. EFECTO DEL MICROAMBIENTE CELULAR EN LA SUPERVIVENCIA DE CELULAS DE LLC-B: Sistemas de co-cultivos.

A pesar de la supervivencia celular prolongada de las células de la LLC *in vivo*, cuando estas células son cultivadas *in vitro* en medio suplementado, tanto con suero autólogo como con suero bovino fetal, generalmente experimentan apoptosis de manera espontánea. Esta observación sugiere que el microambiente celular *in vivo*, provee el "soporte" necesario para prolongar la supervivencia de las células LLC-B. Los posibles moduladores de este fenómeno podrían ser tanto factores solubles como señales derivadas del contacto célula a célula. Varias citoquinas tales como IL -2,-4, o -8, IFN- $\alpha$  y - $\gamma$  o VEGF, entre otras, han sido descritas como inhibidores de apoptosis en LLC-B, sugiriendo que factores solubles autocrinos o paracrinos podrían ejercer cierto efecto en la acumulación y proliferación de las células de LLC-B observadas *in vivo*. Además, se sabe que la interacción entre las células de LLC-B y otros tipos celulares componentes de su entorno tanto en médula como en sangre periférica son importantes para su supervivencia<sup>99,101,112,176</sup>.

En el presente estudio, el cocultivo de células de LLC-B sobre monocapas de células derivadas de estroma medular o de células dendríticas reduce la apoptosis espontánea e inducida por inhibidores de NF $\kappa$ B. Recientemente se ha publicado un sistema de cocultivo semejante al utilizado en nuestro trabajo, para mantener la supervivencia de las células de LLC *in vitro*, usando la línea celular derivada de estroma medular HS-5, con el que se logró mantener en cultivo a las células B de LLC durante varios meses, postulándose como una herramienta válida para análisis *in vitro*, simulando la situación que ocurre *in vivo*<sup>177</sup>. Con las evidencias experimentales existentes hasta el momento, podríamos hablar de un efecto "protector" del microentorno celular en la LLC-B, capaz de prevenir la apoptosis y aumentar la supervivencia de estas células *in vivo*, por lo

que este tipo de sistemas *in vitro* basados en co-cultivos deberían usarse para estudiar los requerimientos de crecimiento de las células de LLC y su quimiosensibilidad en sistemas *in vitro*, como una manera de reproducir lo que ocurre *in vivo*. Por otra parte, según nuestros datos, y considerando que el número de muestras analizado es pequeño, este efecto protector del microentorno, no parece tener relación con el estado mutacional de los genes IgV<sub>H</sub> y BCL-6. En todo caso, parece bastante probable que las células B de LLC circulantes puedan reingresar al compartimiento tisular y participar de estas condiciones microambientales que promuevan su supervivencia. Lo que aún no se ha dilucidado es si las células LLC mutadas y no mutadas difieren en número, frecuencia y mecanismo de selección de las células que propagan la enfermedad. Se puede predecir que las células LLC no mutadas tienen un comportamiento más agresivo porque serían más fácilmente reclutadas al interior de los tejidos y por lo tanto experimentarían más divisiones, con lo que aumentaría el riesgo de adquirir mayores anomalías genéticas<sup>42</sup>, pero en este campo son necesarias aún más evidencias experimentales.

## **VI. RESULTADOS: CAPITULO II**

### **ESTUDIO DE PERFILES DE EXPRESION GENICA EN LLC-B. CORRELACION CON MUTACIONES EN GENES IgV<sub>H</sub> y BCL-6**

## 1. LLC-B: EXPRESION GENICA DIFERENCIAL Y PERFIL FUNCIONAL

Para este estudio, se utilizaron micromatrices de ADN de alta densidad, con el objeto de encontrar un patrón de expresión característico de la LLC-B, basada en el perfil transcriptómico de un grupo muestral meticulosamente seleccionado. Dicho grupo de muestras se restringe a pacientes en estadio A de Binet, que es generalmente el estadio en que se encuentran los pacientes al momento del diagnóstico. Por lo tanto, el fin de este trabajo es el de obtener una información más rica, precisa y actualizada de la que se dispone actualmente sobre la LLC-B en estadios tempranos de la enfermedad y de los subgrupos moleculares que se han definido en esta leucemia.

Básicamente, los interrogantes que se intentan contestar en esta sección del trabajo son los siguientes:

1- ¿Existe una diferencia clara entre los perfiles de expresión de linfocitos B de LLC en estadio A y linfocitos B normales?

2- ¿Existen genes diferencialmente expresados entre los grupos moleculares de LLC-B en estadio A de Binet?

3- Si esto es así, ¿se pueden inferir vías de señalización o procesos biológicos diferencialmente regulados en estos grupos de LLC-B?

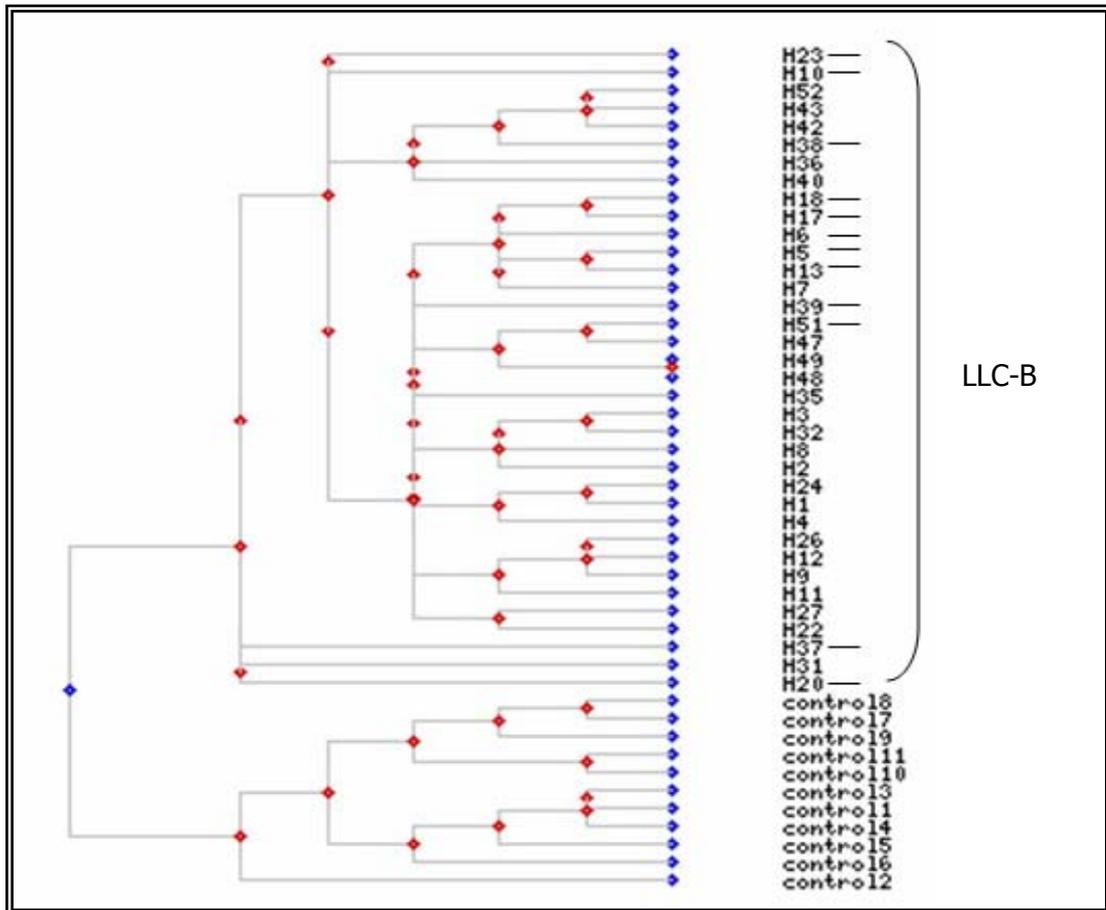
### 1.1. CLUSTER JERARQUICO NO-SUPERVISADO

Para asignar el potencial de los datos de expresión, en primer lugar realizamos un análisis de clases no supervisado utilizando dos métodos UPGMA y SOTA, para lo cual, los datos normalizados de muestras (n=36) y controles (n=11) fueron introducidos en GEPAS (<http://www.gepas.org>) dando como resultado un agrupamiento por clases similar en ambos métodos. El árbol que se genera tiene dos ramas bien definidas, una rama en la que se observan todas las muestras de LLC agrupadas entre sí y otra rama en la que se encuentran agrupadas las muestras de los controles. En la Figura 24 se muestran los resultados correspondientes al método UPGMA. GEPAS reporta un índice de silueta positivo para los dos grupos discriminados (valores posibles de -1 a +1), por lo que podemos afirmar que la variabilidad dentro de estos dos grandes grupos diferenciados es menor que la que existe entre ellos, por lo que pacientes y controles se encuentran segregados de manera estadísticamente significativa.

Una observación interesante es que dentro del grupo de LLC-B quedan separadas en una misma rama, varias muestras con IgV<sub>H</sub> no mutado (H5, H6, H13, H17, H18)

expresando todas ellas CD38 > 20%, lo que indicaría que este grupo comparte un perfil común de células activadas que lo separaría del resto.

**FIGURA 24:** Cluster jerárquico – Método UPGMA



En la figura se observan dos ramas muy bien definidas siendo el valor del índice de silueta (s) para cada uno de los clusters el siguiente: Controles (s=0.385) y muestras LLC-B (s=0.326). Con (—) señalamos las muestras IgV<sub>H</sub> no-mutado.

## 1.2. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS Y PERFIL FUNCIONAL EN LLC-B

La comparación de los perfiles de expresión génica entre muestras de pacientes de LLC-B y controles sanos, usando una plataforma que cubre todo el transcriptoma humano, mostró que dichos perfiles pueden diferenciarse claramente. Usando una prueba t estándar, y el valor de FDR  $\leq 0.05$  como valor de corte, podemos considerar que existen varios miles de transcritos diferencialmente expresados, en la Figura 25 mostramos un gráfico con los 200 genes más diferencialmente expresados de acuerdo con la prueba t. Los primeros 100 genes que aparecen en la figura, ordenados de acuerdo a los valores positivos del estadístico t, son los sobreexpresados en las muestras de LLC-B. Los 100 genes ubicados en la parte inferior de la figura, tienen

valores de t negativos, indicando que están reprimidos en los pacientes cuando se los compara con los controles. En primer lugar de la lista, aparece el gen GLIPR1 ("glioma pathogenesis-related protein 1 precursor"), seguido por dos polimerasas involucradas en procesos de transcripción, POLR3B y POLR2L. Otros genes relevantes son: ASXL2, NEDD8 o SCLY, cuyas funciones están asociadas a cáncer, ciclo celular o hematopoyesis, respectivamente. En el listado de transcritos sobreexpresados en leucemia, aparecen también varios genes involucrados en reparación y replicación del ADN tales como: RAD51L1, RBM14, POLE4 o ERCC1 o un grupo que codifica proteínas integrales de membrana: SIGLEC10, CLSTN1, HLA DOB, FCRL5.

Anotación funcional: El perfil funcional muestra que hay varios términos de GO y vías de KEGG significativamente sobre representados entre los genes ordenados por el valor positivo de su estadístico t, por lo tanto se trata de procesos sobrerrepresentados en las muestras de LLC-B (distinguidos con barras rojas en la Figura 26). El análisis, también muestra algunos bloques funcionales con genes agrupados entre aquellos con valores negativos del estadístico t. Se entiende que dichos bloques representan genes coordinadamente sobreexpresados en las muestras control y subexpresados en los pacientes con LLC-B (bloques representados mediante barras azules en la Figura 26).

Resulta interesante destacar que términos de GO y KEGG relacionados con metabolismo, tales como: metabolismo de la familia de aminoácidos de cadena ramificada, de heterociclos, nucleótidos o hexosas o fosforilación oxidativa y también de ciclo celular se encuentran enumerados como sobrerrepresentados en la LLC-B, mientras que en contraste, muerte, apoptosis y diferenciación celular, estaban subrepresentados en LLC-B con respecto a los controles.

## 2. PERFILES DE EXPRESION EN SUBGRUPOS MOLECULARES DE LLC-B

Después de analizar los perfiles de muestras de LLC y controles sanos, hemos seleccionado alrededor de 30000 genes con expresión diferencial entre ambos grupos, descartando del análisis aquellos que no presentaban ningún tipo de variación con respecto al grupo control.

### 2.1.COMPARACION G1+G2 VS. G3 (IgV<sub>H</sub> mutado vs. no mutado)

Al comparar el grupo de muestras con mutaciones en IgV<sub>H</sub> vs. el grupo no mutado, observamos más de 150 genes con expresión diferencial (considerando un  $FDR \leq$

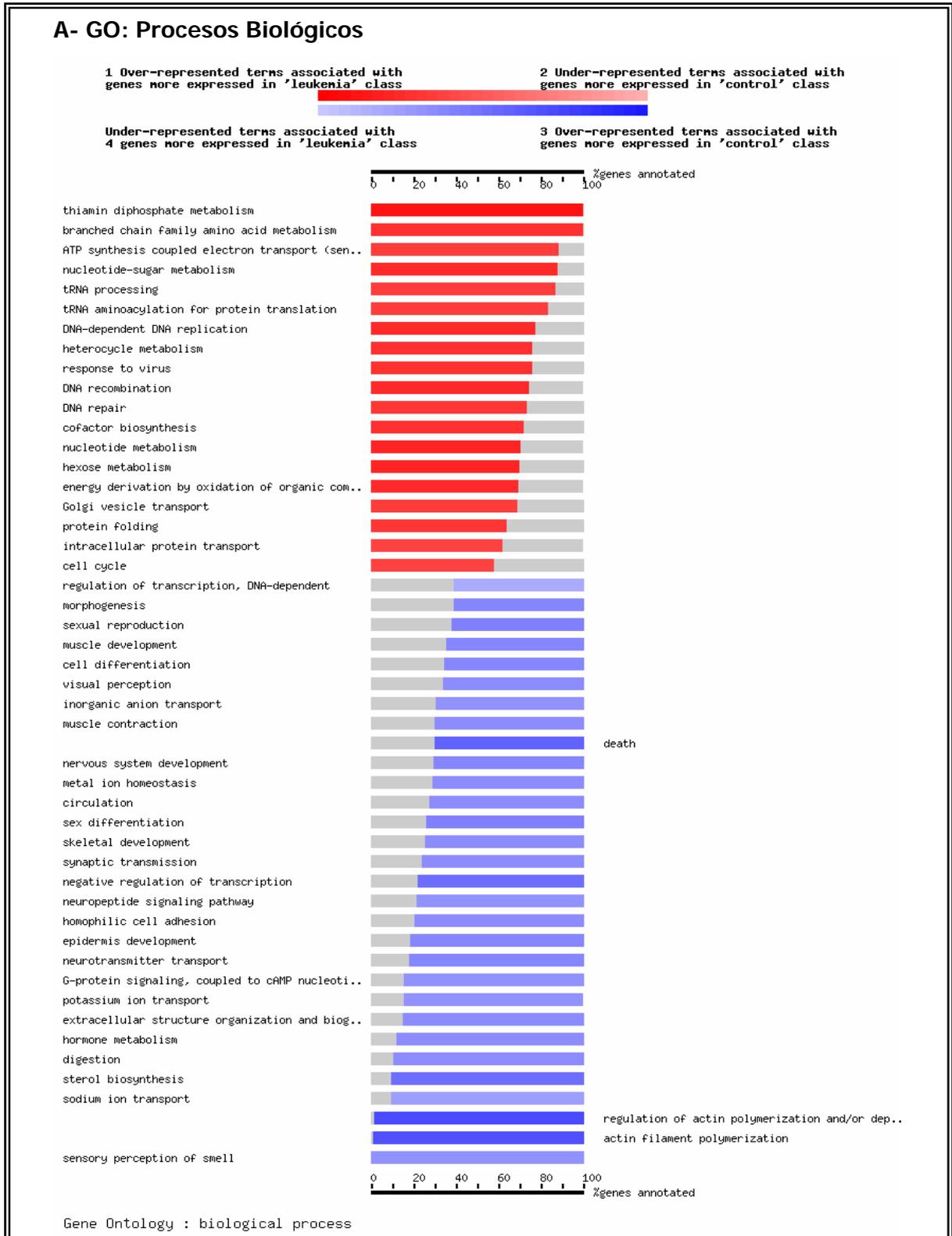
0.05). La Figura 27 muestra los perfiles de expresión en muestras pertenecientes a los grupos anteriormente señalados.

Entre los genes con expresión diferencial en G1+G2 (IgV<sub>H</sub> mutado) más relevantes en nuestro estudio encontramos a BCL11A (B-cell/ lymphoma 11A), un marcador del paso de las células B por el centro germinal, DUSP22 (fosfatasa de especificidad dual 22), PDLIM5 (PDZ y LIM dominio5), SVH (proteína SVH), ADAM29 (metaloproteinasa ADAM dominio29), CD82, WWOX (dominioWW conteniendo oxidoreductasa), FAHD1 (fumarilaceto acetato reductasa). En el grupo con IgV<sub>H</sub> no mutado (G3), algunos de los genes diferencialmente expresados relevantes son: LPL (lipoproteinlipasa), CRY1 (criptocromo 1), MGC9913 (proteína hipotética, pero que tiene un FDR muy significativo= 0.0017), DMD (distrofina), BCL7A (B-cell/ lymphoma 7A), TUBA8 (tubulina alfa 8), ITGA9 (integrina alfa 9), RGS4 (regulador de la señalización por proteína G), IFT57 (transporte intraflagelar homologo 57). Llama la atención la ausencia de ZAP70 en este listado, el cual aparece con una significación estadística escasa en nuestro estudio, aunque coincide con lo hallado en el análisis preliminar de Abruzzo y *col*<sup>178</sup>. Algunos de los genes enumerados anteriormente han sido descritos en estudios anteriores<sup>31,32,179</sup> y dada la coincidencia de varios estudios independientes adquieren relevancia como posibles marcadores en LLC-B.

