



Universidad Nacional de
Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica



**“EVALUACIÓN MOLECULAR DE LA LONGITUD
TELOMÉRICA Y DE LOS GENES QUE PARTICIPAN EN
SU REGULACIÓN EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÓNICA”**

Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor de la
Universidad Nacional de Buenos Aires

Autora: Lic. Patricia Carolina Dos Santos

Directora: Dra. Irma Slavutsky

Directora Adjunta: Dra. Julieta Panero

Asesora de estudios: Dra. Viviana Varela

Lugar de trabajo:

Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides
Instituto de Medicina Experimental (IMEX)
Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

2015

A la Profesora Rita Elena Praus

El amor más grande

Mi mamá

El siguiente trabajo de tesis permitió generar la siguiente producción:

Publicaciones científicas:

- Panero J, **Dos Santos P**, Slavutsky I. “Telomere length in lymphoid malignancies: A comparative analysis”. In: Telomeres: Biological functions, sequencing and aging. Nicolás E. Dominguez and Sofía M. Pereyra, eds. Nova Science Publishers, Inc, New York. pp. 53-77, 2012.
- **Dos Santos P***, Panero J*, Palau Nagore V, Stanganelli C, F, Bezares R, Slavutsky I. “Telomere shortening associated with increased genomic complexity in chronic lymphocytic leukemia”. Tumour Biol. 2015;36:8317-24. *Autoría compartida

Premios recibidos

Premio “Eufemio Uballes” al mejor trabajo de investigación experimental, clínica o terapéutica que contribuya al progreso del conocimiento de la lucha del cáncer. “Análisis el estado mutacional y de los rearrreglos del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en pacientes con leucemia Linfocítica crónica”. **Patricia Dos Santos**, Carmen Stanganelli, Ana Travella, Julieta Panero, Raimundo Bezares e Irma Slavutsky. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, 26 de Septiembre de 2013.

Segundo Premio Póster Área Genética al trabajo: “Asociación de longitud telomérica con alteraciones citogenéticas y citomoleculares en leucemia linfocítica crónica”.

Comunicaciones a Congresos:

- **Dos Santos P**, Panero J, Stanganelli C, Travela A, Slavutsky I. Análisis de longitud telomérica en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC). Su correlación con citogenética, FISH e IGVH. LVII Reunión Científica Anual de SAIC, Mar del Plata, 14 al 17 de noviembre de 2012. Medicina 2012; 72 Supl II, 194.

- Roisman A, Panero J, **Dos Santos P**, Stanganelli C, Metrebian F, Narbaitz M, Slavutsky I. Expresión diferencial del gen SOX11 en neoplasias linfoides. XXI Congreso Argentino de Hematología, Mar del Plata, 29 de Octubre al 1 de Noviembre de 2013. Hematología 2013; 17: 180.
- Iglesias Molli A, Bugatto V, Gauto M, **Dos Santos P**, Panero J, Villarino J, Gonzalez C, Slavutsky I, Fretchel G, Cerrone G. Asociación entre la longitud telomérica y enfermedades metabólicas. LVIII Reunión Científica Anual de SAIC, Mar del Plata, 20-23 de noviembre de 2013. Medicina 2013; 73 Supl III: 183.
- Panero J, **Dos Santos P**, Stanganelli C, Travella A, Stella F, Bezares R, Slavutsky I. Telomere shortening associated with increased karyotypic complexity in chronic lymphocytic leukemia. XV International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia, Colonia, Alemania, 9 al 11 de septiembre de 2013, pp. 101.
- **Dos Santos P**, Panero J, Palau Nagore V, Slavutsky I. Asociación de longitud telomérica con alteraciones citogenéticas y citomoleculares en leucemia linfocítica crónica. LIX Reunión Científica Anual de SAIC, Mar del Plata, 19-22 de noviembre de 2014. Medicina 2014; 74 Supl III, 170.
- **Dos Santos P**. Evaluación de longitud telomérica y actividad de telomerasa en leucemia linfocítica crónica. 1er Congreso Argentino de Estudiantes de Genética. Posadas, Misiones, 19 de agosto de 2015.
- **Dos Santos P**: Longitud telomérica y genes que la regulan. Su significado en leucemia linfocítica crónica. Congreso Argentino de Genética, Mar del Plata, 16 de septiembre de 2015.

Participaciones en subsidios:

CONICET PIP 517, 2013-2015, Directora: Dra. Irma Slavutsky

GlaxoSmithKlein, 2012-2015, Directora: Dra. Irma Slavutsky

Agradecimientos:

Al CONICET que mediante las becas me dio la posibilidad de hacer realidad mi anhelo de hacer un doctorado.

A la Dra. Irma Slavutsky, por su dedicación en formarme y guiarme, por su tolerancia cuando me costó avanzar, y porque supo acelerar el ritmo cuando ya pude seguirla.

A los amigos que me regaló Buenos Aires, ellos me adoptaron, e hicieron la diferencia en mis años acá.

A mis amigas de la facultad, de mi tierra, de la vida, quienes a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes y celebramos cada reencuentro que se nos regala.