Anotación funcional: El uso de FatiScan nos ha provisto de información muy interesante sobre bloques de genes que se encuentran conjuntamente sobreexpresados o reprimidos en los grupos comparados (ver Figuras 28 A y B). Así, en el grupo con IgV<sub>H</sub> mutado algunos de los términos de GO y vías KEGG que encontramos significativamente sobre representados son: metabolismo glicerolípido, ribosoma, regulación positiva de I $\kappa$ Bkinasa/NF $\kappa$ B y reprimidos: adhesión celular homofílica, entre otros. En cambio, en los no mutados encontramos sobrerrepresentados: interacciones de receptor con matriz extracelular (ECM), vía de señalización Hedgehog (Hh), uniones de tipo Gap, vía de señalización frizzled-2 (Wnt) o señalización mediada por proteínas G, y subrepresentados o reprimidos: apoptosis.



**FIGURA 26:** FatiScan: Anotación funcional de los genes expresados diferencialmente en LLC-B. **A)** GO: procesos biológicos ( $p < 0.05$ ). **B)** KEGG ( $p < 0.05$ ).



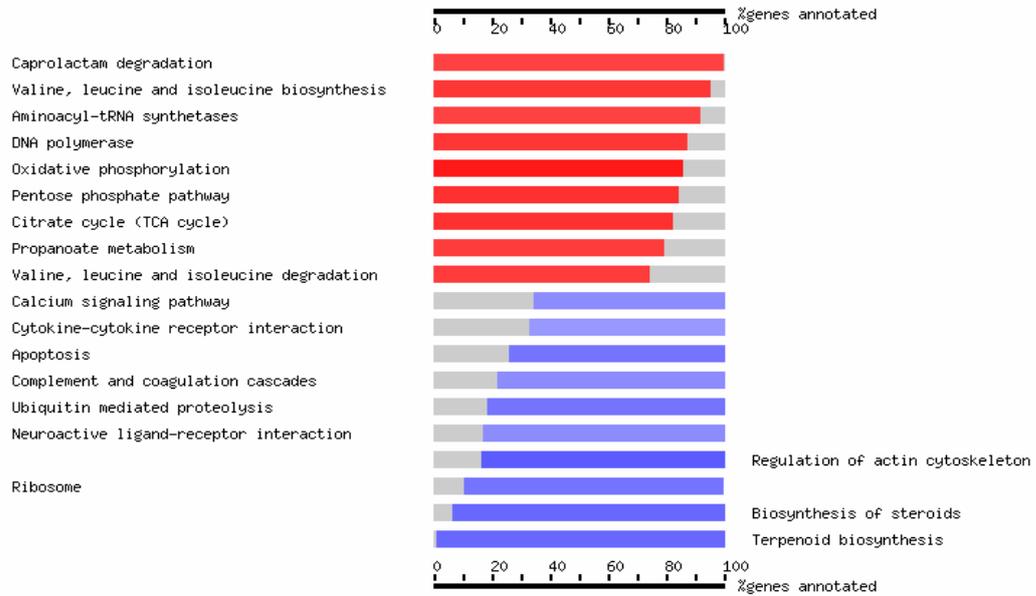
## B- KEGG

1 Over-represented terms associated with genes more expressed in 'leukemia' class

2 Under-represented terms associated with genes more expressed in 'control' class

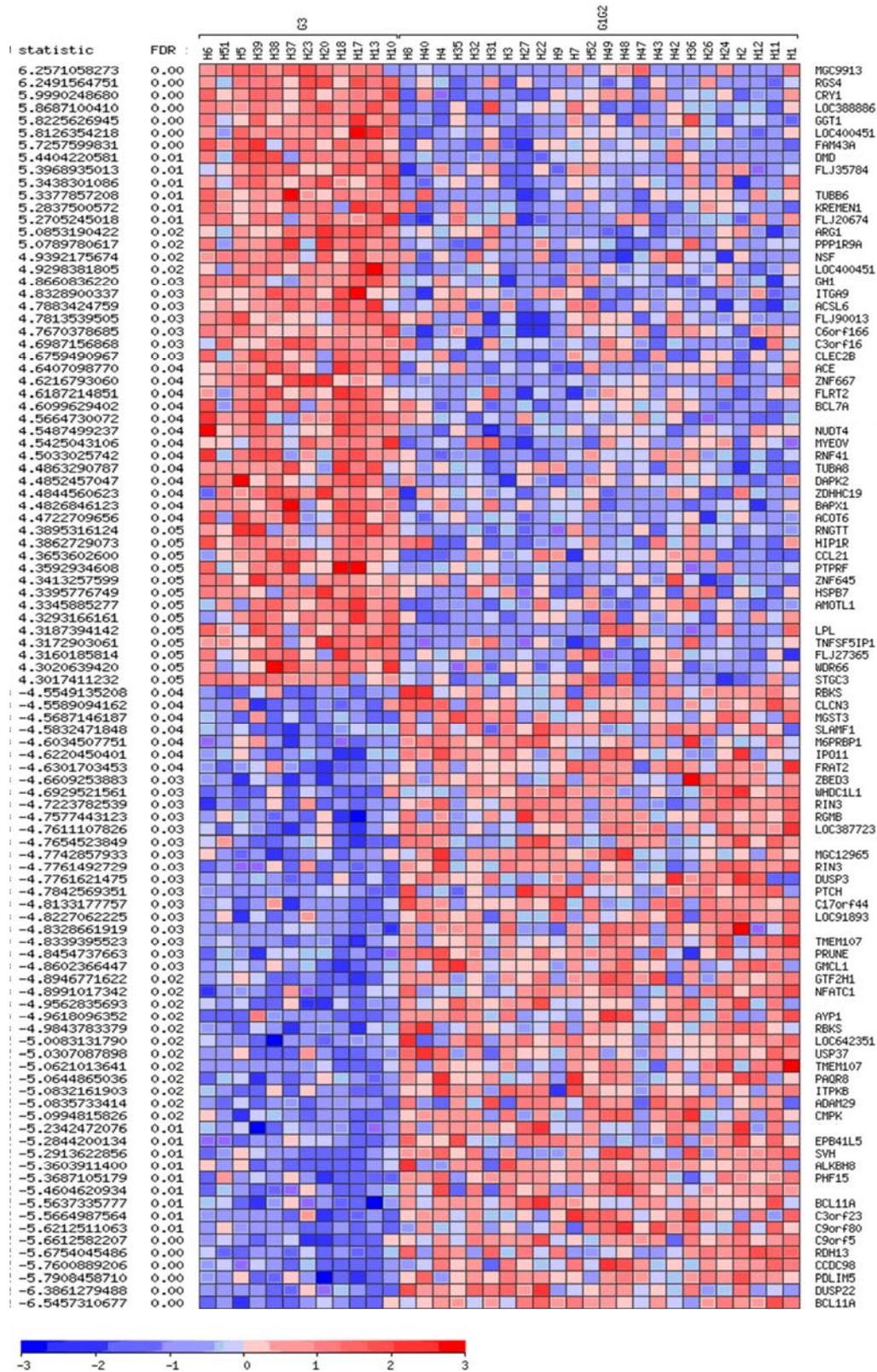
4 Under-represented terms associated with genes more expressed in 'leukemia' class

3 Over-represented terms associated with genes more expressed in 'control' class



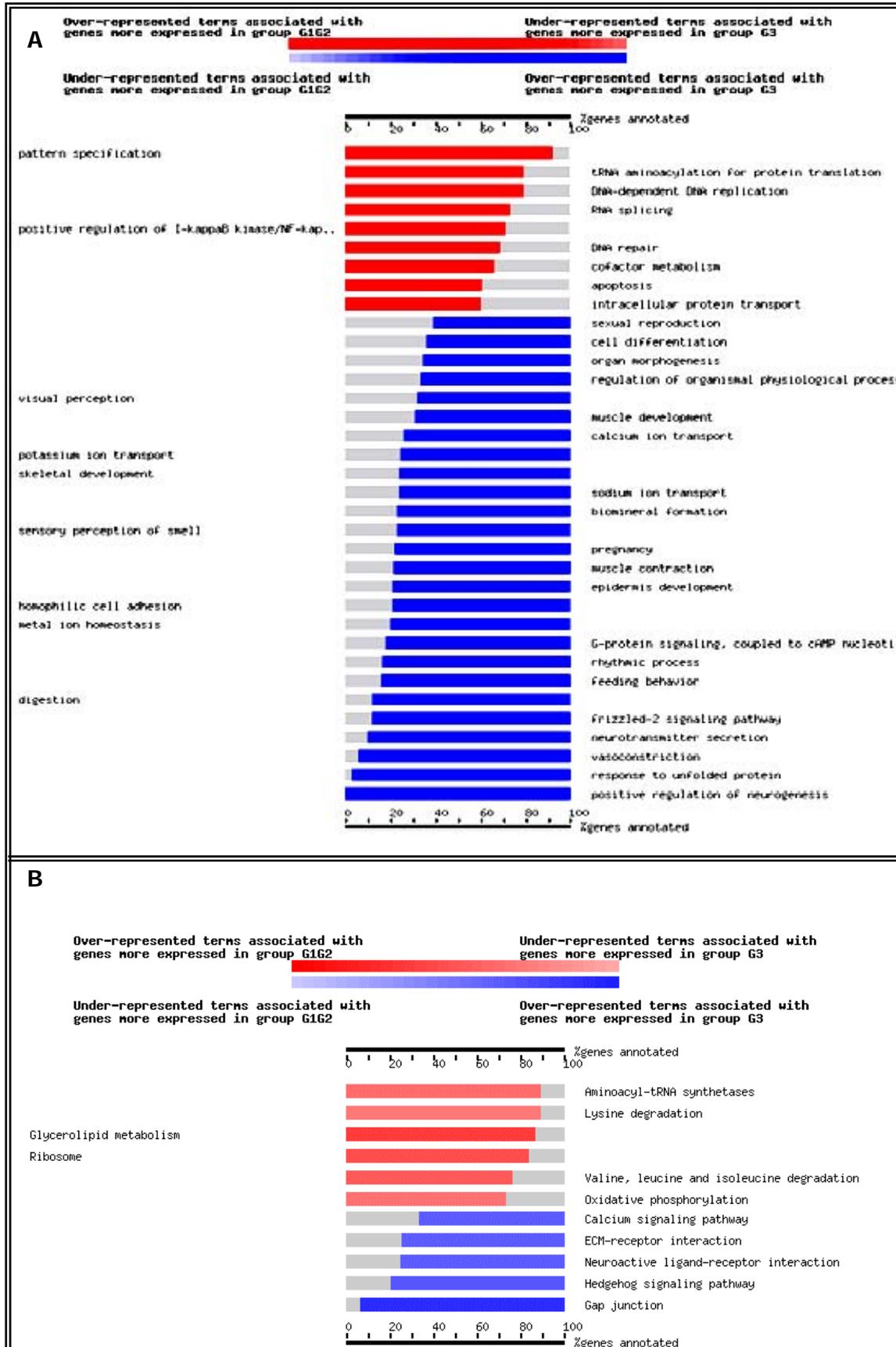
KEGG pathways

**FIGURA 27:** Perfiles de expresión de muestras de LLC-B de acuerdo al estado mutacional de IgV<sub>H</sub>.



En la figura los genes aparecen ordenados según su estadístico siendo los valores negativos o positivos según su nivel de expresión sea menor o mayor, respectivamente. Así, en rojo aparecen los genes sobreexpresados y en azul los subexpresados. La significación estadística de las diferencias encontradas en esta comparación (G1+G2 vs. G3) está dada por el valor de FDR indep (false discovery rate) el cual se calcula corrigiendo por el número de comparaciones realizadas en cada caso.

**FIGURA 28:** Resultados de FatiScan: comparación IgV<sub>H</sub> mutado (G1G2) vs. IgV<sub>H</sub> no-mutado (G3). **A):** GO: procesos biológicos (p<0.05). **B)** KEGG (p<0.05)



## **2.2. COMPARACION G1 VS. G2: (IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL-6 no mutado vs. IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL-6 no mutado)**

A continuación, analizamos los perfiles de expresión de acuerdo a la presencia o no de mutaciones en BCL-6 en el grupo de muestras con IgV<sub>H</sub> mutados (G1 vs. G2), dado que resultados previos de nuestro laboratorio indican que la presencia de mutaciones en el gen BCL-6, identifica un subgrupo de pacientes con alto riesgo de progresión a pesar de la presencia de mutaciones en el gen de las inmunoglobulinas<sup>55</sup>. En el grupo de muestras analizado, no se encuentran genes expresados diferencialmente de manera significativa entre ambos grupos, sin embargo, la metodología implementada por FatiScan, encuentra que el proteasoma está subrepresentado en el grupo G2 mientras que la fosforilación oxidativa está sobrerrepresentada en el grupo G1 y en este mismo grupo aparece reprimida la comunicación celular (ver figura 29 A y B). Esto señala que hay caracteres comunes entre estos grupos de datos que pueden ser revelados de manera más efectiva utilizando el análisis por bloque de genes que en el caso de un análisis simple de gen a gen.

## **2.3. COMPARACION G1+G3 VS. G2 (BCL-6 no mutado vs. BCL-6 mutado).**

En este caso se encuentran unos 50 genes con expresión diferencial. En el grupo con BCL-6 no mutado, los genes con mayor significación estadística son LOH11CR2A e IFT57, en cambio en G2 los primeros del listado son DUSP22 y CD82. Es de destacar que en el análisis por vías, la señalización célula-célula estaba sobreexpresada en el grupo con BCL-6 mutado.

## **2.4. COMPARACION CD38+ VS. CD38-.**

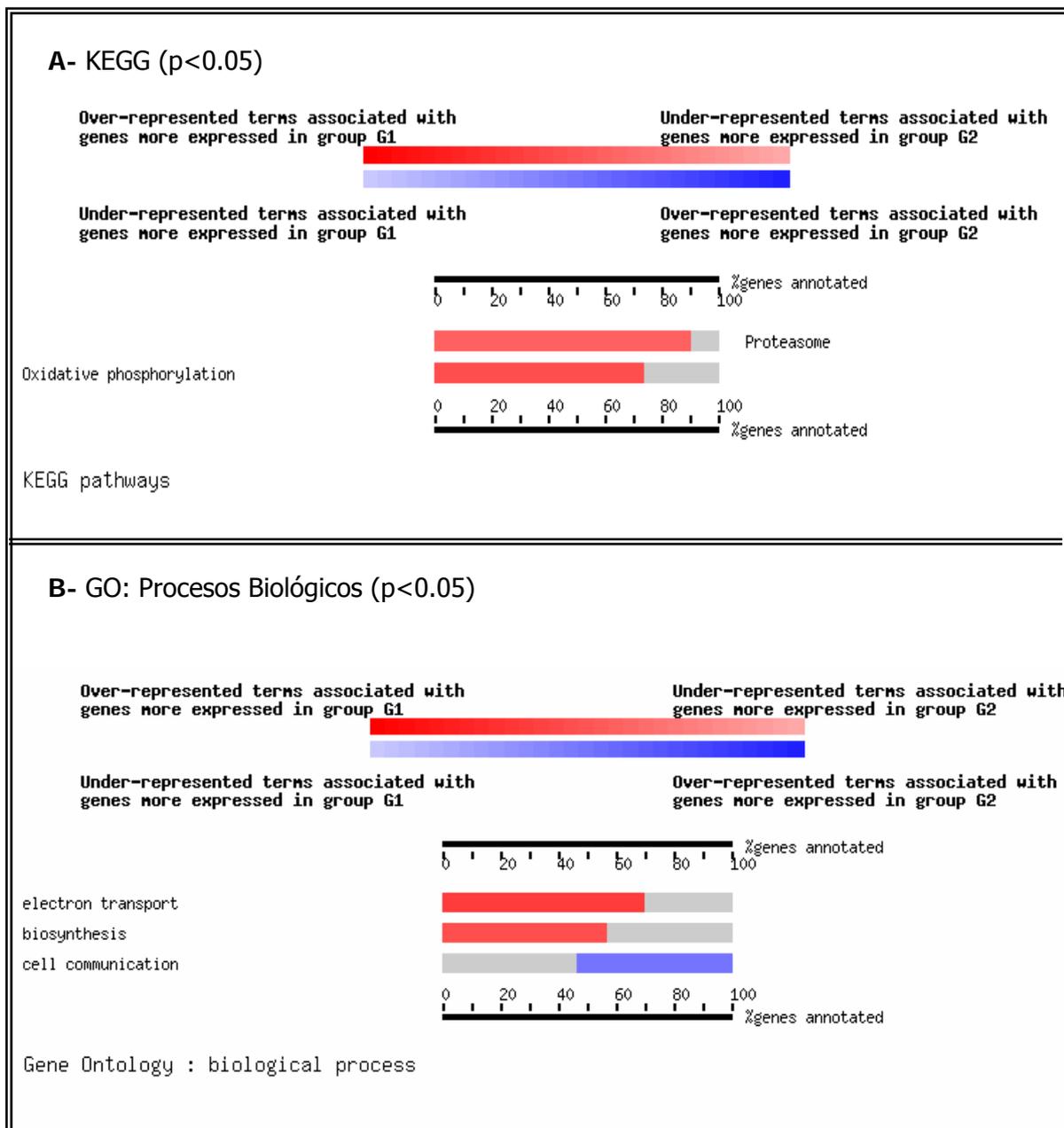
Igual que en otras comparaciones, si bien no hay genes con expresión diferencial entre ambos grupos, mediante el uso de FatiScan fuimos capaces de encontrar algunas vías KEGG (ver figura 30) con diferencias significativas entre ambos grupos, así por ejemplo el proteasoma aparece subrepresentada en el grupo CD38- y sobrerrepresentada la señalización vía receptor T (que comparte muchos componentes intracelulares con la señalización B) en este mismo grupo.