A mi familia, quienes supieron darme las fuerzas necesarias para no marcharme en los peores momentos. Ellos me sostuvieron. Especialmente Javier (mi orgullo), papá, mi abuelita Carola y Giselle.

A Mauricio, el amor de mi vida, que se atrevió a embarcarse en la aventura de mis sueños, y aun hoy me sostiene la mano.

A mi mamá, que se que estará orgullosa, siempre fue mi faro, y hoy, con ese amor incondicional, me guía desde el cielo.

Por último, mi agradecimiento más grande a Dios, que renueva mis fuerzas cada día, y no deja de sorprenderme con sus bendiciones.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Características generales de la leucemia linfocítica crónica	1
1.2. Origen del linfocito B de la LLC	5
1.3. Biología de la LLC	9
1.4. Factores pronóstico	16
1.4.1. Marcadores séricos	20
1.4.2. Expresión de ZAP-70 y CD38	21
1.4.3. Mutaciones de <i>IGHV</i>	22
1.4.4. Alteraciones genéticas	26
1.4.5. Longitud telomérica y actividad de telomerasa	30
1.4.5.1 Telómeros	30
1.4.5.2. Acortamiento telomérico	34
1.4.5.3. Telomerasa y proteínas teloméricas	35
1.4.5.4. Complejo ribonucleoproteico	41
2. Objetivos	45
3. Materiales y métodos	46
3.1. Población estudiada	46
3.2. Metodología	47
3.2.1. Separación de células mononucleares de SP por Ficoll-Paque PLUS	47
3.2.2. Extracción de ADN genómico	48
3.2.3 Extracción de ARN total	49
3.2.4. Reacción de retro-transcripción inversa (RT-PCR)	50

3.2.5. Análisis de la LT mediante la técnica de TRF	51
3.2.6. Cuantificación absoluta de la LT	56
3.2.6.1. Medición de la LT absoluta	57
3.2.7. Análisis de expresión génica	62
3.2.7.1. Diseño de primers	62
3.2.7.2. PCR en tiempo real (qRT-PCR) para medición de expresión génica	64
3.2.8. Análisis del estado mutacional de IGHV	65
3.2.8.1. A partir de ARN y su correspondiente ADNc	65
3.2.8.2. A partir de ADN	68
3.2.8.3. Electroforesis en gel de agarosa	69
3.2.8.4. Análisis de secuencias	70
3.3. Análisis estadístico	73
4. Capítulo Primero. Análisis de longitud telomérica y su relación con rearrreglos genómicos	74
4.1. Resultados	74
4.1.1. Pacientes estudiados	74
4.1.2. Validación de la técnica de q-PCR	75
4.1.3. Análisis de la LT en pacientes con LLC y controles	75
4.1.4. Correlación de la LT con la edad	76
4.1.5. Correlación entre LT y alteraciones genéticas	77
4.1.6. Correlación con las características clínica de los pacientes	83
4.2. Discusión	85
5. Capítulo Segundo. Estatus mutacional de los genes <i>IGHV</i> y Telómeros	89

5.1. Resultados	89
5.1.1. Características generales	89
5.1.2. Análisis de los rearrreglos <i>IGHV-D-J</i>	91
5.1.2.1. Distribución de familias y genes VH	91
5.1.2.2. Distribución de familias y genes DH	93
5.1.2.3. Distribución de familias y genes JH	94
5.1.2.4. Análisis de receptores estereotipados	95
5.1.3. Correlación del estatus mutacional de IGHV con la LT	96
5.1.4. Correlación del estatus mutacional de IGHV con las características clínicas de los pacientes	98
5.2. Discusión	100
6. Capítulo Tercero. Expresión de genes reguladores de la longitud telomérica	109
6.1. Resultados	109
6.1.1. Expresión génica	109
6.1.1.1. Optimización de la qRT-PCR	109
6.1.1.2. Análisis de los perfiles de expresión de genes asociados a telómeros	112
6.1.1.3. Asociación de los perfiles de expresión génica con la LT, las alteraciones genéticas y el estatus mutacional de IGHV	114
6.1.1.4. Correlación con los parámetros clínicos	118
6.2. Discusión	122
7. Conclusiones	127
8. Bibliografía	130

1: Introducción

1. Introducción

1.1. Características generales de la leucemia linfocítica crónica

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es la neoplasia a células B más frecuente del adulto en occidente. Se caracteriza por la acumulación de linfocitos B maduros CD5 positivos en sangre periférica (SP), médula ósea (MO), órganos linfoides y bazo (Hallek 2008). Si bien originalmente se consideró que se trataba de una enfermedad estable que se originaba en la simple acumulación de linfocitos B quiescentes como consecuencia de una disminución de la apoptosis, estudios posteriores demostraron la presencia de linfocitos tumorales con una alta capacidad proliferante (Messmer et al, 2005; Damle et al, 2010; Kikushige and Miyamoto, 2015). Esta población que se duplica activamente representa entre el 0.1-1% del clon leucémico y ha sido correlacionada con una forma más agresiva de la enfermedad (Palacios et al, 2015).