## **2.5. COMPARACION ZAP70+ VS. ZAP70-.**

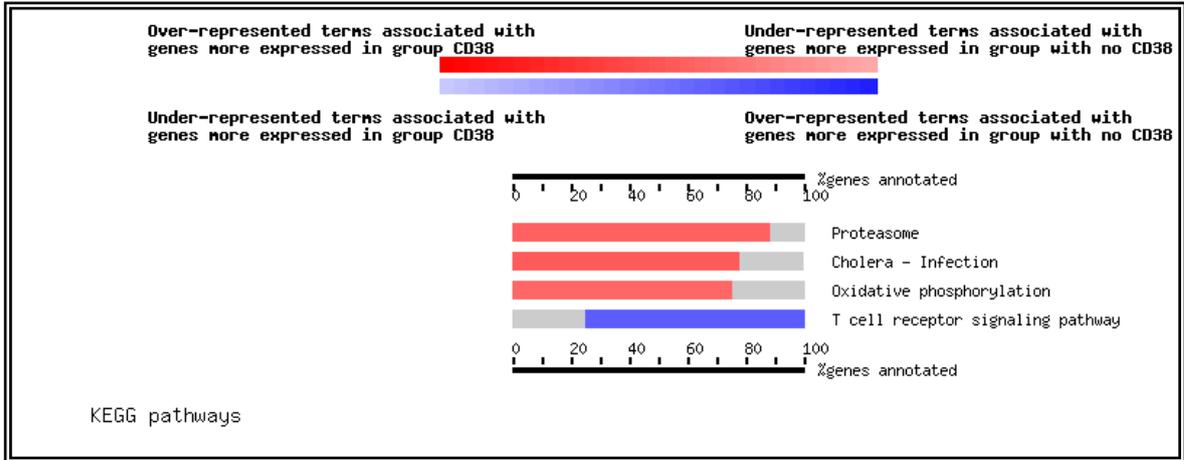
Nuevamente, a pesar de no encontrar diferencias a nivel de expresión de genes de manera individual, FatiScan demuestra su sensibilidad al encontrar que conjuntos de

genes que comparten anotaciones funcionales (KEGG y términos de GO) presentan diferencias en sus niveles de expresión al comparar muestras ZAP70 positivas y negativas. La figura 31 (A y B) muestra los resultados obtenidos con significación estadística ( $p < 0.05$ ). En las muestras con ZAP70+ encontramos activada la regulación de la transducción de señales y reprimida la respuesta de defensa celular, mientras que en las ZAP70- encontramos sobrerrepresentados el reconocimiento celular o la apoptosis, y reprimidos el catabolismo, proteasoma y fosforilación oxidativa.

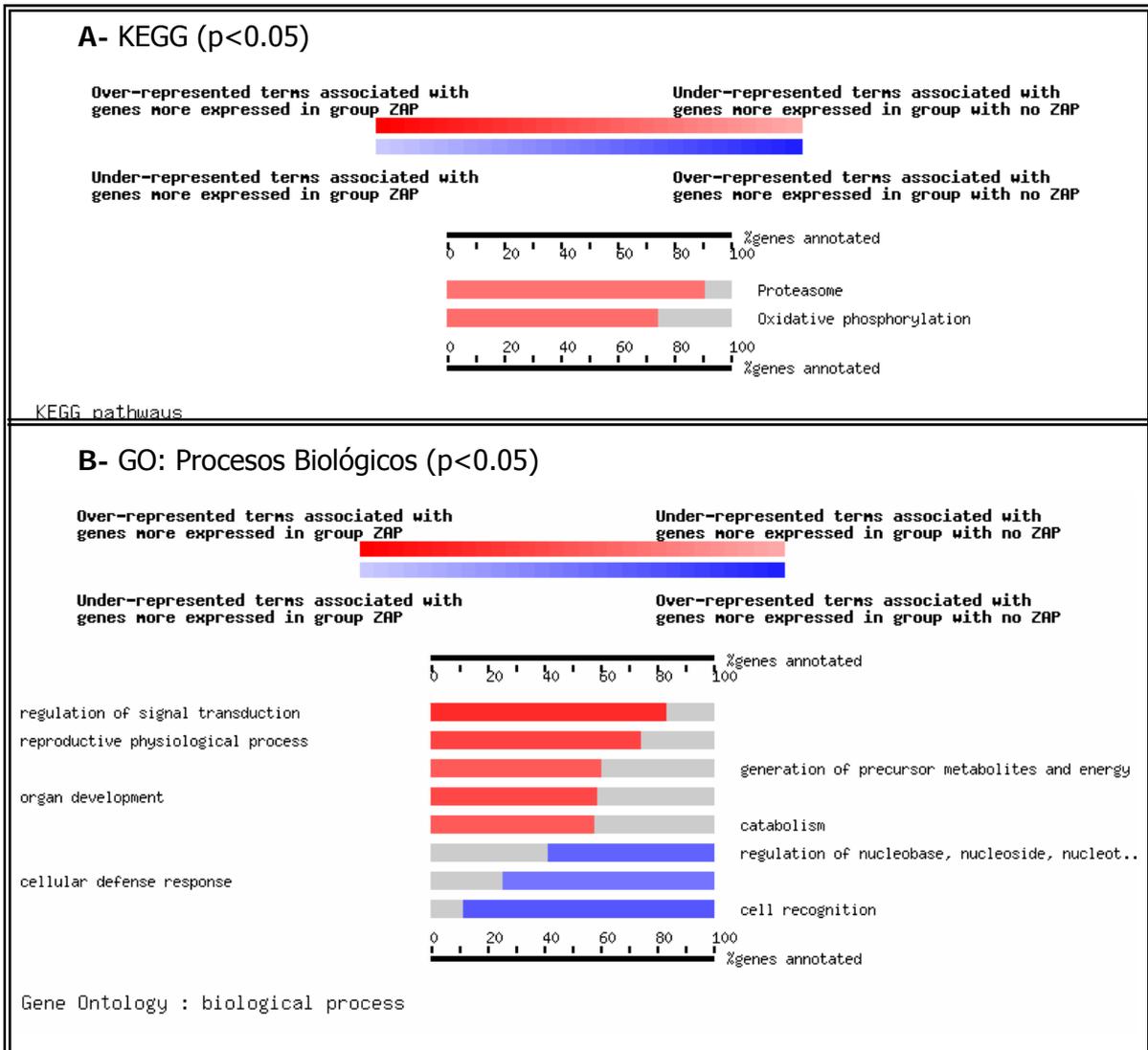
**FIGURA 29:** Resultados de FatiScan: comparación IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL-6 no-mutado (G1) vs. IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL-6 mutado (G2). **A)** KEGG ( $p < 0.05$ ). **B)** GO: Procesos biológicos ( $p < 0.05$ )



**FIGURA 30:** Resultados de FatiScan: comparación CD38+ vs. CD38-



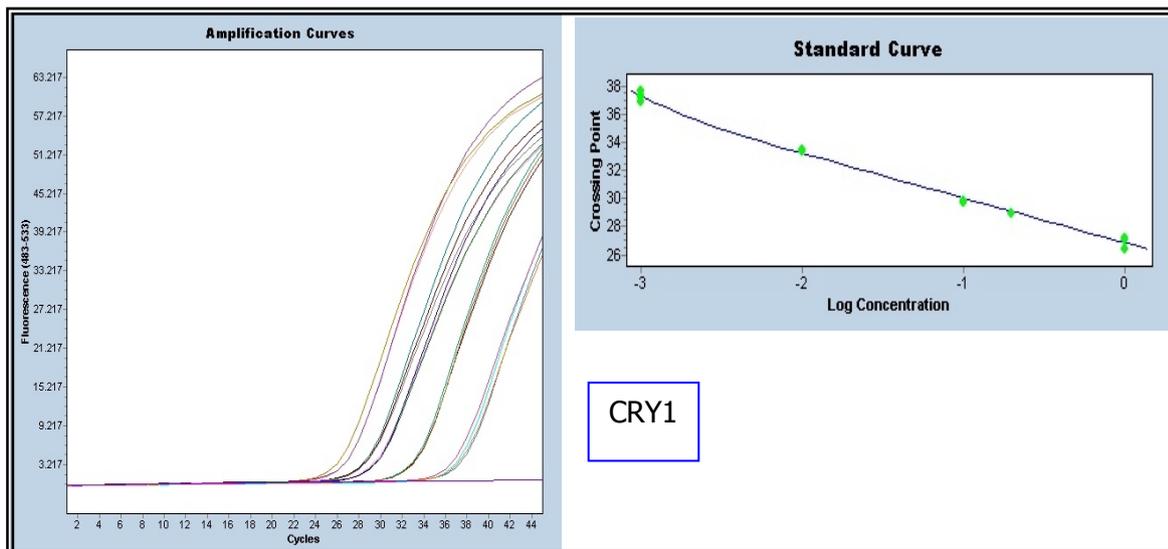
**FIGURA 31:** Resultados de FatiScan: comparación ZAP70+ vs. ZAP70-. **A)** KEGG ( $p < 0.05$ ). **B)** GO: procesos biológicos ( $p < 0.05$ ).



### 3. VALIDACION DE LOS DATOS DE PERFILES DE EXPRESION POR PCR A TIEMPO REAL

Las plataformas de micromatrices de ADN permiten la evaluación simultánea de miles de genes en un único experimento, sin embargo, es necesario validar los resultados mediante una técnica más sensible como la RTqPCR para detectar pequeños cambios en los niveles de expresión de los genes. Por lo tanto, para validar los resultados obtenidos a partir de las micromatrices, seleccionamos 14 genes de acuerdo a varios criterios: en primer lugar aquellos cuyo valor estadístico mostrara los valores más significativos, en segundo lugar en base a sus posibles implicaciones funcionales y en tercer lugar aquellos que hubieran surgido de otros estudios en LLC-B usando diferentes tipos de matriz. Para la validación, se utilizó PCR cuantitativa a tiempo real (RTqPCR) con tecnología TaqMan®. En todos los casos, previo a la realización de los ensayos, se realizaron curvas con diluciones seriadas de un calibrador (en nuestro estudio, usamos ADNc proveniente de células Jurkat) para calcular las eficiencias de cada ensayo (ver Figura 32), y los valores obtenidos estaban comprendidos entre 1.64 y 2.00 (ver Tabla 10).

**FIGURA 32:** Ejemplo de curva con diluciones seriadas y curva estándar para el cálculo de las eficiencias en RTqPCR.



Las reacciones de PCR fueron realizadas en un equipo LC 480 (Roche). La curva de diluciones seriadas (por triplicado) se realizó a partir de ADNc de células Jurkat.

**TABLA 10:** Valores de eficiencia para las reacciones de RTqPCR

Gen	Eficiencia
GUS	1.70
CRY1	2.00
LPL	1.64
MGC9913	1.86
BCL7A	2.00
IFT57	1.77
FUT8	1.98
DUSP22	1.80
BCL11A	1.93
CD82	1.79
ITGA9	1.89
ZAP70	1.88
FAHD1	1.80
PDLIM5	1.89
SVH	1.89

Las eficiencias fueron calculadas mediante curva de diluciones seriadas usando un calibrador (ADNc de Jurkat). El valor de la pendiente de dicha curva se utiliza para calcular la eficiencia de cada reacción, mediante la fórmula:  $E = (10^{-1/\text{pendiente}})$

A continuación, investigamos los niveles de expresión de los genes seleccionados usando el gen GUS como control endógeno en 35 muestras (en una única muestra no obtuvimos suficiente ARN para utilizarla en los estudios de validación). Los resultados de expresión relativa fueron calculados mediante el método de normalización con calibrador y con corrección de eficiencias lo que permite que se puedan comparar resultados provenientes de diferentes ensayos, minimizando la variabilidad entre ellos (ver tabla 11).

Los 14 genes analizados fueron validados de manera satisfactoria cuando su expresión relativa fue comparada entre muestras con IgV<sub>H</sub> mutado y no mutado, mediante prueba estadística de Mann Whitney (estadística no-paramétrica), siendo los de mayor significación estadística los genes CRY1, LPL y MGC9913 ( $p < 0.001$ ) seguidos de BCL7A ( $p = 0.002$ ), todos ellos con valores mas elevados en el grupo de muestras con IgV<sub>H</sub> no mutado. En el caso de la determinación de ZAP70, en el presente estudio, este gen no presentaba diferencias significativas (tomando un valor de corte de FDR  $\leq 0.05$ ) entre ambos grupos de muestras, sin embargo, la RTqPCR demostró claramente una expresión mas elevada de ZAP70 en el grupo de muestras con IgV<sub>H</sub> no mutado.

**TABLA 11:** Validación de resultados de expresión relativa obtenidos por RTqPCR.

Gen	IgV <sub>H</sub>		p (prueba de Mann Whitney)
	No mut (media + 2SEM)	Mut (media + 2SEM)	
CRY1	0.335 + 0.114	0.075 + 0.050	<0.001
LPL	297.01 + 89.32	53.62 + 44.86	<0.001
MGC9913	1.96 + 1.193	0.308 + 0.302	<0.001
BCL7A	0.2512 + 0.128	0.062 + 0.038	0.002
IFT57	0.919 + 1.718	0.647 + 0.170	0.007
FUT8	0.966 + 0.334	1.841 + 0.370	0.007
DUSP22	0.649 + 0.361	1.383 + 0.504	0.008
BCL11A	0.641 + 0.140	0.937 + 0.160	0.008
CD82	0.359 + 0.100	1.044 + 0.382	0.011
ITGA9	0.381 + 0.122	0.221 + 0.070	0.025
ZAP70	0.412 + 0.384	0.151 + 0.056	0.033
FAHD1	0.855 + 0.214	1.259 + 0.196	0.037
PDLIM5	0.684 + 0.136	0.961 + 0.192	0.049
SVH	1.051 + 0.252	1.689 + 0.394	0.049

Se realizó RTqPCR usando tecnología TaqMan. Los resultados están expresados como concentración relativa, mediante método de cuantificación relativa con normalización, usando gen GUS como control.

## **VII. DISCUSION: CAPITULO II**

### **ESTUDIO DE PERFILES DE EXPRESION GENICA EN LLC-B. CORRELACION CON MUTACIONES EN GENES IgV<sub>H</sub> y BCL-6**

En este capítulo, nuestro objetivo fue obtener una firma molecular característica de la LLC-B en estadio A de Binet y luego encontrar diferencias entre los perfiles de expresión génica entre grupos moleculares de LLC con diferente evolución clínica. Para conseguirlo, hemos usado una micromatriz de ADN de alta densidad, que cubre 54000 transcritos y sus variantes, con el fin de obtener información lo más completa, actual y precisa posible. Para ello, la plataforma elegida fue el modelo HG U133 Plus 2.0 de Affymetrix, una de las más completas existentes hasta el momento en el mercado que permite determinaciones con mejor significación estadística, de manera mas sensible y específica que cualquier otra tecnología previa a su desarrollo, pero que requiere el uso de herramientas bioinformáticas capaces de procesar el inmenso número de datos que se generan a partir de este tipo de estudios.

Por otra parte, cabe destacar la meticulosa selección de los casos (todos correspondientes a pacientes con LLC-B en estadio A de Binet, con enfermedad estable y sin tratamiento previo) que permite sacar conclusiones sobre factores de pronóstico que pueden utilizarse al momento de realizar el diagnóstico de esta enfermedad.

## 1. LLC-B: EXPRESION GENICA DIFERENCIAL Y PERFIL FUNCIONAL

En un primer análisis, no supervisado, se obtuvo claramente una separación entre muestras leucémicas y linfocitos B de donantes sanos, lo cual señala que estos dos grupos expresan genes de manera diferencial. Un hallazgo interesante resultó el de encontrar agrupadas en una misma rama del arbol jerárquico, muestras con gen de  $IgV_H$  no mutado y expresión alta de CD38 (figura 23), demostrando que las mismas podrían tener características especiales que las separan de las demás, probablemente por su mayor tendencia a proliferar.

En la búsqueda de genes con expresión diferencial entre muestras de LLC-B y linfocitos B normales, el gen que aparece mas expresado en los linfocitos B de la LLC-B es GLIPR1, el cual tiene actividades pro-apoptóticas en células de cáncer de próstata y de vejiga<sup>180</sup>. Otro gen interesante es ASXL2, gen asociado a cáncer que pertenece a la familia CXXC. El gen humano se encuentra en el cromosoma 2p23.3, uno de los puntos calientes de sitios frágiles asociados con carcinogénesis<sup>181</sup> y que se ha descrito como una de la regiones de ganancia cromosómica en ciertos casos de LLC-B, sobre todo en aquellos con cariotipo complejo<sup>182</sup>. NEDD8 es otro de los genes mas

expresados en leucemia, el cual codifica una proteína parecida a ubiquitina involucrada en el control de ciclo celular y embriogénesis<sup>183,184</sup>. SCLY, una selenocisteína ligasa, también aparece entre los genes leucémicos característicos, codifica un factor de transcripción de tipo hélice-lazo-hélice esencial para el desarrollo de todos los linajes hematopoyéticos<sup>185,186</sup>.

Cuando hablamos de perfil funcional de la LLC, podemos describir varios términos de GO y vías KEGG significativamente sobrerrepresentadas en esta patología. Analizando los datos en conjunto se podría especular que los linfocitos B de la LLC tienen rutas metabólicas más activas que los linfocitos B normales, y que la acumulación de células B en esta enfermedad está más relacionada con mayor proliferación que con la inhibición de la muerte celular, en concordancia con la visión actual que se tiene de esta leucemia<sup>21</sup>.