La LLC presenta una mayor incidencia en hombres, con una relación hombre:mujer de 1,7:1; afecta principalmente a personas mayores de 60-65 años, incrementándose hacia la séptima década de vida, con una edad media al diagnóstico de 70 años en hombres y de 74 años en mujeres (Müller-Hermelink et al, 2008; Zenz et al, 2010). A pesar de ser rara su aparición en menores de 50 años, actualmente hay un mayor porcentaje de casos con diagnóstico temprano (aproximadamente 20%), que por lo general constituyen un hallazgo en un hemograma de rutina en pacientes totalmente asintomáticos (Dighiero and Hamblin, 2008).

El cuadro clínico se caracteriza por la proliferación clonal y acumulación de células B, CD5+/CD23+ en SP ($>5 \times 10^9/L$), linfadenopatías, adenomegalias, hepato-esplenomegalia, infecciones recurrentes, falla medular, anemia y plaquetopenia en las formas más avanzadas, y usualmente fenómenos autoinmunes asociados (anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica autoinmune) (Chiorazzi et al, 2005; Zens et al, 2010). Cuando la enfermedad involucra SP y MO, recibe el nombre de LLC, mientras que si ocurre infiltración de nódulos linfáticos u otros tejidos por células B con morfología e inmunofenotipo de LLC pero sin manifestaciones leucémicas, recibe el

nombre de linfoma de linfocitos pequeños (LLP) (Hallek et al, 2008; Santos and O'Brien, 2012). En este caso, el número de linfocitos B en SP debe ser menor a $5 \times 10^9/L$ y el diagnóstico debe ser confirmado por evaluación histo-patológica mediante biopsia de ganglio linfático (Hallek, 2015). Ambas patologías son consideradas por la *World Health Organization* (WHO) (Müller-Hermelink et al, 2008) como manifestaciones diferentes de una misma entidad tomando como base las características citológicas, histopatológicas, inmunofenotípicas y citogenéticas.

El curso clínico de la LLC es altamente variable con un amplio rango de sobrevida, entre unos pocos meses y más de una década a partir del diagnóstico. Aproximadamente un tercio de los casos permanecen asintomáticos por muchos años sin necesidad de tratamiento, con una expectativa de vida similar a la de la población general, otro tercio presenta una fase inicial indolente seguida de progresión y muerte por causas ligadas a la patología, mientras que el tercio restante debuta con enfermedad agresiva, requiriendo tratamiento inmediato (Dighiero, 2003; Chiorazzi et al, 2005). La LLC puede estar precedida por una entidad pre-maligna denominada MBL (*monoclonal B lymphocytosis*) caracterizada por la presencia de una población clonal B $< 5 \times 10^9/L$ sin adenopatías, organomegalias, citopenias u otros síntomas relacionados a LLC, y con una tasa de progresión a LLC de 1-2%/año (Rawstron et al, 2008; Matos and Falcão, 2011; te Raa et al, 2012). Las terapias disponibles pueden inducir la remisión de la enfermedad, pero como la mayor parte de los pacientes recaen, actualmente hay consenso en que la misma es aún incurable (Murray et al, 2013).

En cuanto al diagnóstico de la LLC, el mismo se basa en: 1) recuento de linfocitos de morfología característica mayor a $5 \times 10^9/L$ de al menos tres meses de duración; 2) análisis de clonalidad del inmunofenotipo por citometría de flujo (Müller-Hermelink et al, 2008; Hallek, 2015). A nivel morfológico, en SP se observan linfocitos pequeños, maduros con escaso citoplasma y cromatina densa, pudiendo encontrarse también células de mayor diámetro de tipo prolinfocito. Las células de LLC co-expresan el antígeno (Ag) de células T CD5 y los Ags de superficie de las células B: CD19, CD20 y CD23 (Hallek

et al, 2008). Los niveles de CD20, CD79b e inmunoglobulinas de superficie (Igs), son particularmente bajos comparados con aquellos encontrados en células B de donantes sanos (Ginaldi et al, 1998; Moreau et al, 1997; Dighiero and Hamblin, 2008). Cada clon de células leucémicas presenta restricción de una de las cadenas livianas kappa o lambda. Si bien pueden observarse variaciones en la intensidad de la expresión de estos marcadores, el patrón immuno-fenotípico constituye una herramienta muy útil para diferenciar la LLC de otras neoplasias linfoides (Figura 1).