## 2. PERFIL TRANSCRIPTOMICO EN GRUPOS MOLECULARES DE LLC-B

### 2.1. COMPARACION G1+G2 VS. G3 (IgV<sub>H</sub> mutado vs. IgV<sub>H</sub> no mutado):

El efecto del estado mutacional de IgV<sub>H</sub> sobre el transcriptoma en LLC-B ha sido investigado en varios estudios<sup>19,31,43,187</sup>, sin embargo, el número de transcritos incluidos en dichos estudios fue mucho menor que el utilizado en éste. Como parte de los genes característicos de las LLCs no mutadas encontramos algunos genes que ya se han mencionado con anterioridad tales como LPL, DMD, CRY1 y BCL7A<sup>19,31,43,187,188</sup>, mostrando un perfil similar en este grupo incluso al usar una matriz de más alta densidad, sugiriendo que en realidad estos genes deben de jugar un papel importante en la biología de este subgrupo. En nuestro estudio, la expresión del gen **MGC9913** también aparece ligada al grupo no mutado en IgV<sub>H</sub>. Si bien sus funciones aún no han sido descritas, este mismo transcrito aparece referido recientemente como un posible biomarcador para diferenciar muestras de LLC de acuerdo al estado mutacional de IgV<sub>H</sub><sup>188</sup>. Cabe destacar que **ZAP70** no se encontraba entre los genes con mayor diferencia en su expresión entre muestras mutadas y no mutadas, lo que resulta sorprendente, aunque concuerda con los hallazgos preliminares del trabajo de Abbruzzo y *col*<sup>78</sup>. En numerosas publicaciones, sin embargo, aparece descrito como uno de los genes con mayor diferencia en expresión cuando las muestras de LLC se agrupan de acuerdo a la presencia o no de mutaciones en el gen de IgV<sub>H</sub><sup>31,43,187</sup>. En cualquier caso, al realizar la validación de los datos derivados del estudio

transcriptómico por RTqPCR, decidimos incluir al ZAP70, dando como resultado que las muestras no mutadas en IgV<sub>H</sub> tienen mayores niveles de ARNm de ZAP70 cuando se las compara con las mutadas, pero aún utilizando esta técnica, existen un 17% de casos discordantes.

Un gen que nos ha llamado la atención, y al que no se le ha dado mayor importancia en otros estudios, es **CRY1**<sup>178,189</sup>, uno de los componentes del reloj circadiano que se encuentra sobreexpresado en las LLCs con genes IgV<sub>H</sub> no mutados. Se ha sugerido que un mal funcionamiento del reloj circadiano podría llevar a un aumento del cáncer de mama en humanos y a una tasa mayor de aparición de tumores inducidos por radiaciones ionizantes en ratones<sup>190</sup>. También se ha publicado la presencia de una transcripción cíclica y significativa de genes del reloj circadiano en PBMC periféricas de controles sanos<sup>191</sup> y de una expresión anómala de CRY1 (entre otros genes componentes de este ciclo) tanto en la fase crónica como en las crisis blásticas de la leucemia mieloide crónica<sup>192</sup>. Dos componentes clave del reloj circadiano regulados por CRY1 son CLOCK y BMAL1, los cuales forman un complejo que puede estar directamente involucrado en la regulación de la expresión de genes relacionados con ciclo celular y apoptosis, en cuyo caso, variaciones diarias y dependientes del genotipo en el balance de estos productos podrían determinar la respuesta al estrés a nivel celular individual y también modular la respuesta del organismo ante varios tipos de estrés genotóxico, incluyendo quimioterapia y radiaciones<sup>193,194</sup>.

**LPL** es otro gen cuya expresión en LLC-B está ligada al estado mutacional de IgV<sub>H</sub>. Niveles altos de expresión de esta enzima esencial para el metabolismo lipídico están asociados con LLC no mut<sup>6,19,31,179,188,195</sup>. Se ha demostrado que niveles altos de ARNm de LPL correlacionan con menor tiempo al tratamiento y menor supervivencia global en pacientes con LLC-B, por lo que ha sido propuesto como un nuevo y eficaz marcador de pronóstico en esta enfermedad<sup>87,86,195,196</sup>. A pesar de que su función en LLC no está bien descrita, podría jugar un papel en la formación o estabilización de los "lipid raft", un proceso biológico importante para la activación de las células B<sup>87</sup>.

Además de los genes anteriormente mencionados, uno de los más significativamente diferenciados en nuestro estudio ha sido **BCL11A**, sobreexpresado en muestras con IgV<sub>H</sub> mutado. BCL11A codifica para una proteína con dedos de Zn, normalmente expresada a niveles altos en las células B del centro germinal y en cerebro fetal. Su homólogo murino está localizado en un sitio de integración retroviral en leucemias mieloides y podría ser la causa de estos tumores en parte a través de su interacción con BCL-6<sup>197</sup>. Satterwhite y *col*<sup>198</sup>, usando hibridización *in situ* con sondas

antisentido para BCL11A, determinaron que sólo las células B del CG eran capaces de hibridar con la sonda, mientras que no se detectó señal en las células vecinas de la zona del manto, indicando una regulación muy estricta de la expresión de BCL11A durante el desarrollo de la célula B. Nuestro hallazgo de que BCL11 está sobreexpresado en las muestras con IgV<sub>H</sub> mutado, podría ser un argumento más a favor de considerar estas células como células que han atravesado el centro germinal.

**DUSP22**, una fosfatasa dual, también se encuentra entre los genes sobreexpresados en el grupo IgV<sub>H</sub> mutado de LLC. Esta fosfatasa tiene la capacidad de activar específicamente la vía de señalización JNK<sup>199</sup>. La activación de JNK ha sido implicada en un número de importantes procesos fisiológicos, que van desde la morfogénesis embrionaria hasta la supervivencia celular y apoptosis. La vía de señalización JNK también está ligada a algunas enfermedades humanas, incluyendo el desarrollo de algunos tumores, hipertrofia cardíaca, daño de isquemia/ reperfusión, diabetes, apoptosis inducida por hiperglucemia y varias enfermedades neurodegenerativas<sup>200-203</sup>. Cuando se expresa DUSP22 en una línea celular derivada de células T (Jurkat), se suprime la inducción de la activación del receptor T de ERK2<sup>204</sup>, pero su expresión en células B necesita ser más profundamente estudiada.

Otro gen interesante derivado de nuestro estudio es **CD82**, un gen supresor de metástasis, que codifica una glicoproteína miembro de la superfamilia de proteínas transmembrana. La expresión de este gen en hemopoyesis normal y maligna ha sido estudiada por Burchert y *col*<sup>205</sup>. Ellos encontraron que CD82 se encuentra abundantemente expresado tanto en células hemopoyéticas primitivas como en progenitores comprometidos, y en varios tipos de leucemias tales como la leucemia mieloide crónica, leucemia mieloide aguda y LLC-B. Solo un tercio de los linfocitos de sangre periférica son levemente positivos para CD82. Sin embargo, en linfocitos relativamente maduros como los de la LLC, se encuentra un aumento de la transcripción y expresión de CD82 cuando se los compara con PBMC de individuos sanos, pero en este trabajo no se discriminan niveles de expresión de CD82 de acuerdo al estado mutacional de IgV<sub>H</sub>. Basados en estos datos, la sobreexpresión constitutiva de CD82 en leucemias no parece estar asociada de manera exclusiva con un estado de progenitor indiferenciado, sino que más bien parece reflejar una expresión aberrante y un fenómeno de desregulación inmunológica en diferentes leucemias<sup>205</sup>. Otro trabajo interesante señala que la expresión de CD82 disminuye durante la progresión tumoral en cierto tipo de cánceres y que podría ser activado por p53 a través de una secuencia consenso en el promotor de CD82<sup>206</sup>. La expresión de

CD82 y p53 están fuertemente relacionadas y la pérdida de expresión de ambas proteínas se asocia con menor supervivencia en cáncer de próstata <sup>206</sup>. De acuerdo con estos datos, en el presente estudio CD82 está subexpresado en el grupo de IgV<sub>H</sub> no mutado, sugiriendo un papel de este gen en el comportamiento clínico más agresivo observado en este subgrupo de pacientes.

La expresión de **FUT8**, una  $\alpha$ 1-6 fucosil transferasa, es mayor en las muestras de LLC con IgV<sub>H</sub> mutado respecto a las no mutadas. Así este gen ha sido propuesto como biomarcador del estado mutacional de IgV<sub>H</sub><sup>188</sup> y también lo han descrito como diferencialmente expresado en el grupo de muestras con del11q23 <sup>19</sup>.

Anotación Funcional: En este estudio, hemos encontrado que existe una regulación positiva de I $\kappa$ B quinasa/ NF $\kappa$ B en el grupo de muestras con IgV<sub>H</sub> mutado. Un trabajo reciente, encuentra que genes pertenecientes a esta vía de señalización se encuentran asociados con mayor tiempo libre de progresión en pacientes con LLC-B<sup>207</sup>.

El hallazgo de que las vías de señalización de Hedgehog (Hh) y Wnt estén sobreexpresadas entre las muestras con IgV<sub>H</sub> no mut, merece ser destacado.

La vía de Wnt se encuentra involucrada en la proliferación y diferenciación celular y en oncogénesis, y su papel en la linfopoyesis ha sido puesto en evidencia en varios trabajos, que demuestran su influencia en la proliferación de tejido linfóide tanto normal como tumoral <sup>208-211</sup>. En realidad, Wnt16 (un miembro de la familia Wnt), fue inicialmente clonado debido a su sobreexpresión en células de leucemia pre-B encontrándose expresado de manera abundante en células normales pro-B y en células de LLC<sup>209,212,213</sup>. Específicamente, en células de LLC-B, se ha descrito la sobreexpresión de 6 de los 19 genes Wnt, del gen Fzd3 (uno de los miembros de su familia de receptores)<sup>31,213</sup> y la regulación negativa de SFRP, un regulador negativo de la señalización Wnt<sup>214</sup>. También se han encontrado 3 genes Wnt (Wnt3, Wnt5b y Wnt14) presentes en mayores niveles en el grupo de LLC con IgV<sub>H</sub> no mutado con respecto al mutado, sugiriendo todos estos datos que la activación aberrante de la señalización Wnt en la LLC, especialmente en el grupo de mal pronóstico clínico (IgV<sub>H</sub> no mutado), podría estar implicada en la supervivencia aumentada de estas células, y por lo tanto, uno de los mecanismos involucrados en la patogénesis de este subgrupo molecular de LLC<sup>207,213,215</sup>.

Con respecto a la señalización Hh, se sabe que Sonic Hedgehog (Shh) es producido por las células dendríticas foliculares principalmente en el CG y es capaz de rescatar a las células B del CG de la apoptosis inducida por Fas, indicando que Shh podría ser una

de las señales de supervivencia provenientes del microentorno que previene de la apoptosis a las células B post CG<sup>106</sup>.

Algunos de los componentes de la matriz extracelular como la fibromodulina (una proteína producida por los tejidos ricos en colágeno) ha sido encontrada a nivel de expresión génica como característica de la LLC-B <sup>32,216,217</sup>, aunque la razón de su expresión ectópica en esta patología no ha sido aclarada. En nuestro caso, las interacciones entre receptor y matriz extracelular (ECM), a nivel de vías de señalización, están sobre-representadas entre las muestras con gen IgV<sub>H</sub> de línea germinal, indicando que posiblemente esté implicada en el comportamiento más agresivo de éste subgrupo molecular.

Todos los datos de vías metabólicas y cascadas de señalización que hemos mencionado nos llevan a hipotetizar que la heterogeneidad molecular que conduce a diferentes comportamientos clínicos en la LLC podría estar mediada por el hecho de que las células con IgV<sub>H</sub> no mutado son más receptivas a las señales del microambiente o porque usen mecanismos autocrinos para iniciar una secuencia de eventos que conduzcan finalmente a la proliferación de la célula B leucémica e inhibición de la maquinaria apoptótica.

## **2.2. COMPARACION G1 VS. G2**

En los resultados de la comparación G1 vs. G2, resulta llamativo no encontrar genes expresados de manera diferencial entre ambos grupos moleculares ya que clínicamente ambos grupos se comportan de manera significativamente diferente, requiriendo los pacientes del grupo G2 (IgV<sub>H</sub> mut y BCL-6 mut) tratamiento de manera más precoz que los del grupo G1<sup>55</sup>. Sin embargo, la herramienta bioinformática FatiScan encuentra términos de GO y vías KEGG con expresión diferencial al comparar estos dos grupos indicando que existen rasgos comunes dentro de cada conjunto de datos. Resulta relevante el hecho que en el grupo IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL-6 mutado, el término proteasoma se encuentra subrepresentado. Esto está de acuerdo con los resultados que mostramos en la sección de ensayos funcionales en LLC-B, en los cuales, en este grupo de muestras, las células de LLC-B en cultivo responden con menor intensidad a la inducción de apoptosis por Bortezomib (un inhibidor de proteasoma), lo que podría explicarse por la represión de los componentes de este sistema encontrado en este grupo de muestras<sup>159</sup>.

### **2.3. COMPARACION G1+G3 VS. G2 (BCL-6 no mutado vs. BCL-6 mutado)**

Entre los genes con perfil de expresión más diferencial en el grupo con BCL-6 no mutado encontramos a LOH11CR2A (pérdida de heterocigocidad 11, cromosoma 2 A) cuya función está relacionada con regulación negativa de la progresión del ciclo celular, seguido de IFT57, un gen involucrado en apoptosis y activación de caspasas. Encabezando la lista de los genes más expresados en las muestras con BCL-6 mutado encontramos a DUSP22 y CD82, cuyas funciones hemos comentado anteriormente.

### **2.4. COMPARACION CD38+ VS. CD38-**

A pesar de no hallar genes con expresión diferencial al hacer estas comparaciones, el uso de la herramienta FatiScan, dada su sensibilidad, encuentra componentes del proteasoma sobrerrepresentados en el grupo CD38+ mientras que, en los CD38-, se encuentra la vía de señalización mediada por receptor T (compartiendo muchos componentes de la cascada intracelular con la señalización B), aunque estas vías no parecen marcar ninguna diferencia sustancial entre estos grupos.

### **2.5. COMPARACION ZAP70+ VS. ZAP70-**

A pesar de que la expresión de ZAP70 ha sido propuesta como subrogante del estudio mutacional del gen IgV<sub>H</sub>, la existencia de aproximadamente un 20% de muestras discordantes, hace que al realizar las comparaciones entre muestras ZAP70 positivas y negativas no sea posible encontrar genes con expresión diferencial cuando sí los hay a nivel de muestras IgV<sub>H</sub> mutado y no mutado. Por otra parte, ZAP70 ha sido propuesto como un marcador pronóstico independiente, y en este sentido cabe destacar que el estudio por bloque de genes revela que en el grupo ZAP70+ se encuentran activadas la regulación de la transducción de señales y reprimidas la respuesta de defensa celular mientras que, en las ZAP70-, encontramos sobrerrepresentados el reconocimiento celular o la apoptosis, y reprimidos el catabolismo, proteasoma y fosforilación oxidativa.

## **3. VALIDACION DE LOS DATOS DE PERFILES DE EXPRESION POR PCR A TIEMPO REAL.**

A pesar de que las plataformas de micromatrices de ADN generan una gran cantidad de información, dando una imagen de los niveles de expresión de todo el

genoma en un determinado momento y permitiendo de esta manera la evaluación simultánea de miles de genes en un único experimento, esta tecnología solo puede estimar las diferencias en niveles de expresión génica. La técnica de RTqPCR es mucho más sensible para detectar pequeños cambios en los niveles de expresión de un gen. Esta técnica también permite un análisis de expresión sin la desviación 3' observada comúnmente en las sondas usadas en la mayoría de las plataformas. Por lo tanto, después de seleccionar un grupo de 14 genes provenientes del análisis transcriptómico se validaron los mismos en 35 muestras de LLC-B.

La expresión relativa de los 14 genes estudiados por RTqPCR consiguió distinguir de manera satisfactoria entre muestras IgV<sub>H</sub> mutado y no mutado, entre los que merecen destacarse por su alta significación estadística, los genes CRY1, LPL y MGC9913 y BCL7A, todos ellos con valores mas elevados en el grupo de muestras con IgV<sub>H</sub> no mutado. Estos genes logran valores de sensibilidad y especificidad adecuados para usarlos como posibles marcadores subrogados del estudio mutacional de IgV<sub>H</sub> en LLC. De estos 4 genes, la determinación de la expresión de LPL ya ha sido propuesta como un posible marcador subrogante de las mutaciones de IgV<sub>H</sub> y como marcador pronóstico en LLC<sup>86,87,218</sup>. Cabe destacar que entre los genes con expresión elevada en el grupo de muestras con IgV<sub>H</sub> no mutado, también con buena significación estadística, se encuentra ZAP70, que en el estudio de micromatrices no se encontraba dentro de los genes sobreexpresados de manera característica de este grupo de muestras, y sin embargo, al realizar el estudio de validación por RTqPCR, demostró claramente tener una expresión mas elevada en las muestras con IgV<sub>H</sub> no mutado en concordancia con estudios previos<sup>31,43,161</sup>.



**VIII. RESULTADOS: CAPITULO III**  
**NUEVOS MARCADORES PRONOSTICO EN LA LLC-B.**

## 1. SELECCION DE MARCADORES POTENCIALES EN LLC-B: Validación en un Grupo Muestral Independiente

Debido a que el estudio de perfiles transcriptómicos de muestras de LLC-B demostró y validó la existencia de varios genes con expresión diferencial y alta significación estadística entre células mutadas y no mutadas en IgV<sub>H</sub>, el siguiente paso consistió en revalidar estos hallazgos en un grupo de muestras independientes. En este caso, se utilizaron 38 muestras de pacientes de LLC-B (IgV<sub>H</sub> mut=30 y no mut=8), todas pertenecientes a pacientes en estadio A de Binet.

RTqPCR utilizando la misma metodología previamente descrita se realizó sobre los ADNc de las muestras de linfocitos B seleccionados, y la cuantificación relativa se realizó nuevamente tomando el gen GUS como control endógeno y normalizando luego los valores mediante el uso de un calibrador, para minimizar las variaciones inter-ensayo. Los resultados obtenidos están resumidos en la Tabla 12.

Los genes que seguían manteniendo diferencias significativas según el estado mutacional de IgV<sub>H</sub> en este nuevo muestreo fueron: CRY1, LPL, DUSP22, BCL7A, ZAP70 y CD82, por lo que a través de la validación "biológica" de estos genes es posibles proponerlos como marcadores subrogados de las mutaciones del gen de las inmunoglobulinas.

**TABLA 12:** Correlación entre expresión relativa y estado mutacional de IgV<sub>H</sub> en muestras del grupo de validación.

Gen	IgV <sub>H</sub>		p (prueba de Mann Whitney)
	No mut (media + 2SEM)	Mut (media + 2SEM)	
CRY1	0.275 + 0.114	0.055 + 0.004	<0.001
LPL	228.4 + 59.6	20.11 + 13.72	<0.001
BCL7A	1.44 + 0.742	0.073 + 0.042	<0.001
ZAP70	0.661 + 0.418	0.071 + 0.052	<0.001
CD82	0.433 + 0.076	0.689 + 0.112	0.013
DUSP22	1.18 + 0.38	1.90 + 0.30	0.023

Se realizó RTqPCR usando tecnología TaqMan. Los resultados están expresados como concentración relativa, mediante método de cuantificación relativa con normalización, usando gen GUS como control

## 2. CORRELACION ENTRE MARCADORES DE PRONOSTICO Y ESTADO MUTACIONAL DEL GEN IgV<sub>H</sub>

Para evaluar su utilidad como marcadores subrogados del estado mutacional de IgV<sub>H</sub>, correlacionamos los valores de expresión de los genes seleccionados en el

estudio anterior con la presencia o no de mutaciones en IgV<sub>H</sub>, extendiendo ahora la serie a un total de 74 muestras de LLC-B (estadio A), en la cual se incluyen las 36 muestras iniciales utilizadas en el estudio transcriptómico y las 38 muestras adicionales correspondientes al grupo de validación.

Hemos escogido 6 genes como los de mejor valor predictivo para el estado mutacional de IgV<sub>H</sub> y también hemos evaluado si una combinación de estos parámetros podrían utilizarse en un cociente 1/1 (parámetro elevado en muestras mutadas/ parámetro elevado en muestras no mutadas) con el objeto de mejorar su funcionamiento individual. En la Tabla 13 se muestran los valores de las medias de expresión relativa de cada gen y también los cocientes de acuerdo al estado mutacional de IgV<sub>H</sub>, la significación estadística fue calculada usando la prueba no paramétrica de Mann Whitney. El modelo de predicción óptima basado en las expresiones de estos genes y sus relaciones, genera unas áreas bajo la curva ROC ("receiver operating characteristic") aceptables para todos ellos, y se encuentran detallados en la Tabla 14. Como marcadores únicos, los mejores predictores de las mutaciones en IgV<sub>H</sub> (p<0.0001) son CRY1, LPL con un área bajo la curva ROC de 0.963 en ambos casos, seguidos de ZAP70, con un área de 0.880.

**TABLA 13:** Correlación entre expresión relativa de genes seleccionados y sus cocientes y estado mutacional de IgV<sub>H</sub>

Gen	IgV <sub>H</sub>		p (prueba de Mann Whitney)
	No mut (media + 2SEM)	Mut (media + 2SEM)	
CRY1	0.311 + 0.081	0.034 + 0.023	<0.0001
LPL	269.6 + 59.4	33.9 + 20.4	<0.0001
BCL7A	0.727 + 0.398	0.068 + 0.030	<0.0001
ZAP70	0.511 + 0.283	0.104 + 0.040	<0.0001
CD82	0.389 + 0.068	0.836 + 0.176	<0.0001
DUSP22	0.861 + 0.285	1.689 + 0.280	<0.0001
DUSP22/CRY1	5.53 + 4.39	630.8 + 277.7	<0.0001
DUSP22/ZAP70	2.81 + 1.18	97.27 + 37.52	<0.0001
DUSP22/LPL	0.0051 + 0.0027	18.94 + 13.65	<0.0001
DUSP22/BCL7A	19.06 + 24.19	212.89 + 86.86	<0.0001
CD82/CRY1	1.96 + 0.75	240.1 + 103.5	<0.0001
CD82/ZAP70	1.48 + 0.49	38.09 + 17.88	<0.0001
CD82/LPL	0.0021 + 0.00078	7.972 + 5.963	<0.0001
CD82/BCL7A	4.05 + 3.38	135.26 + 76.02	<0.0001

Los resultados están expresados como valores de expresión relativa, mediante método de cuantificación relativa con normalización, usando gen GUS como control. En el caso de los cocientes, se realizó una relación 1/1 de los valores de expresión para cada parámetro.

Una vez analizada las curvas ROC, en esta serie con mayor número de casos, establecimos valores de corte óptimo, en base a las mediciones de especificidad y sensibilidad, y hemos analizado los porcentajes de concordancia con el estado mutacional de IgV<sub>H</sub>. Los resultados muestran nuevamente que CRY1 con el 92.8 %, LPL con 91.6 %, seguidos por ZAP70 con el 83.1% además de las relaciones DUSP22/BCL7A y CD82/BCL7A con el 87.3% y 84.5%, respectivamente, son los parámetros que mejores concordancias exhiben dando resultados similares a los de la primera cohorte (ver detalles en Tabla 15).

En la Figura 33 mostramos los valores de las medias de CRY1 (A) y LPL (B) agrupados de acuerdo al estado mutacional de IgV<sub>H</sub>, pudiéndose ver claramente las diferencias existentes entre ambos grupos, por lo que la expresión de ambos genes permitiría distinguir de manera categórica muestras mutadas y no mutadas en IgV<sub>H</sub>.

**TABLA 14:** Sensibilidad, especificidad, y área bajo la curva ROC para los genes seleccionados como marcadores subrogados del estado mutacional de IgV<sub>H</sub> en LLC-B.

Gen	Sensib%	Especif %	Valor de corte	Area ROC
<b>CRY1</b>	<b>95</b>	<b>92</b>	<0.090	<b>0.963</b>
<b>LPL</b>	<b>100</b>	<b>88</b>	<82.45	<b>0.963</b>
BCL7A	85	80	<0.1150	0.871
ZAP70	100	78	<0.1050	0.880
CD82	80	60	≥0.4050	0.777
DUSP22	74	70	≥1.020	0.765
CD82/CRY1	92	85	≥3.3494	0.957
CD82/LPL	92	85	≥0.00322	0.959
<b>CD82/BCL7A</b>	90	70	≥2.73701	<b>0.896</b>
<b>CD82/ZAP70</b>	86	70	≥1.800	<b>0.924</b>
DUSP22/CRY1	92	85	≥6.5655	0.941
DUSP22/LPL	92	90	≥0.0095896	0.953
<b>DUSP22/BCL7A</b>	92	75	≥5.1144	<b>0.902</b>
<b>DUSP22/ZAP70</b>	86	70	≥3.15776	<b>0.919</b>

Determinaciones realizadas por RTqPCR sobre linfocitos CD19 seleccionados. En negrita se encuentran señalados aquellos genes/ relaciones que mejores concordancia exhiben con respecto al estado mutacional de IgV<sub>H</sub>.

En relación a los pacientes discordantes, entre CRY1 e IgV<sub>H</sub> podemos decir que el único paciente que tenía valores bajos de CRY1, y era no mutado para IgV<sub>H</sub> (falso

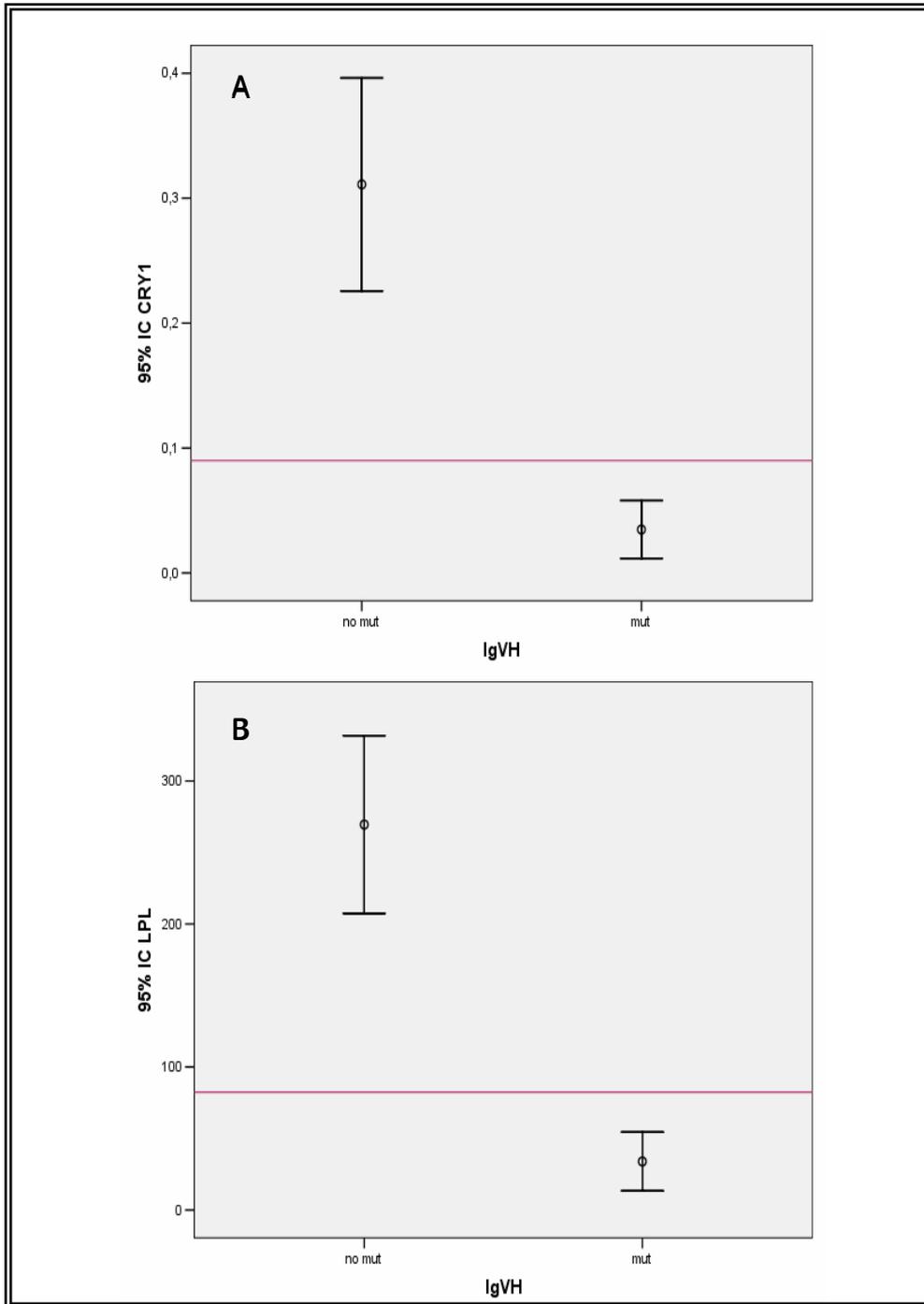
negativo), era ZAP70 negativo por citometría de flujo pero positivo por RTqPCR y no presentaba alteraciones citogenéticas. Por el contrario, de los 4 que tenían valores positivos para CRY1 pero eran mutados en IgV<sub>H</sub> (falsos positivos), 3 de ellos resultaron ZAP70 positivos por RTqPCR, mientras que solo 2 lo fueron por citometría de flujo.

**TABLA 15:** Correspondencia entre la expresión de posibles marcadores subrogados y el estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub>.

Gen	Valor de corte	No Mutado				Concordancia %	p (Chi cuadrado)
		No Mutado		Mutado			
		n	%	n	%		
CRY1	<b>≥0.090</b>	19	<b>27.1</b>	4	5.7	92.8	<0.0001
	<0.090	1	1.4	46	<b>65.7</b>		
LPL	<b>≥82.45</b>	20	<b>28.2</b>	6	8.5	91.6	<0.0001
	<82.45	0	0.0	45	<b>63.4</b>		
ZAP70	<b>≥0.105</b>	20	<b>28.2</b>	12	16.9	83.1	<0.0001
	<0.105	0	0.0	39	<b>54.9</b>		
BCL7A	<0.115	17	<b>23.9</b>	10	14.1	81.6	<0.0001
	<b>≥0.115</b>	3	4.2	41	<b>57.7</b>		
CD82/ZAP70	<1.80	14	<b>19.7</b>	7	9.9	81.7	<0.0001
	<b>≥ 1.80</b>	6	8.5	44	<b>62.0</b>		
CD82/BCL7A	< 2.737	14	<b>19.7</b>	5	7.0	84.5	<0.0001
	<b>≥2.737</b>	6	8.5	46	<b>64.8</b>		
DUSP22/ZAP70	<5.114	14	<b>19.7</b>	7	9.9	81.7	<0.0001
	<b>≥ 5.114</b>	6	8.5	44	<b>62.0</b>		
DUSP22/BCL7A	<3.157	15	<b>21.1</b>	4	5.6	87.3	<0.0001
	<b>≥3.157</b>	5	7.0	47	<b>66.2</b>		

Se analizaron 71 muestras (excepto en el caso de CRY1 donde solo se disponía de datos de 70), de las cuales 20 eran IgV<sub>H</sub> no mut y 51 mut. En negrita se señalan los resultados concordantes.

**FIGURA 33:** Correlación entre expresión de CRY1 y LPL con estado mutacional de IgV<sub>H</sub>



Las barras de error representan el 95% del intervalo de confianza. La línea roja muestra el valor de corte para cada parámetro

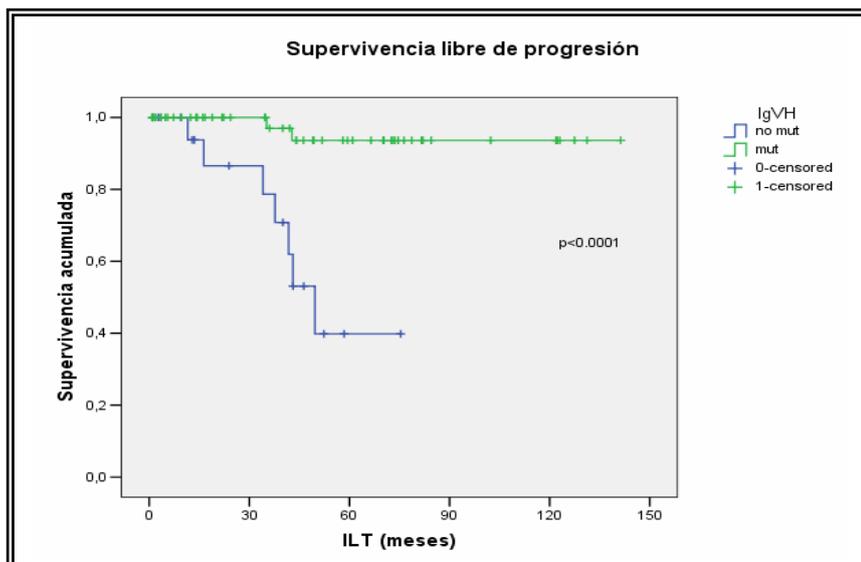
### 3. VALOR PRONOSTICO DE CRY1, LPL, BCL7A, ZAP70, CD82 y DUSP22

Para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los genes CRY1, LPL, ZAP70 y los ratios CD82/ZAP70, CD82/BCL7A, DUSP22/ZAP70 y DUSP22/BCL7A

(medidos por RTqPCR), usamos una cohorte de 74 pacientes (todos en estadio A de Binet). Para estudiar su utilidad comparamos los valores de expresión de ARNm con los resultados obtenidos para el perfil mutacional del gen IgV<sub>H</sub> y la expresión de ZAP70 medida por citometría de flujo, los cuales, hasta el momento son dos de los parámetros mas utilizados para evaluar pronóstico en LLC-B.

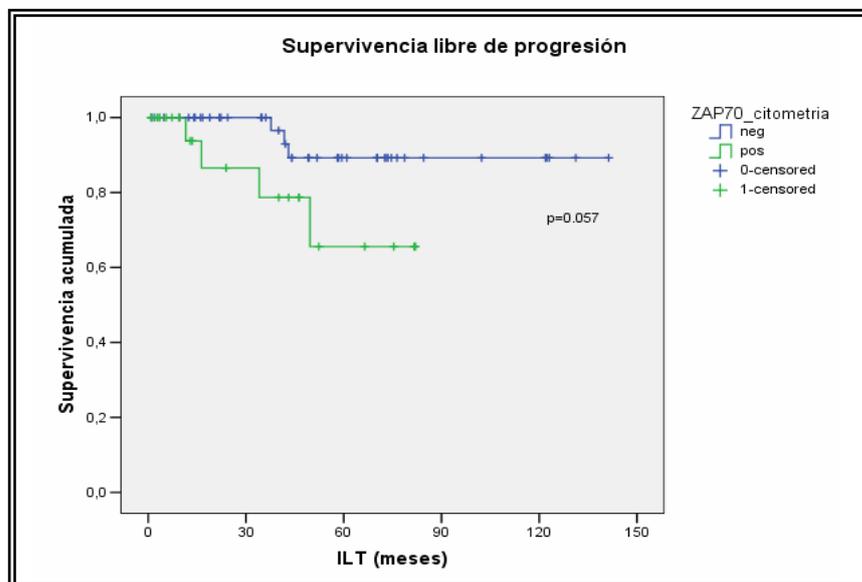
Varios estudios clínicos han demostrado que el estado mutacional de IgV<sub>H</sub> es un buen predictor del tiempo o intervalo libre de tratamiento (ILT) y supervivencia global<sup>5,78</sup>. Nosotros confirmamos estos hallazgos en nuestra cohorte de pacientes, existiendo una asociación significativa en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier entre ILT y el estado mutacional de IgV<sub>H</sub> ( $p < 0.0001$ ). En el grupo con IgV<sub>H</sub> no mut, la mediana de supervivencia fue de 49.7 meses (95% IC, 38.7-60.7), mientras que en el grupo con presencia de mutaciones, la mediana de supervivencia no se alcanzó debido a que hubieron muy pocos casos que requirieron tratamiento en dicho grupo (ver Figura 34). En el caso de la determinación de ZAP70 por citometría de flujo, las diferencias en ILT no fueron significativas ( $p = 0.057$ ) entre las curvas correspondientes a muestras ZAP70 positivas y negativas (ver Figura 35). En cambio cuando la determinación de ZAP70 se realizó por RTqPCR (ver Figura 36 A), se pudo demostrar una mejor correlación con ILT ( $p = 0.001$ ) que con la detección por citometría de flujo.