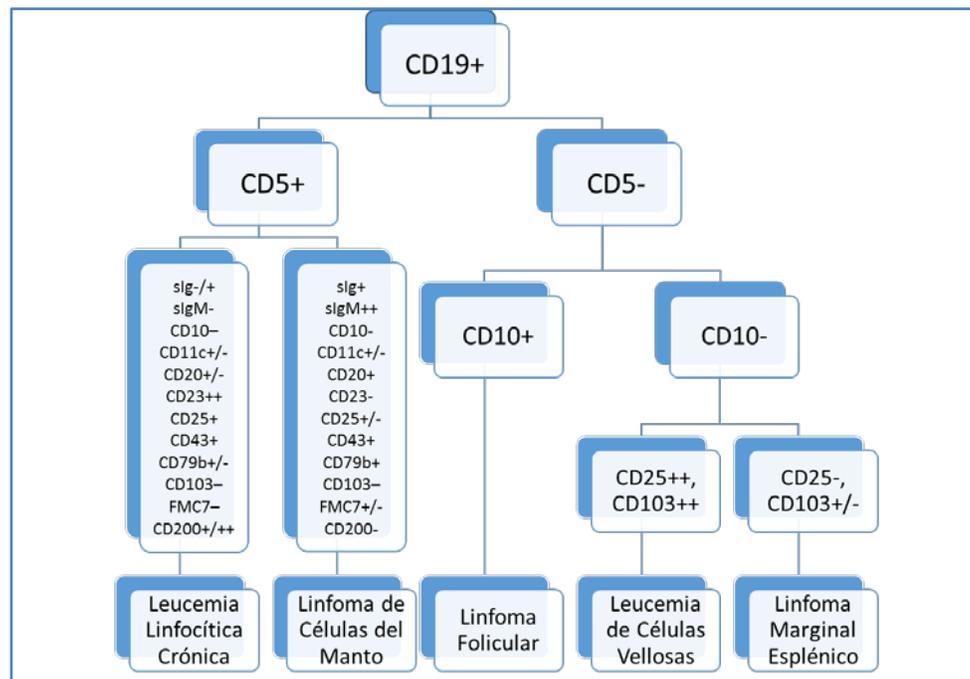


Figura 1. Diagnóstico diferencial de linfocitosis CD19+ (Adaptado de Dupont et al, 2015).

Desde el punto de vista epidemiológico, la LLC es la leucemia más frecuente en Occidente, correspondiendo aproximadamente al 30% del total de las leucemias, con una incidencia de 4-6,5/100.000 habitantes por año (Smith et al, 2011; Marcos-Gragera et al, 2011; Shenoy et al, 2011). En particular, datos provistos por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>) muestran que para el período 2008-2012 la incidencia fue de 4,5/100.000/año, y el número de muertes fue de 1,4/100.000/año. La incidencia en las poblaciones asiáticas y afroamericanas es

significativamente menor (~10% de las leucemias) con respecto a la del mundo occidental y se mantiene incluso ante los movimientos migratorios, alejando así la hipótesis de factores ambientales predisponentes (Chang et al, 2006; Dores et al, 2007). Simultáneamente, es muy poca la información respecto de la incidencia de LLC en los países de América Latina, existiendo un reporte de México y países del norte de la cadena Andina, con alto componente de poblaciones indígenas, en los que se observa una frecuencia llamativamente baja (Ruiz-Argüelles et al, 1999), en tanto que datos de Uruguay indican una incidencia de 5,3/100.000 habitantes/año, similar a la observada en los países de Europa occidental (Moro et al, 2009).

Si bien no se describió un patrón genético hereditario característico, se sabe que la LLC, al igual que otras neoplasias linfoides, tiene mayor frecuencia que la esperada en familiares de primer orden (Mauro et al, 2006; Sellick et al, 2006; Houlston and Catovsky, 2008; Goldin et al, 2009). Estas familias parecen tener herencia Mendeliana autosómica dominante (Sellick et al, 2006; Brown et al, 2012), observándose que el 6 a 9% de estos pacientes poseen antecedentes de LLC en su historia familiar, mientras que otro 12% reportan casos con otros síndromes linfoproliferativos (Houlston et al, 2003; Mauro et al, 2006; Brown, 2008; Tjonnfjord et al, 2012; Brown, 2013). Además, se detecta el fenómeno de anticipación, definido como la presentación de la enfermedad en familiares directos en edad más temprana en las sucesivas generaciones (Yuille et al, 2000; Caporaso et al, 2004; Alexandrescu and Wiernik, 2007). Al presente se desconoce el mecanismo molecular implicado en este fenómeno, no habiéndose observado la expansión de secuencias trinucleotídicas característica de las enfermedades neurodegenerativas (Auer et al, 2007). Estudios recientes han identificado numerosos genes o locus de riesgo que podrían estar asociados a la agregación familiar (2q13, 2q37.1, 6p21.3, 6p25.3, 11q24.1, 13q21.33-q22.2, 15q23 y 19q13.32) (Di Bernardo et al, 2008; Slager et al, 2011; Davids and Burger, 2012), lo que sugiere el posible aporte de múltiples genes (Goldin and Slager, 2007) o bien la presencia de polimorfismos en genes predisponentes a LLC familiar (Rudd, 2006; Auer et al, 2007). A nivel clínico, se ha reportado que la LLC familiar y esporádica muestran una distribución similar de estadios al diagnóstico y luego de una supervivencia de 10 años (Mauro et al, 2006). Interesantemente,

existen trabajos que muestran la existencia de una historia familiar más común en mujeres que en varones (Mauro et al, 2006; Crowther-Swanepoel et al, 2010), por lo que la proporción típica de LLC entre hombres y mujeres se vería modificada en la LLC familiar (Brown, 2013). Si bien los datos son limitados, las características biológicas y clínicas de la LLC familiar y esporádica resultan similares con una ligera predominancia de marcadores de bajo riesgo en la primera.