**FIGURA 34:** Curvas de Kaplan-Meier de intervalo libre de tratamiento de acuerdo a la presencia o no de mutaciones en el gen IgV<sub>H</sub>.



El valor de corte usado para evaluar el estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub> fue de 98% de homología con la línea germinal. La significación estadística de las diferencias entre curvas fue evaluada por la prueba Log-rank.

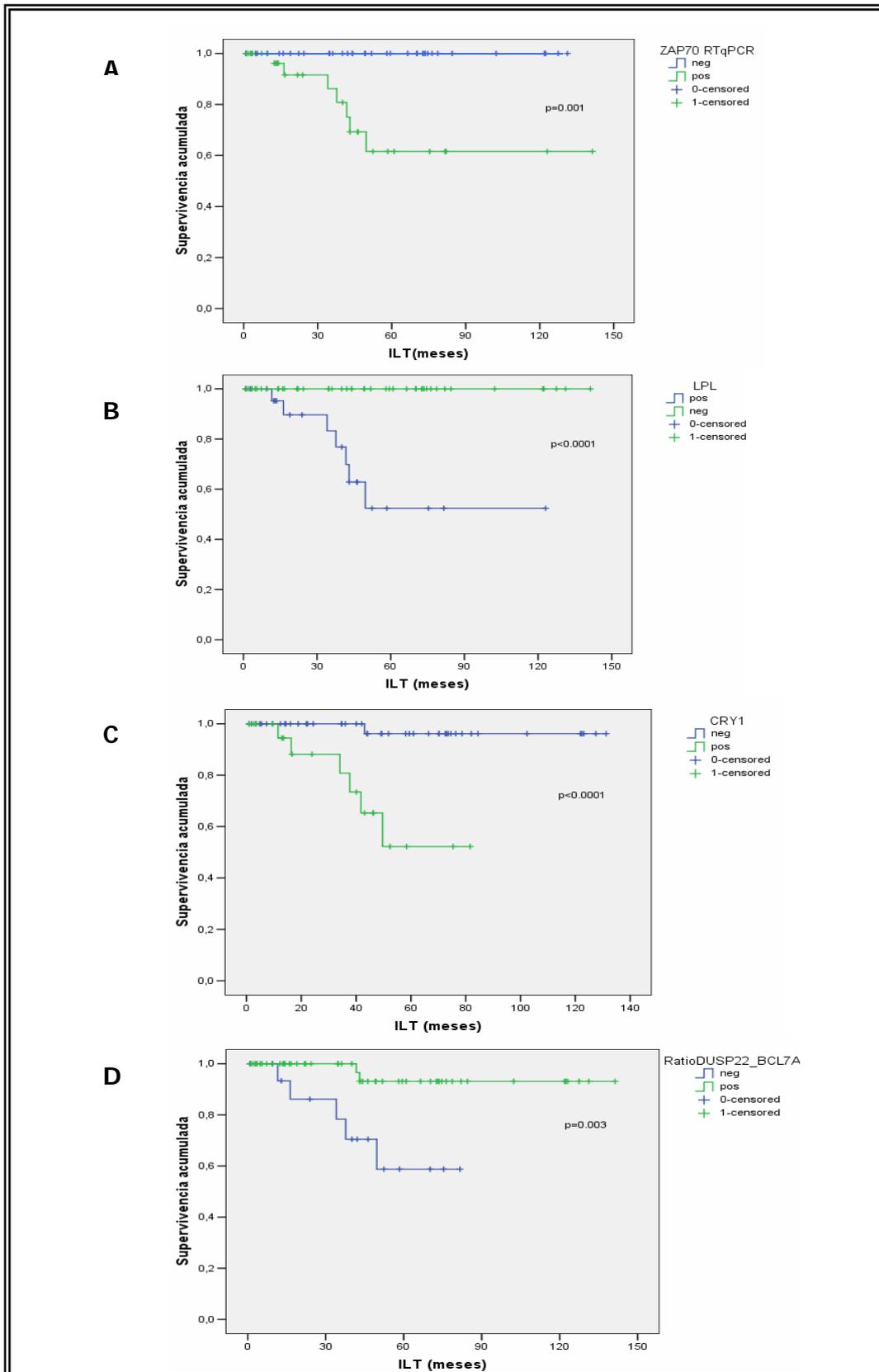
**FIGURA 35:** Curvas de Kaplan-Meier de intervalo libre de tratamiento de acuerdo a la expresión de ZAP70 (medido por citometría de flujo)



La determinación de ZAP70 se realizó por citometría de flujo sobre PBMC. La diferenciación entre valores positivos y negativos se realizó tomando el valor de corte estándar del 20%. La significación estadística de las diferencias entre curvas fue evaluada por la prueba Log-rank

De los 6 genes estudiados por RTqPCR (CRY1, ZAP70, LPL, BCL7A, CD82 y DUSP22), 4 de ellos mostraron asociación significativa con supervivencia. Como ya señaláramos anteriormente, ZAP70 fue uno de ellos. LPL, CRY1 y BCL7A también parecen ser fuertes predictores de ILT ( $p < 0.0001$  para LPL y CRY1 y  $p = 0.004$  para BCL7A). Los casos LPL positivos tienen una mediana de supervivencia mucho mas corta que los casos negativos ( $p < 0.0001$ ), y lo mismo ocurre con CRY1 ( $p < 0.0001$ ) (ver Figura 36 B y C). También el cociente DUSP22/BCL7A muestra diferencias significativas ( $p = 0.003$ ) entre los valores negativos (media estimada de supervivencia 61.3; 95% IC 47.0- 75.6) y positivos (media estimada de supervivencia 134.5; 95% IC 125.4-143.6), pudiendo considerarse un buen factor pronóstico en la cohorte aquí analizada (ver Figura 36 D). En el caso de las relaciones entre CD82/ZAP70 y CD82/BCL7A, en ambos casos las diferencias entre las curvas de ILT entre valores positivos y negativos fueron significativas ( $p = 0.009$  y  $p = 0.007$ , respectivamente).

**FIGURA 36:** Curvas de Kaplan-Meier de intervalo libre de tratamiento de acuerdo a la expresión de: **A)** ZAP70 (por RTqPCR), **B)** LPL, **C)** CRY1 y **D)** DUSP22/BCL7A



Las determinaciones de ZAP70, CRY1, LPL, DUSP22 y BCL7A se realizaron por RTqPCR sobre células CD19 seleccionadas. La diferenciación entre valores positivos y negativos se basó valores de corte determinados por análisis de curvas ROC. La significación estadística de las diferencias entre curvas fue evaluada por la prueba Log-rank

**3.1. CRY1: ¿NUEVO BIOMARCADOR EN LLC-B?** Correlación con la expresión de ZAP70 o LPL y estado mutacional de IgV<sub>H</sub>.

Dado el fuerte valor pronóstico encontrado para la expresión de CRY1 y la existencia de otros marcadores probados en LLC como son la expresión de ZAP70 o LPL y el estado mutacional de IgV<sub>H</sub>, hemos estudiado la correlación entre ellos, en aquellos casos en que todos estos parámetros han sido analizados. Los casos fueron divididos en positivos (+) o negativos (-) para un determinado marcador de acuerdo a los valores de corte seleccionados anteriormente. Los porcentajes de concordancia entre el estado mutacional de IgV<sub>H</sub> y la expresión de ZAP70 fueron de 82.8 y 83.1 %, para las determinaciones realizadas por FC y RTqPCR, respectivamente, por lo tanto un poco menores que el obtenido para la expresión de CRY1 (92.8%). Debido a que la determinación de ZAP70 por RTqPCR demostró mejores resultados que la FC, las correlaciones siguientes entre la expresión de ZAP70 y otros marcadores serán realizadas teniendo en cuenta solo los resultados de RTqPCR.

Todos los pacientes doble-positivos para ZAP70+ por RTqPCR y CRY1+ (n=22) fueron IgV<sub>H</sub> no mutados, a excepción de tres casos, de los cuales uno fue ZAP70- por FC y CD38 <20%, los otros dos fueron ZAP70+ y CD38>20% por FC. Por otra parte, se obtuvo una correlación perfecta en el caso de los pacientes doble-negativos (ZAP70- y CRY1-, n=38), siendo todos ellos IgV<sub>H</sub> mutados. Por lo tanto, resulta destacable la muy buena correlación existente entre estos tres marcadores (CRY1, ZAP70 e IgV<sub>H</sub>) hallada en este grupo de pacientes, aunque existen todavía perfiles discordantes en un 15.5% de los casos. Estos incluyen 10 pacientes ZAP70+ por RTqPCR/ CRY1- y uno ZAP70- y CRY1+. Entre los pacientes discordantes con ZAP70+/CRY1-, 9 de ellos eran IgV<sub>H</sub> mutados. Por otra parte, el único paciente discordante ZAP70-/ CRY1+ era IgV<sub>H</sub> mutado, aunque tenía elevada expresión de CD38. Es destacable que de los 11 pacientes ZAP70/ CRY1 discordantes, 9 hubieran sido correctamente clasificados en cuanto al estado mutacional de IgV<sub>H</sub> solo tomando en cuenta la expresión de CRY1, y solo en dos casos, la expresión de ZAP70 por RTqPCR hubiera sido útil para asignar de manera correcta el status del gen IgV<sub>H</sub> en esas muestras.

A continuación evaluamos la correlación entre CRY1 y LPL, uno de los nuevos marcadores de pronóstico propuestos para LLC y surgido también en este estudio. Igual que como lo hicimos anteriormente, los casos fueron clasificados como positivos (+) y negativos (-) de acuerdo a los valores de corte seleccionados mediante curvas ROC e índice de Youden. El porcentaje de resultados concordantes entre CRY1 y LPL

fue del 90%, con solo 7 muestras discordantes, por lo tanto, la asociación entre estas dos variables es fuerte ( $p < 0.0001$ , prueba de Chi cuadrado). Todas las muestras doble positivas, excepto una, correspondieron a casos con IgV<sub>H</sub> no mutado. Encontramos dos casos CRY1+/ LPL- y, en ambos casos, las muestras eran IgV<sub>H</sub> mutado, por lo que LPL fue la variable capaz de asignar de manera correcta el estado mutacional de IgV<sub>H</sub>. En cambio, en los otros 5 casos discordantes (CRY1-/ LPL+), 4 de ellos eran IgV<sub>H</sub> mutado, por lo que CRY1 en estos casos es un mejor marcador subrogado que LPL en este grupo de muestras.

CRY1 en muestras de LLC-B sin seleccionar: Hemos analizado también la expresión de CRY1 en 18 muestras sin seleccionar células B). En estos casos, para los ensayos de RTqPCR se usó ARNm de PBMC, siguiendo luego el mismo procedimiento descrito para células B seleccionadas. Nuevamente, la concentración relativa de CRY1 era capaz de discriminar entre muestras IgV<sub>H</sub> no mutadas y mutadas ( $p = 0.007$ , prueba de Mann Whitney). El valor promedio para cada grupo fue de 0.380 y 0.051, para los grupos no mutados y mutados, respectivamente. Por lo tanto, en nuestra cohorte parece que es posible usar tanto muestras sin seleccionar como seleccionadas para cuantificar la expresión de CRY1 por RTqPCR, obteniéndose en ambos casos resultados comparables.



**IX. DISCUSION: CAPITULO III**  
**NUEVOS MARCADORES DE PRONOSTICO EN LA LLC-B.**

## 1. SELECCION DE MARCADORES POTENCIALES EN LLC-B. VALOR PRONOSTICO DE CRY1, LPL, BCL7A, ZAP70, CD82 y DUSP22

Con la única excepción de casos aislados en los cuales existe diversificación intraclonal, el estado mutacional del gen  $IgV_H$  es un parámetro fijo en la LLC-B y por lo tanto, hasta el momento es un marcador pronóstico útil en los estadios tempranos de la enfermedad, en contraste con lo que ocurre con las anomalías citogenéticas o la expresión de CD38 las cuales pueden cambiar con el tiempo y evolución de la enfermedad. Sin embargo, la implementación de la determinación de las mutaciones en el gen  $IgV_H$  no es una práctica de rutina en la mayoría de los laboratorios, debido a que consume mucho tiempo y es laboriosa, por lo que la búsqueda de nuevos marcadores aún sigue vigente. Uno de los marcadores de pronóstico que se usa de manera subrogada al estudio mutacional en  $IgV_H$  es la cuantificación de la proteína ZAP70, medida por citometría de flujo, pero en este caso, existen alrededor de un 20-30% de discordancias<sup>219</sup> dependiendo de los anticuerpos usados<sup>220,221</sup>, de la forma de analizar los resultados o de los valores de corte utilizados, por lo que su utilidad es cuestionada en algunas ocasiones<sup>117,161,222</sup>, y defendida en otras<sup>43,60,61</sup>. Por lo tanto, dado que el estado mutacional es un buen predictor de supervivencia, aquellos genes diferencialmente expresados entre casos mutados y no mutados de LLC deberían ser pronósticamente significativos.

Habiendo analizado el perfil de expresión de un cierto número de genes en 74 muestras de LLC-B en linfocitos CD19 purificados, hemos encontrado varios de ellos con una alta correlación entre los niveles de expresión y el estado mutacional de  $IgV_H$ .

En el caso de ZAP70 (medido por RTqPCR), existe muy buena correlación con el estado mutacional del gen  $IgV_H$  (83.1%), aunque esta correlación es un poco menor cuando la técnica utilizada para determinar expresión de ZAP70 es la citometría de flujo (82.9%). Asimismo, ZAP70 cuantificado mediante RTqPCR es capaz de identificar un subgrupo de pacientes con menor supervivencia libre de tratamiento, en concordancia con los hallazgos de otros autores<sup>64,161,223</sup>. La determinación de ZAP70 por RTqPCR tiene muy bajos niveles de variación en las mediciones, y por lo tanto podría convertirse en la metodología ideal para discriminar de manera precisa subtipos moleculares de LLC, de acuerdo a la expresión del gen ZAP70<sup>43</sup>. En un estudio, realizado por Crespo *et al* se ha demostrado también una fuerte correlación entre la expresión proteica de ZAP70 y el estado mutacional del gen  $IgV_H$ , pero los efectos de la positividad de ZAP70 sobre la supervivencia solo alcanzó significación estadística cuando el estudio se restringió a los casos en estadio A de la enfermedad<sup>60</sup>, aunque en

nuestra cohorte, estas diferencias no llegaron a ser significativas cuando ZAP70 fue determinado por citometría de flujo ( $p=0.057$ ).

LPL es otro de los nuevos marcadores de pronóstico propuesto en LLC-B. El fuerte valor pronóstico de la expresión de LPL hallado en nuestro estudio, coincide con los resultados de otros autores<sup>87,195,196,218</sup>. Heintel *y col* también encuentran asociación entre el estado mutacional de IgV<sub>H</sub> y la producción de proteína LPL. Sin embargo, la magnitud de la diferencia en la medición de ARNm de LPL entre los dos grupos de pacientes (mutados y no mutados) conseguida por RTqPCR fue mucho mayor que la diferencia a nivel de intensidades de tinción intracelular de LPL<sup>196</sup>. Tanto la función de LPL, como los mecanismos de regulación de su síntesis en LLC-B, son aún desconocidos. Una posible explicación, podría basarse en que las células de LLC-B expresan heparán sulfato, este compuesto es capaz de estabilizar la expresión de LPL a nivel de membrana celular, por lo tanto, podría pensarse que una LPL asociada a membrana podría afectar el comportamiento biológico de las células de LLC tales como migración, diseminación y señalización intracelular<sup>218</sup>, aunque la función de este gen en conexión con la diferenciación de la célula B o la respuesta antigénica, no se conoce bien hasta este momento<sup>224</sup>.

Nuestros resultados y resultados previos de otros laboratorios sugieren que la determinación de la expresión del gen CRY1 podría utilizarse como marcador subrogado del estado mutacional de IgV<sub>H</sub><sup>188,189</sup>. En nuestra cohorte, la expresión de este gen ha demostrado tener una excelente concordancia con las mutaciones de las inmunoglobulinas. Con respecto a su uso como marcador de progresión en la LLC en estadios tempranos también ha demostrado un funcionamiento óptimo.

BCL7A también parece ser un buen marcador subrogado de las mutaciones en el gen de las inmunoglobulinas, aunque en este caso existen alrededor de un 18% de casos discordantes. Como marcador pronóstico también exhibe una buena correlación con la necesidad de tratamiento en pacientes en estadio A de Binet con lo que se puede postular como un posible marcador en etapas tempranas de la enfermedad.

En una publicación reciente se proponen una serie de modelos para clasificar muestras de LLC-B en mutadas o no mutadas en base a la expresión de ciertos genes (entre los que se incluyen a LPL y CRY1 como algunos de los biomarcadores de mayor poder discriminatorio), utilizando una combinación de entre 3 a 7 genes en los modelos de mejor funcionamiento y logrando clasificar 20 casos de LLC-B con una precisión del 95%<sup>188</sup>.

El uso de cocientes entre genes con expresión alta en pacientes con IgV<sub>H</sub> mutado y genes con expresión alta en el grupo con IgV<sub>H</sub> no mutado ha sido propuesto y validado por Oppezzo *y col* (usando la relación LPL/ADAM29)<sup>87</sup>. En el presente estudio, las relaciones entre DUSP22/BCL7A y CD82/BCL7A obtienen unos buenos porcentajes de concordancia con el estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub>, mejorando el funcionamiento de cada parámetro por separado. Además, analizando el área bajo la curva ROC, se obtienen en ambos casos valores de sensibilidad y especificidad adecuados. En el caso de DUSP22/BCL7A exhibe una diferencia significativa en cuanto a necesidad de tratamiento cuando las muestras se clasifican como negativas o positivas tomando un valor de corte adecuado.

En conclusión, en esta parte del trabajo hemos demostrado que tanto LPL, ZAP70, CRY1, BCL7A y las relaciones DUSP22/BCL7A o CD82/BCL7A, determinados a nivel de expresión de ARNm en linfocitos CD19 seleccionados, correlacionan con el estado mutacional de IgV<sub>H</sub> y también con el ILT en pacientes con LLC-B en estadio A de Binet. Por otra parte, la técnica de RTqPCR no es laboriosa, su implementación en la práctica diaria de un laboratorio de diagnóstico no debería acarrear ningún problema y ha probado ser más sensible y específica que la determinación más utilizada actualmente en la práctica clínica para asignar pronóstico que es la medición de ZAP70 por citometría de flujo.

## **2. CRY1: ¿NUEVO BIOMARCADOR EN LLC-B? Correlación con la expresión de ZAP70 o LPL y estado mutacional de IgV<sub>H</sub>.**

En este punto, debemos resaltar los buenos resultados obtenidos con CRY1, cuya expresión es mayor en muestras de LLC no mutadas que en mutadas, aunque las causas de esta expresión diferencial son aún desconocidas. Con relación al estado mutacional de IgV<sub>H</sub> como método de comparación, la expresión de CRY1 muestra un 92.8% de resultados concordantes. Además, las curvas de ILT permiten predecir la necesidad de tratamiento basándonos en los valores de CRY1 en pacientes en estadio A de Binet, lo que lo convierte en un excelente candidato para ser incorporado en el listado de nuevos biomarcadores en LLC-B (Jantus Lewintre E, Reinoso Martín C, García Ballesteros C, Montaner D, Farrás Rivera R, Mayans Ferrer JR, García-Conde J. "Cryptochrome 1 expression: a new prognostic marker in B-cell chronic lymphocytic leukaemia". *Manuscito enviado para publicación, marzo 2008.*)

Dada la buena sensibilidad y especificidad de CRY1 como posible marcador de diagnóstico/ pronóstico en estadíos tempranos de LLC-B, efectuamos una valoración de su expresión en nuestro grupo muestral comparándolo con la expresión de ZAP70 o LPL y el estudio mutacional del gen  $IgV_H$ .

En todos los casos hubo una muy buena correlación entre la expresión de CRY1 y ZAP70, aunque CRY1 demostró un funcionamiento mejor que el del ZAP70 (que hasta el momento es el marcador subrogado de las  $IgV_H$  más usado) para la asignación de la presencia o no de mutaciones en  $IgV_H$ .

Comparado con la determinación de la expresión de LPL, uno de los últimos marcadores pronóstico propuestos para LLC-B<sup>87,195,218</sup>, CRY1 tiene un comportamiento similar y una excelente correlación con éste. Asimismo, el funcionamiento de LPL y CRY1 como marcadores subrogados del estudio del gen de las inmunoglobulinas es similar, obteniéndose incluso un número un poco menor de resultados discordantes en el caso de CRY1. Si a estos resultados aquí expuestos añadimos el hecho de que el método de cuantificación usado para la determinación de CRY1 es simple y puede ser fácilmente introducido en la práctica clínica, pudiéndose determinar incluso en células mononucleares de sangre periférica sin ningún tipo de selección posterior, podemos sugerir la incorporación de la determinación de CRY1 dentro de los nuevos marcadores de pronóstico en la LLC-B.



## **X. CONCLUSIONES**

## **1. ESTUDIOS FUNCIONALES**

- 1.1. El análisis del estado mutacional del gen IgV<sub>H</sub> en LLC-B confirma que existe una distribución desequilibrada de ciertas familias de genes V<sub>H</sub> usadas por los clones leucémicos.
- 1.2. El protocolo BIOMED-2 modificado es más sencillo para la determinación del estado mutacional de IgV<sub>H</sub> y permite una implementación más fácil de esta determinación en la práctica clínica.
- 1.3. El estudio de las mutaciones en la región 5' no codificante del gen BCL-6, revela la existencia de alrededor de un 30% de muestras con mutaciones, representadas por simples sustituciones de nucleótidos, con mayor frecuencia en dos zonas previamente descritas en otros síndromes linfoproliferativos.
- 1.4. No existe correlación entre el número de mutaciones o la presencia de determinados polimorfismos y la expresión del gen BCL-6.
- 1.5. En estudios funcionales Btz demostró tener actividad apoptótica en células de LLC-B actuando en parte a través de la inhibición de la señalización mediada por NFκB, y utilizando caspasas activadas como efectores finales del proceso apoptótico.
- 1.6. A nivel funcional, las células de LLC-B muestran comportamientos diferenciales de acuerdo al estado mutacional de los genes de IgV<sub>H</sub> y BCL-6. Así, la eficacia pro-apoptótica del Btz es mayor en el grupo IgV<sub>H</sub> mutado/ BCL-6 no mutado.
- 1.7. El microentorno celular ejerce un efecto protector contra la apoptosis espontánea e inducida por fármacos en LLC-B.

## **2. LLC-B: FIRMA MOLECULAR**

- 2.1. El uso de micromatrices de ADN de alta densidad revela que la LLC-B, en estadio A de Binet, tiene una firma molecular propia.
- 2.2. El estado mutacional de IgV<sub>H</sub> define grupos con perfiles de expresión diferentes.
- 2.3. El perfil transcriptómico de subgrupos moleculares de LLC de acuerdo a las mutaciones de IgV<sub>H</sub> evidencia la existencia de un centenar de genes diferencialmente expresados, entre los que resultan interesantes destacar: DUSP22, CD82, BCL11A, CRY1, BCL7A y LPL.

- 2.4. FatiScan es una herramienta sensible para evaluar grupo de genes que se expresan de manera coordinada y permite definir vías diferenciales entre los grupos moleculares estudiados.
- 2.5. El grupo con IgV<sub>H</sub> no mutado parece tener más exacerbadas las señales de supervivencia y proliferación provenientes del entorno celular y de la matriz extracelular e inhibida la apoptosis.
- 2.6. La presencia o no de mutaciones en BCL-6 así como la expresión de CD38 y ZAP70 no definen perfiles con expresión diferencial a nivel de genes, pero sí se encuentran algunas vías metabólicas más representados en alguno de los grupos.

### **3. MARCADORES DE PRONOSTICO EN LA LLC-B.**

- 3.1. Un grupo de 6 genes (CRY1, LPL, BCL7A, CD82, DUSP22 y ZAP70) se validaron biológicamente en un grupo muestral independiente de LLCs en estadíos tempranos y discriminando entre muestras con diferente estado mutacional de IgV<sub>H</sub>.
- 3.2. LPL, ZAP70, CRY1, BCL7A y las relaciones DUSP22/BCL7A o CD82/BCL7A, determinados a nivel de expresión de ARNm en linfocitos CD19 seleccionados podrían utilizarse como marcadores subrogados del estado mutacional de IgV<sub>H</sub>.
- 3.3. CRY1 y LPL se comportan como buenos marcadores pronóstico en estadíos tempranos de LLC-B, siendo CRY1 mejor marcador en el grupo de pacientes estudiados.



## **XI. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**

1. Jantus Lewintre E., Sarsotti E., Terol MJ, Benet I., Garcia Conde J., **"Bortezomib induces different apoptotic rates in B-CLL cells according to IgVH and BCL-6 mutations"**. Clin Transl Oncol, 2006; 8 (11): 805-11.
2. Jantus Lewintre Eloisa, Reinoso Martín Cristina, Montaner David, Marín Miguel, Terol María José, Farrás Rivera Rosa, Benet Isabel, Calvete Juan J., Dopazo Joaquín, García-Conde Javier. **"Analysis of B-CLL transcriptomic profile: differences between molecular subgroups"**. Enviado para publicación, febrero 2008.
3. Reinoso Martín C\*, Jantus Lewintre E\*, García Ballesteros C, Benet Campos C, Mayans Ferrer JR, García Conde J. (\*primeros co-autores). **"ZAP-70 mRNA expression provides clinically valuable information in early-stage B-cell chronic lymphocytic leukaemia"**. Enviado para publicación, febrero 2008.
4. Jantus Lewintre E, Reinoso Martín C, García Ballesteros C, Montaner D, Farrás Rivera R, Mayans Ferrer JR, García-Conde J. **"Cryptochrome 1 expression: a new prognostic marker in B-cell chronic lymphocytic leukaemia"**. Enviado para publicación, marzo de 2008.

## **XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.**

1. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:841-894.
2. Mandelli F, De Rossi G, Mancini P, et al. Prognosis in chronic lymphocytic leukemia: a retrospective multicentric study from the GIMEMA group. *J Clin Oncol.* 1987;5:398-406.
3. Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. *Ann Intern Med.* 1989;110:236-238.
4. Granziero L, Ghia P, Circosta P, et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2001;97:2777-2783.
5. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. No mutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94:1848-1854.
6. Oppezzo P, Dighiero G. What do somatic hypermutation and class switch recombination teach us about chronic lymphocytic leukaemia pathogenesis? *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;294:71-89.
7. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature.* 1996;381:751-758.
8. Cheson BD, Bennett JM, Rai KR, 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.
9. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 1996;87:4990-4997.
10. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975;46:219-234.
11. Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer.* 1977;40:855-864.
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol.* 1989;42:567-584.
13. Pileri SA, Sabattini E, Agostinelli C, et al. Histopathology of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004;18:807-826, viii.
14. Mauro FR, De Rossi G, Burgio VL, et al. Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. *Haematologica.* 1994;79:334-341.
15. Dreger P, Montserrat E. Autologous and allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2002;16:985-992.
16. Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood.* 1999;94:448-454.
17. Cartwright RA, Gurney KA, Moorman AV. Sex ratios and the risks of haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2002;118:1071-1077.
18. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1999;94:1840-1847.
19. Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol.* 2004;22:3937-3949.

20. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol.* 1986;62:567-575.
21. Chiorazzi N. Cell proliferation and death: Forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20:399-413.
22. Ghia P, ten Boekel E, Sanz E, de la Hera A, Rolink A, Melchers F. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp Med.* 1996;184:2217-2229.
23. Hoffmann R. Gene expression patterns in human and mouse B cell development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;294:19-29.
24. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;352:804-815.
25. Dono M, Zupo S, Massara R, et al. In vitro stimulation of human tonsillar subepithelial B cells: requirement for interaction with activated T cells. *Eur J Immunol.* 2001;31:752-756.
26. Weller S, Faili A, Garcia C, et al. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1166-1170.
27. Ferrarini M, Chiorazzi N. Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol.* 2004;41:207-223.
28. Schroeder HW, Jr., Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today.* 1994;15:288-294.
29. Ghiotto F, Fais F, Valetto A, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest.* 2004;113:1008-1016.
30. Klein U, Dalla-Favera R. New insights into the phenotype and cell derivation of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;294:31-49.
31. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 2001;194:1639-1647.
32. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med.* 2001;194:1625-1638.
33. Capello D, Fais F, Vivenza D, 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.
34. Pasqualucci L, Neri A, Baldini L, Dalla-Favera R, Migliazza A. BCL-6 mutations are associated with immunoglobulin variable heavy chain mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 2000;60:5644-5648.
35. Aisenberg AC, Bloch KJ, Long JC. Cell-surface immunoglobulins in chronic lymphocytic leukemia and allied disorders. *Am J Med.* 1973;55:184-191.
36. Montserrat E. Leucemia linfática crónica: clínica, pronóstico y terapia. Vol. 2: López Borrasca; 1992.
37. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.* 1994;8:1640-1645.
38. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol.* 1997;108:378-382.
39. Cabezudo E, Carrara P, Morilla R, Matutes E. Quantitative analysis of CD79b, CD5 and CD19 in mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica.* 1999;84:413-418.

40. Lucio PJ, Faria MT, Pinto AM, et al. Expression of adhesion molecules in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica*. 1998;83:104-111.
41. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, 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.
42. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004;103:4389-4395.
43. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with No mutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003;101:4944-4951.
44. Gowda A, Byrd JC. Use of prognostic factors in risk stratification at diagnosis and time of treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2006;13:266-272.
45. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, 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.
46. Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, et al. Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2003;21:3928-3932.
47. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and No mutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998;102:1515-1525.
48. Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*. 2003;101:4952-4957.
49. Thorselius M, Krober A, Murray F, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*. 2006;107:2889-2894.
50. Falt S, Merup M, Tobin G, et al. Distinctive gene expression pattern in VH3-21 utilizing B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106:681-689.
51. Fukuda T, Yoshida T, Okada S, et al. Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med*. 1997;186:439-448.
52. Dalla-Favera R, Migliazza A, Chang CC, et al. Molecular pathogenesis of B cell malignancy: the role of BCL-6. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;246:257-263; discussion 263-255.
53. Baron BW, Anastasi J, Montag A, et al. The human BCL6 transgene promotes the development of lymphomas in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:14198-14203.
54. Kikuchi M, Miki T, Kumagai T, et al. Identification of negative regulatory regions within the first exon and intron of the BCL6 gene. *Oncogene*. 2000;19:4941-4945.
55. Sarsotti E, Marugan I, Benet I, et al. Bcl-6 mutation status provides clinically valuable information in early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2004;18:743-746.
56. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, et al. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;107:859-861.
57. Damle RN, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. CD38 Expression Identifies an Active Subset of Proliferating Cells within the Clonal Population in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients (In Vitro Analysis). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2006;108:28-.

58. Calissano C, Damle R, Banapour T, et al. In Vivo Labeling of Newly Synthesized DNA Suggests That the CD38+ Fraction Is Enriched in Proliferating Cells within a Clone of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2006;108:27-.
59. Damle RN, Banapour T, Temburni S, et al. Remarkable Differences in Cellular Activation State and Migratory and Proliferative Potential among Clonal Cells Derived from Different Tissues of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2006;108:2817-.
60. Crespo M, Bosch F, Villamor N, 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.
61. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351:893-901.
62. Hamblin TJ. Predicting Progression--ZAP-70 in CLL. *N Engl J Med*. 2004;351:856-857.
63. Meade J, Tybulewicz VL, Turner M. The tyrosine kinase Syk is required for light chain isotype exclusion but dispensable for the negative selection of B cells. *Eur J Immunol*. 2004;34:1102-1110.
64. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2004;363:105-111.
65. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:4609-4614.
66. Rosati S, Kluin PM. Chronic lymphocytic leukaemia: a review of the immun-architecture. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;294:91-107.
67. Del Principe MI, Del Poeta G, Buccisano F, et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006;108:853-861.
68. Zupo S, Cutrona G, Mangiola M, Ferrarini M. Role of surface IgM and IgD on survival of the cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99:2277-2278.
69. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910-1916.
70. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15524-15529.
71. Croce CM. MicroRNAs in leukemogenesis. *Leuk Lymphoma*. 2007;48 S7.
72. Kalla C, Nentwich H, Schlotter M, et al. Translocation t(X;11)(q13;q23) in B-cell chronic lymphocytic leukemia disrupts two novel genes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;42:128-143.
73. Callet-Bauchu E, Salles G, Gazzo S, et al. Translocations involving the short arm of chromosome 17 in chronic B-lymphoid disorders: frequent occurrence of dicentric rearrangements and possible association with adverse outcome. *Leukemia*. 1999;13:460-468.
74. Dohner H, Stilgenbauer S, Fischer K, Bentz M, Lichter P. Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of B cell chronic lymphocytic leukemia: specific chromosome aberrations identify prognostic subgroups of patients and point to loci of candidate genes. *Leukemia*. 1997;11 Suppl 2:S19-24.
75. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res*. 1991;256:271-282.
76. Damle RN, Batiwalla FM, Ghiotto F, 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.

77. Ishibe N, Prieto D, Hosack DA, et al. Telomere length and heavy-chain mutation status in familial chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2002;26:791-794.
78. Krober A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;100:1410-1416.
79. Mhes L, Simon A, Rejto L, et al. [Prognostic value of CD38 cell surface marker in chronic lymphocytic leukemia]. *Orv Hetil.* 2003;144:1531-1535.
80. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Dohner H. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia.* 2002;16:993-1007.
81. Buhl AM, Jurlander J, Jorgensen FS, et al. Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2006;107:2904-2911.
82. Molica S, Vitelli G, Mirabelli R, et al. Serum levels of syndecan-1 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with the extent of angiogenesis and disease-progression risk in early disease. *Leuk Lymphoma.* 2006;47:1034-1040.
83. Wolowiec D, Dybko J, Wrobel T, et al. Circulating sCD138 and some angiogenesis-involved cytokines help to anticipate the disease progression of early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm.* 2006;2006:42394.
84. Grzegorz S NY, Lee ND, Bone WG, Morice DB, Jelinek DF, Tschumper R, Tait D, Shanafelt CS, Zent C, Rassenti L, Kipps TJ, Kay NE. Proteomic Analysis of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Identifies Vimentin as a Novel Prognostic Factor for Aggressive Disease. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts).* 2005;106:707.
85. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2005;105:4820-4827.
86. Nuckel H, Huttmann A, Klein-Hitpass L, et al. Lipoprotein lipase expression is a novel prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2006;47:1053-1061.
87. Oppezzo P, Vasconcelos Y, Settegrana C, et al. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2005;106:650-657.
88. Graves JD, Draves KE, Craxton A, Krebs EG, Clark EA. A comparison of signaling requirements for apoptosis of human B lymphocytes induced by the B cell receptor and CD95/Fas. *J Immunol.* 1998;161:168-174.
89. Jiang A, Craxton A, Kurosaki T, Clark EA. Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Exp Med.* 1998;188:1297-1306.
90. Richards JD, Dave SH, Chou CH, Mamchak AA, DeFranco AL. Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway blocks a subset of B cell responses to antigen. *J Immunol.* 2001;166:3855-3864.
91. Jun JE, Goodnow CC. Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. *Nat Immunol.* 2003;4:1057-1064.
92. Hivroz C, Geny B, Brouet JC, Grillot-Courvalin C. Altered signal transduction secondary to surface IgM cross-linking on B-chronic lymphocytic leukemia cells. Differential activation of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Immunol.* 1990;144:2351-2358.
93. Michel F, Merle-Beral H, Legac E, Michel A, Debre P, Bismuth G. Defective calcium response in B-chronic lymphocytic leukemia cells. Alteration of early protein tyrosine phosphorylation and of the mechanism responsible for cell calcium influx. *J Immunol.* 1993;150:3624-3633.