1.2. Origen del linfocito B de la LLC

La maduración de los linfocitos B se produce en la MO, proceso durante el cual se rearreglan los genes de la región variable (V) de las inmunoglobulinas (Ig), originando una molécula que formará parte del receptor de células B (BCR), responsable del reconocimiento antigénico. Al generarse este reconocimiento antígeno-específico, la célula B ingresa al centro germinal (CG) de los folículos linfoides. Este proceso ocurre en la llamada “zona oscura” del CG y se acompaña de hiper-mutación somática (HMS), mecanismo por el cual se introduce un alto número de mutaciones en los segmentos V de las cadenas pesada (VH) y liviana (VL) de las Ig, sitio de unión al Ag. Posteriormente, las células hiper-mutadas migran a la “zona clara” del CG y se seleccionan aquellas que adquirieron mayor afinidad por el Ag. Por el contrario, las células con mutaciones desfavorables (de baja afinidad o auto-reactivas) mueren por apoptosis. Estas vías de selección usualmente requieren de la presencia de linfocitos T en el CG los cuales interactúan con las células B en una respuesta inmune T-dependiente (TD). Sin embargo, este proceso también puede ocurrir en ausencia de células T y fuera del CG, en la zona marginal de los folículos linfoides, llamada respuesta inmune T-independiente (TI). Ambos procesos, TD y TI, originan células plasmáticas o células B de memoria post-reconocimiento antigénico. A su vez, dentro del CG existe migración celular entre las zonas clara y oscura, donde las células seleccionadas positivamente sufren varias rondas de proliferación, mutación y selección antes de completar el proceso de diferenciación y abandonar el CG (Chiorazzi et al, 2005; Zenz et al, 2010).

Al presente existen numerosos aspectos sin resolver en la LLC, entre los cuales sin duda adquiere relevancia conocer el origen del linfocito B característico de esta patología,

así como su contrapartida normal, habiéndose desarrollado diferentes hipótesis al respecto. Una hipótesis inicial sostiene que la transformación maligna sobreviene en diferentes estadios del desarrollo del linfocito B. Las células que expresan Igs con sus genes VH sin que haya ocurrido el proceso de HMS, serían originadas a partir de un linfocito B *naïve* que aún no tuvo contacto con el Ag, y por lo tanto no ha transitado por el CG, mientras que aquellas que expresan Igs con genes VH mutados (M) tendrían su origen en un linfocito B que realizó su paso por el CG, post-contacto antigénico (Chiorazzi et al, 2005; Zenz et al, 2010; García-Moñoz et al, 2012) (Figura 2).

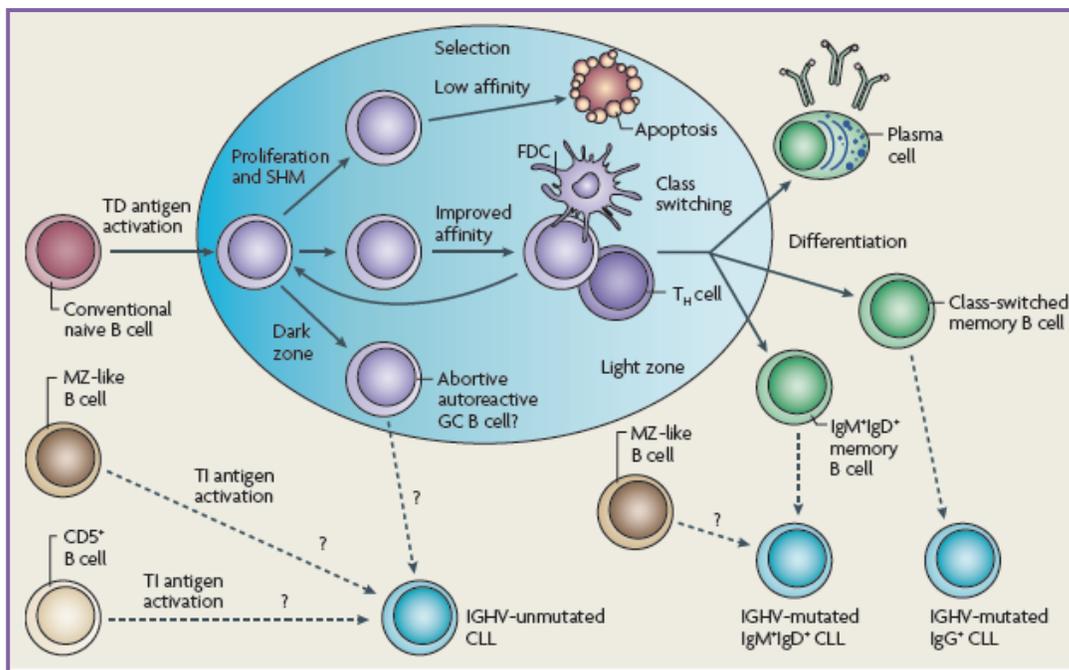


Figura 2. Reacciones en el CG y contrapartida celular normal de la célula leucémica. Las evidencias más firmes sugieren que las formas de LLC mutadas derivan de células B de memoria post-CG, aunque también se discute la derivación a partir de células B que acumulan mutaciones a través de una respuesta T independiente. Con respecto a las LLC no mutadas, parecerían derivar de células B activadas por reconocimiento antigénico, no siendo claro aún si se trata de células B *naïve* CD5+ o células B de la zona marginal. A su vez, también sigue siendo tema de estudio si esta activación surge a través de una respuesta T independiente o T dependiente, involucrando una célula B autorreactiva (Zenz et al, 2010).

Otra hipótesis propone que ambas sub-poblaciones (LLC-M y no mutadas [NM]) han tenido contacto previo con un Ag, posiblemente un auto-Ag, el cual fue reconocido por el BCR con una afinidad reducida (Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004; Thorselius

et al, 2006; Stamatopoulos et al, 2007). En el caso de las LLC-M este modelo propone que estas células serían linfocitos B de memoria que luego de la maduración fueron anergizadas, explicando la sub-expresión del BCR, mientras que en el caso de las células de LLC-NM, luego de la unión del auto-Ag al BCR, el mismo sería incapaz de inducir el proceso de HMS. El sesgo en la expresión de ciertos genes *IGHV* (*immunoglobulin heavy variable region*) en las formas NM con una expresión muy conservada de aminoácidos en el HCDR3 (*heavy-chain complementarity-determining región 3*) sustenta esta hipótesis, contemplándose un proceso de selección antigénica (Zenz et al, 2010).

Otros autores (Zenz et al, 2010; Chiorazzi and Ferrarini, 2011) sugieren que ambas sub-poblaciones leucémicas, derivan de células de la zona marginal de los folículos linfoides. Esta hipótesis se basa en el fenotipo particular de las células de LLC y la presencia de un mecanismo inmunológico alternativo a la clásica respuesta TD y TI (Weill et al, 2009). En este modelo la presencia de la HMS y de conmutación isotípica (CI) (mecanismo responsable de cambiar la región efectora de las Igs para permitir el correcto procesamiento antigénico), tendría lugar de una forma “no clásica” es decir por un camino alternativo al del CG. En los últimos años han surgido evidencias adicionales que sugieren la presencia de una respuesta inmunitaria independiente del CG, en donde eventos como HMS, CI y la expresión de AID (*activation-induced cytidine deaminase*), podrían ser mediados también por la presencia de receptores tipo “*Toll*” en una respuesta de inmunidad innata (Weller et al, 2005; Richard et al, 2008; Agathangelidis et al, 2013).

Otra hipótesis propone que los linfocitos B de la LLC se originan a partir de un mecanismo de tolerancia inmunológica normal, tendiente a destruir a las células B auto-reactivas (García-Muñoz et al, 2012). Según este enunciado, los linfocitos B de la LLC adquieren un BCR con señalización autónoma que los induce a proliferar y madurar, independientemente de su estadio. Estos mecanismos inducirían la persistencia de cambios del BCR que, asociados a inestabilidad genómica, darían lugar a aberraciones moleculares capaces de promover el desarrollo neoplásico, favoreciendo la supervivencia de los clones de células B de LLC con marcadores similares y expresión génica

homogénea a pesar de las diferentes etapas de maduración en la que se produce el daño inicial (García-Muñoz and Llorente, 2014). Simultáneamente, Dühren-von Minden et al (2012) plantean que la presencia de BCRs estereotipados, casi idénticos, en diferentes pacientes indicaría que el reconocimiento de Ag específicos estaría involucrado en la patogénesis de la LLC. A diferencia de otras neoplasias a células B, los autores demuestran que los BCRs derivados de las células leucémicas inducen señalización autónoma Ag-independiente, a través de la región HCDR3 y un epítipo interno del BCR responsable de estas señales. En consecuencia, la presencia de distintos epítopos intrínsecos explicarían estas similitudes en los receptores, los cuales se seleccionarían por su habilidad de interacción con el HCDR3.

Estudios más recientes indican que la capacidad de generar células B clonales podría ser adquirida en el estadio de células *stem* hematopoyéticas (CSH), sugiriendo que los eventos leucemogénicos en LLC estarían involucrando CSH multipotentes y auto-renovables en las que se producirían las primeras alteraciones genómicas que llevarían a un aumento de la resistencia a la apoptosis (Kikushige and Miyamoto, 2015). Estos datos estarían sustentados en estudios de xeno-trasplantes de CSHs aisladas de pacientes con LLC que muestran su capacidad de diferenciarse a células B progenitoras, las que posteriormente podrían convertirse en células B mono- u oligo-clonales con fenotipo de LLC (Kikushige et al, 2011; Zhang and Kipps, 2014). Dichas células B no expresan los mismos *IGHVs* ni presentan las mismas anomalías cromosómicas que el clon original, sugiriendo que podrían originarse a partir de un nuevo clon progenitor, situación que sustentaría la capacidad de dichas CSH de desarrollar la enfermedad. Al presente, se desconoce si estas células constituyen un tipo de células madre para la LLC, no obstante se considera que se requieren otros cambios genéticos o epigenéticos para que las mismas se conviertan en neoplásicas (Figura 3).