94. Lankester AC, van Schijndel GM, van der Schoot CE, van Oers MH, van Noesel CJ, van Lier RA. Antigen receptor nonresponsiveness in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 1995;86:1090-1097.
95. Ghia P, Circosta P, Scielzo C, et al. Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;294:135-145.
96. Kienle D, Benner A, Krober A, et al. Distinct gene expression patterns in chronic lymphocytic leukemia defined by usage of specific VH genes. *Blood*. 2006;107:2090-2093.
97. Ghia P, Scielzo C, Frenquelli M, Bertilaccio S, Muzio M, Caligaris-Cappio F. Immunoglobulin receptors in CLL: a bridge between microenvironment and intracellular activation. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:S6.
98. 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.
99. Lagneaux L, Delforge A, De Bruyn C, Bernier M, Bron D. Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 1999;35:445-453.
100. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms. *Adv Cancer Res*. 2000;79:157-173.
101. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*. 1996;92:97-103.
102. 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.
103. 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.
104. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, et al. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2003;102:2146-2155.
105. Paraguassu-Braga FH, Borojevic R, Bouzas LF, Barcinski MA, Bonomo A. Bone marrow stroma inhibits proliferation and apoptosis in leukemic cells through gap junction-mediated cell communication. *Cell Death Differ*. 2003;10:1101-1108.
106. Sacedon R, Diez B, Nunez V, et al. Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis. *J Immunol*. 2005;174:1456-1461.
107. Ghia P, Strola G, Granziero L, 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.
108. Wang D, Freeman GJ, Levine H, Ritz J, Robertson MJ. Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies. *Br J Haematol*. 1997;97:409-417.
109. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;123:380-388.
110. Chen H, Treweeke AT, West DC, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2000;96:3181-3187.
111. 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.
112. Pedersen IM, Kitada S, Leoni LM, 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.

113. Kuppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 2001;20:5580-5594.
114. Dohner H, Stilgenbauer S, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med*. 1999;77:266-281.
115. Widhopf GF, 2nd, 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.
116. Wierda WG. Current and Investigational Therapies for Patients with CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:285-294.
117. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:163-183.
118. Clavio M, Miglino M, Spriano M, et al. First line Fludarabine treatment of symptomatic chronic lymphoproliferative diseases: clinical results and molecular analysis of minimal residual disease. *Eur J Haematol*. 1998;61:197-203.
119. Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*. 1998;92:1165-1171.
120. Leporrier M, Chevret S, Cazin B, et al. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood*. 2001;98:2319-2325.
121. Johnson S, Smith AG, Loffler H, et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet*. 1996;347:1432-1438.
122. Flinn IW, Goodman SN, Post L, et al. A dose-finding study of liposomal daunorubicin with CVP (COP-X) in advanced NHL. *Ann Oncol*. 2000;11:691-695.
123. Hallek M, Schmitt B, Wilhelm M, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide is an efficient treatment for advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL): results of a phase II study of the German CLL Study Group. *Br J Haematol*. 2001;114:342-348.
124. O'Brien SM, Kantarjian HM, Cortes J, et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2001;19:1414-1420.
125. Del Giudice I, Morilla A, Osuji N, et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2005;104:2124-2132.
126. Flinn IW, Grever MR, et al. Fludarabine and Cyclophosphamide produces a higher complete response rate and more durable remissions than fludarabine in patients with previously untreated CLL: Intergroup Trial E2997 ASH Annual Meeting Abstracts. 2004;104:475.
127. Duechler M, Linke A, Cebula B, et al. In vitro cytotoxic effect of proteasome inhibitor bortezomib in combination with purine nucleoside analogues on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Eur J Haematol*. 2005;74:407-417.
128. Wierda WG, Cantwell MJ, Woods SJ, Rassenti LZ, Prussak CE, Kipps TJ. CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2000;96:2917-2924.
129. O'Brien SM, Kantarjian HM, Thomas DA, et al. Alemtuzumab as treatment for residual disease after chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2003;98:2657-2663.
130. Galimberti S, Cervetti G, Cecconi N, et al. Quantitative molecular evaluation of minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia: efficacy of in vivo purging by alemtuzumab (Campath-1H). *J Immunother*. 2004;27:389-393.

131. Moreton P, Kennedy B, Lucas G, et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol*. 2005;23:2971-2979.
132. Byrd J LT, Dalton J, et al. Pharmacologically derived schedule of flavopiridol has significant efficacy in refractory, genetically high risk chronic lymphocytic leukemia (CLL). *J Clin Oncol*. 2006;24:Abstract 6516.
133. Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2003;9:6316-6325.
134. Almond JB, Snowden RT, Hunter A, Dinsdale D, Cain K, Cohen GM. Proteasome inhibitor-induced apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells involves cytochrome c release and caspase activation, accompanied by formation of an approximately 700 kDa Apaf-1 containing apoptosome complex. *Leukemia*. 2001;15:1388-1397.
135. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ. Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol*. 2003;171:88-95.
136. Tong X, Georgakis GV, Li L, Susan OB, Anas Y, Mohammad L. In Vitro Activity of a Novel Fully Human Anti-CD40 Antibody CHIR-12.12 in Chronic Lymphocytic Leukemia: Blockade of CD40 Activation and Induction of ADCC. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2004;104:2504-.
137. Matthews C, Catherwood M, Morris TC, Alexander HD. Routine analysis of IgVH mutational status in CLL patients using BIOMED-2 standardized primers and protocols. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:1899-1904.
138. Migliazza A, Martinotti S, Chen W, et al. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:12520-12524.
139. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17:2257-2317.
140. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Ig VH gene mutational patterns indicate different tumor cell status in human myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 1996;87:746-755.
141. Montaner D, Tarraga J, Huerta-Cepas J, et al. Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:W486-491.
142. Sneath PH, Sokal RR. Numerical taxonomy. *Nature*. 1962;193:855-860.
143. Herrero J, Valencia A, Dopazo J. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics*. 2001;17:126-136.
144. Benjamini Y HY. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B MET*. 1995;57:289-300.
145. Al-Shahrour F, Minguéz P, Tarraga J, et al. BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:W472-476.
146. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3:32-35.
147. Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, et al. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:11816-11821.
148. Jardin F, Ruminy P, Parmentier F, et al. Clinical and biological relevance of single-nucleotide polymorphisms and acquired somatic mutations of the BCL6 first intron in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2005;19:1824-1830.
149. Jardin F, Ruminy P, Bastard C, Tilly H. The BCL6 proto-oncogene: a leading role during germinal center development and lymphomagenesis. *Pathol Biol (Paris)*. 2007;55:73-83.

150. Artiga MJ, Saez AI, Romero C, et al. A short mutational hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas. *Am J Pathol.* 2002;160:1371-1380.
151. Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, et al. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood.* 2000;95:651-659.
152. Lossos IS, Levy R. Mutation analysis of the 5' noncoding regulatory region of the BCL-6 gene in non-Hodgkin lymphoma: evidence for recurrent mutations and intracлонаl heterogeneity. *Blood.* 2000;95:1400-1405.
153. Seitz V, Hummel M, Anagnostopoulos I, Stein H. Analysis of BCL-6 mutations in classic Hodgkin disease of the B- and T-cell type. *Blood.* 2001;97:2401-2405.
154. Malpeli G, Barbi S, Moore PS, et al. Primary mediastinal B-cell lymphoma: hypermutation of the BCL6 gene targets motifs different from those in diffuse large B-cell and follicular lymphomas. *Haematologica.* 2004;89:1091-1099.
155. Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science.* 1998;280:1750-1752.
156. Gaidano G, Capello D, Gloghini A, et al. Frequent mutation of bcl-6 proto-oncogene in high grade, but not low grade, MALT lymphomas of the gastrointestinal tract. *Haematologica.* 1999;84:582-588.
157. Sahota SS, Davis Z, Hamblin TJ, Stevenson FK. Somatic mutation of bcl-6 genes can occur in the absence of V(H) mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2000;95:3534-3540.
158. Min DL, Zhou XY, Yang WT, et al. Point mutation of 5' noncoding region of BCL-6 gene in primary gastric lymphomas. *World J Gastroenterol.* 2005;11:51-55.
159. Jantus-Lewintre E, Sarsotti E, Terol MJ, Benet I, Garcia-Conde J. Bortezomib induces different apoptotic rates in B-CLL cells according to IgVH and BCL-6 mutations. *Clin Transl Oncol.* 2006;8:805-811.
160. MacLennan IC, Liu YJ, Oldfield S, Zhang J, Lane PJ. The evolution of B-cell clones. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;159:37-63.
161. Catherwood MA, Matthews C, Niblock R, Dobbin E, Morris TC, Alexander HD. ZAP-70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol.* 2006;76:294-298.
162. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, et al. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science.* 1993;262:747-750.
163. Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocq G, Bastard C. LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nat Genet.* 1993;5:66-70.
164. Wagner SD, Kaeda JS. BCL-6: rearrangement and mutation in lymphoma. *Methods Mol Med.* 2005;115:251-270.
165. Gaidano G, Capello D, Gloghini A, et al. BCL-6 in aids-related lymphomas: pathogenetic and histogenetic implications. *Leuk Lymphoma.* 1998;31:39-46.
166. Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K, Houldsworth J, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2003;101:2914-2923.
167. Migliazza A, Ye BH, Fracchiolla N, et al. Mutations of the 5' non-coding regions of BCL-6 are common in B cell malignancies and can deregulate BCL-6 expression. *Blood.* 1997;90 (Suppl.1):177a.
168. Kelley TW, Alkan S, Srkalovic G, Hsi ED. Treatment of human chronic lymphocytic leukemia cells with the proteasome inhibitor bortezomib promotes apoptosis. *Leuk Res.* 2004;28:845-850.
169. Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through

- generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*. 2006;107:257-264.
170. Nencioni A HF, Dillon CP, Yokoo R., Scheiermann C, Cardone MH, Barbieri E, Rocco I, Garuti A, Wesselborg S, Belka C, Brossart P, Patrone F, Ballestero A. Evidence for a protective role of Mcl-1 in proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Blood*. 2005;105:3255-3262.
171. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem*. 2002;277:16639-16647.
172. Reed JC, Pellecchia M. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*. 2005;106:408-418.
173. Rodriguez A, Martinez N, Camacho FI, et al. Variability in the degree of expression of phosphorylated I kappa B alpha in chronic lymphocytic leukemia cases with nodal involvement. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6796-6806.
174. Yamochi T, Kaneita Y, Akiyama T, Mori S, Moriyama M. Adenovirus-mediated high expression of BCL-6 in CV-1 cells induces apoptotic cell death accompanied by down-regulation of BCL-2 and BCL-X(L). *Oncogene*. 1999;18:487-494.
175. Albagli O, Lantoine D, Quief S, et al. Overexpressed BCL6 (LAZ3) oncoprotein triggers apoptosis, delays S phase progression and associates with replication foci. *Oncogene*. 1999;18:5063-5075.
176. Kay NE, Hamblin TJ, Jelinek DF, et al. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2002:193-213.
177. Seiffert M, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. Efficient nucleofection of primary human B cells and B-CLL cells induces apoptosis, which depends on the microenvironment and on the structure of transfected nucleic acids. *Leukemia*. 2007;21:1977-1983.
178. Abruzzo LV, Lee KY, Fuller A, et al. Validation of oligonucleotide microarray data using microfluidic low-density arrays: a new statistical method to normalize real-time RT-PCR data. *Biotechniques*. 2005;38:785-792.
179. Bilban M, Heintel D, Scharl T, et al. Deregulated expression of fat and muscle genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia with high lipoprotein lipase expression. *Leukemia*. 2006;20:1080-1088.
180. Ren C, Ren CH, Li L, Goltsov AA, Thompson TC. Identification and characterization of RTVP1/GLIPR1-like genes, a novel p53 target gene cluster. *Genomics*. 2006;88:163-172.
181. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of ASXL2 gene in silico. *Int J Oncol*. 2003;23:845-850.
182. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007.
183. Kurz T, Pintard L, Willis JH, et al. Cytoskeletal regulation by the Nedd8 ubiquitin-like protein modification pathway. *Science*. 2002;295:1294-1298.
184. Pan ZQ, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene*. 2004;23:1985-1997.
185. Aplan PD, Nakahara K, Orkin SH, Kirsch IR. The SCL gene product: a positive regulator of erythroid differentiation. *Embo J*. 1992;11:4073-4081.
186. Hoang T, Paradis E, Brady G, et al. Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood*. 1996;87:102-111.
187. Ferrer A, Ollila J, Tobin G, et al. Different gene expression in immunoglobulin-mutated and immunoglobulin-No mutated forms of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;153:69-72.

188. Abruzzo LV, Barron LL, Anderson K, et al. Identification and validation of biomarkers of IgV(H) mutation status in chronic lymphocytic leukemia using microfluidics quantitative real-time polymerase chain reaction technology. *J Mol Diagn.* 2007;9:546-555.
189. Vasconcelos Y, De Vos J, Vallat L, et al. Gene expression profiling of chronic lymphocytic leukemia can discriminate cases with stable disease and mutated Ig genes from those with progressive disease and No mutated Ig genes. *Leukemia.* 2005;19:2002-2005.
190. Gauger MA, Sancar A. Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer. *Cancer Res.* 2005;65:6828-6834.
191. Boivin DB, James FO, Wu A, Cho-Park PF, Xiong H, Sun ZS. Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood.* 2003;102:4143-4145.
192. Yang MY, Chang JG, Lin PM, et al. Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of hPER3. *Cancer Sci.* 2006;97:1298-1307.
193. Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, et al. Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:3407-3412.
194. Kondratov RV, Kondratova AA, Lee C, Gorbacheva VY, Chernov MV, Antoch MP. Post-translational regulation of circadian transcriptional CLOCK(NPAS2)/BMAL1 complex by CRYPTOCHROMES. *Cell Cycle.* 2006;5:890-895.
195. van't Veer MB, Brooijmans AM, Langerak AW, et al. The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2006;91:56-63.
196. Heintel D, Kienle D, Shehata M, et al. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2005;19:1216-1223.
197. Nakamura T, Yamazaki Y, Saiki Y, et al. Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Mol Cell Biol.* 2000;20:3178-3186.
198. Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood.* 2001;98:3413-3420.
199. Shen Y, Luche R, Wei B, Gordon ML, Diltz CD, Tonks NK. Activation of the Jnk signaling pathway by a dual-specificity phosphatase, JSP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:13613-13618.
200. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001;81:807-869.
201. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410:37-40.
202. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22:153-183.
203. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 2000;103:239-252.
204. Alonso A, Merlo JJ, Na S, et al. Inhibition of T cell antigen receptor signaling by VHR-related MKPX (VHX), a new dual specificity phosphatase related to VH1 related (VHR). *J Biol Chem.* 2002;277:5524-5528.
205. Burchert A, Notter M, Dietrich Menssen H, et al. CD82 (KAI1), a member of the tetraspan family, is expressed on early haemopoietic progenitor cells and up-regulated in distinct human leukaemias. *Br J Haematol.* 1999;107:494-504.
206. Tonoli H, Barrett JC. CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? *Trends Mol Med.* 2005;11:563-570.

207. Rodriguez A, Villuendas R, Yanez L, et al. Molecular heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia is dependent on BCR signaling: clinical correlation. *Leukemia*. 2007;21:1984-1991.
208. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*. 2001;2:172-180.
209. Muschen M, Lee S, Zhou G, et al. Molecular portraits of B cell lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10014-10019.
210. van de Wetering M, de Lau W, Clevers H. WNT signaling and lymphocyte development. *Cell*. 2002;109 Suppl:S13-19.
211. Qiang YW, Endo Y, Rubin JS, Rudikoff S. Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene*. 2003;22:1536-1545.
212. McWhirter JR, Neuteboom ST, Wancewicz EV, Monia BP, Downing JR, Murre C. Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:11464-11469.
213. Lu D, Zhao Y, Tawatao R, et al. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:3118-3123.
214. Liu TH, Raval A, Chen SS, Matkovic JJ, Byrd JC, Plass C. CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2006;66:653-658.
215. Staal FJ, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:21-30.
216. Jelinek DF, Tschumper RC, Stolovitzky GA, et al. Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer Res*. 2003;1:346-361.
217. Mikaelsson E, Danesh-Manesh AH, Luppert A, et al. Fibromodulin, an extracellular matrix protein: characterization of its unique gene and protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Blood*. 2005;105:4828-4835.
218. Van Bockstaele F, Pede V, Janssens A, et al. Lipoprotein lipase mRNA expression in whole blood is a prognostic marker in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chem*. 2007;53:204-212.
219. Munoz L, Lasa A, Carricondo MT, Hernandez C, Ubeda J, Nomdedeu JF. Comparative analysis of ZAP-70 expression and Ig VH mutational status in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007;72:96-102.
220. Bojarska-Junak A, Giannopoulos K, Kowal M, Dmoszynska A, Rolinski J. Comparison of methods for determining zeta-chain associated protein - 70 (ZAP-70) expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70:293-301.
221. Gibbs G, Bromidge T, Howe D, Hopkins J, Johnson S. Comparison of flow cytometric methods for the measurement of ZAP-70 expression in a routine diagnostic laboratory. *Clin Lab Haematol*. 2005;27:258-266.
222. Doubek M, Cmunt E, Schwarz J, et al. Prognostic markers and risk stratification. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:S44.
223. Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, et al. Quantification of ZAP70 mRNA in B Cells by Real-Time PCR Is a Powerful Prognostic Factor in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Chem*. 2007;53:1757-1766.
224. de Sanctis JB, Blanca I, Radzioch D, Bianco NE. Lipoprotein lipase expression in natural killer cells and its role in their cytotoxic activity. *Immunology*. 1994;83:232-239.



## XIII. NOTAS