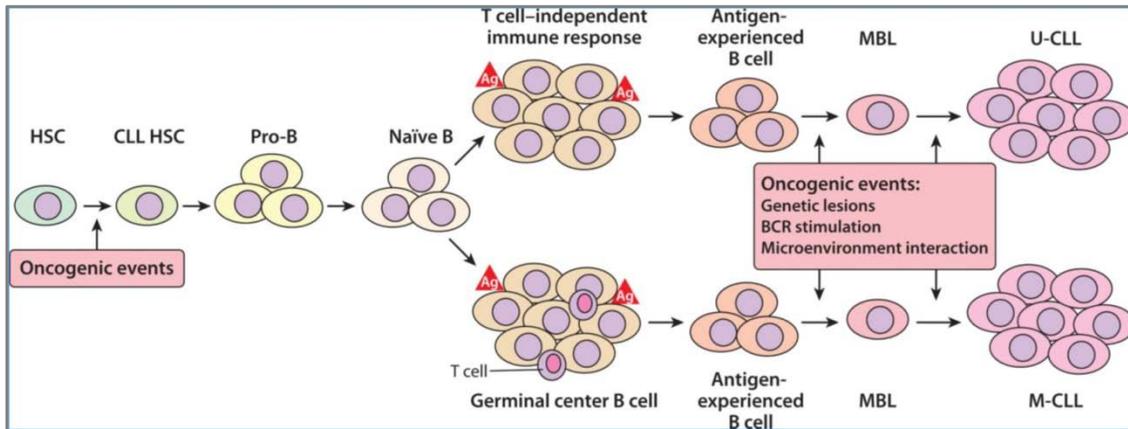


Figura 3. Modelo para el desarrollo de la LLC a partir de células *stem* hematopoyéticas (HSC). Las mutaciones que contribuyen al desarrollo de LLC pueden ocurrir en cualquier etapa de la diferenciación de las células B, incluyendo a las HSC. Las mismas pueden dar lugar a células B con escasas ventajas de crecimiento/supervivencia que, en el contexto de estimulación inmune T-dependiente o T-independiente pueden generar una linfocitosis monoclonal de células B (MBL). Las células de LLC que se originan a partir de células B que han sufrido hipermutación somática de sus genes *IGHV* (*immunoglobulin heavy variable region*) se definen como LLC mutada (M), mientras que aquellas que se originan de las células B que no han sido objeto de mutaciones en sus genes *IGHV* se definen como no-mutadas (*U-CLL: unmutated CLL*). La expansión de un clon de LLC (o MBL) se asocia con la acumulación *de novo* de lesiones genéticas adicionales, así como con las interacciones de las células leucémicas con el microambiente celular (Zhang and Kipps, 2014).

A pesar de las hipótesis propuestas, los estudios de *microarrays* permitieron identificar sólo un pequeño grupo de genes diferencialmente expresados entre la LLC M y NM, a diferencia de los miles de genes que separan a ambas entidades del linfocito B normal, sugiriendo un origen celular único para esta patología, con distintos factores promotores y/o mecanismos de transformación que explicarían las características diferenciales de estos subtipos y su respectiva evolución clínica (Rosenwald et al, 2001; Klein et al, 2001).

1.3. Biología de la LLC

Una de las principales características del linfocito B leucémico es la baja expresión de su BCR. Esta molécula es un complejo multimérico formado por la Ig y el heterodímero $Ig\alpha/Ig\beta$ (CD79a/CD79b) anclados en la membrana celular. La unión del Ag

al complejo desencadena una activación de la vía de traducción de señales mediada por tirosina-quinasa de la familia Src. En linfocitos normales, la vía del BCR es usada para promover la proliferación celular e inducir la producción de anticuerpos. Una vez que la Ig reconoce y se une al Ag específico, el complejo activado recluta quinasas como SYK (*spleen tyrosine kinase*) y LYN (*Tyrosine-protein kinase Lyn*) las cuales fosforilan dominios de las proteínas Ig α /Ig β llamados ITAMS (*immuno receptor tyrosine – based motifs receptors*) (Wang et al, 2013). La fosforilación de estos motivos induce una cascada de señalización río abajo activando diferentes quinasas como BTK (*Bruton's tyrosine kinase*) o PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) (Longo et al, 2007), proteína quinasa C y ERK (*extra celular signal-regulated kinase*) (Davids and Brown, 2012). Asimismo, la estimulación del BCR promueve la supervivencia y proliferación mediante la activación de NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) (Wang et al, 2013), presentando un rol clave en la patogénesis de la LLC, situación que determina que la mayoría de los nuevos blancos terapéuticos estén enfocados a inhibir algunas de las cascadas de señalización previamente mencionadas (Burger et al, 2012; Tarafdar and Michie, 2014; Ortiz-Maldonado et al, 2015) (Figura 4). A su vez, la baja expresión del BCR está relacionada con una menor actividad de tirosina-quinasa, lo cual lleva a defectos en la movilización del Ca^{2+} intracelular y a la fosforilación de tirosinas.

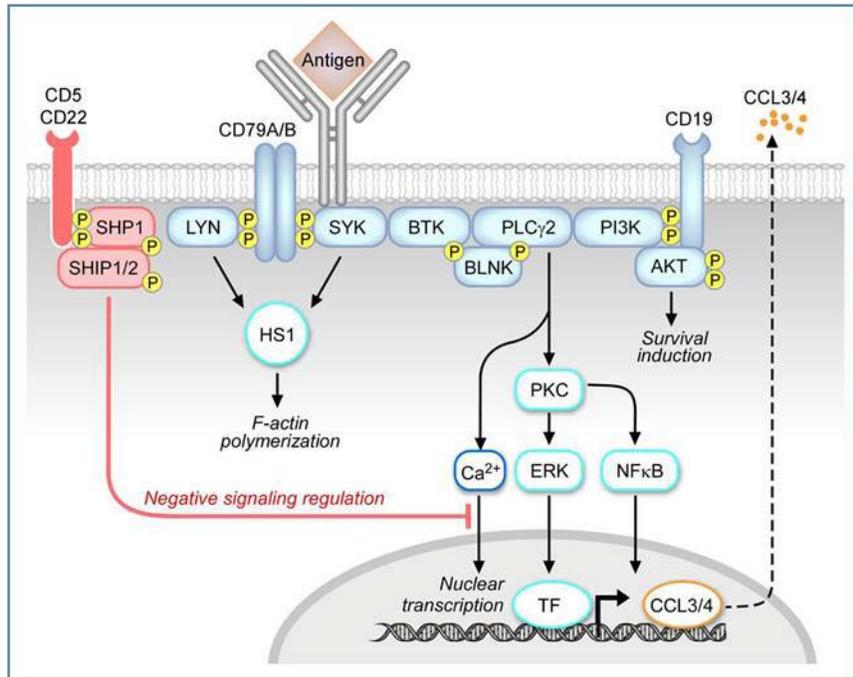


Figura 4. La vía de señalización por el BCR. El BCR se activa por inducción antigénica, llevando a la activación de las quinasas LYN y SYK, que luego transducen la señal a activadores del citoesqueleto, incluyendo la proteína HS1, y a otros efectores tempranos de respuesta a la señalización, incluyendo BTK quinasa. A través del adaptador BLNK, BTK activa a PLC γ 2 el cual activa varias vías abajo, incluyendo la señalización de calcio (Ca²⁺), PKC, NF κ B y la quinasa ERK, además de factores de transcripción nuclear (TF). El co-receptor CD19+ contribuye a la activación de la vía PI3K-AKT e induce la supervivencia. La respuesta de señalización en última instancia promueve la activación de la transcripción nuclear, incluyendo los genes de quimioquinas *CCL3* y *CCL4*, que son luego producidos y secretados. La respuesta a estas señales está fuertemente modulada por co-receptores negativos (por ejemplo CD22, CD5) y fosfatasa, incluyendo SHP1 y SHIP1/2 (ten Hacken et al, 2015).

En la mayoría de las LLC con peor pronóstico se observa una mejor respuesta vía el BCR que en los pacientes con enfermedad indolente (Lanham et al, 2003). También se ha observado que esta respuesta efectiva a la estimulación vía BCR se encuentra relacionada con elevados niveles de expresión de ZAP-70 (ζ -chain associated protein kinase 70 kDa), una tirosina-quinasa asociada a receptor, presente en células T y NK (*natural killer*) pero ausente en células B normales circulantes, que se encuentra sobre-expresada en pacientes con LLC progresiva. Esta quinasa puede modular la señalización a través del BCR, en

células LLC post-estimulación antigénica (Chen et al, 2002), actuando indirectamente en las vías de señalización que se activan en este proceso. La expresión de ZAP-70 puede determinar parcialmente la capacidad de respuesta de estas células a la estimulación antigénica mediante un aumento en la fosforilación de tirosinas y alteración del flujo de Ca^{2+} . Respecto al mecanismo/s involucrado/s en el impacto pronóstico adverso de su expresión en LLC, se sabe que las células ZAP-70+ poseen una capacidad aumentada de respuesta a señales inducidas por estimulación antigénica vía BCR, y en particular, la expresión de ZAP-70 y la estimulación sostenida del BCR han sido asociadas con una activación prolongada de las kinasas AKT (miembro de la familia de las Proteínas kinasas B) y ERK, eventos requeridos para la inducción de proteínas anti-apoptóticas como MCL-1 (*myeloid cell leukemia 1*), BCL-XL (*BCL-2 related gene*) y XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) (Chen et al, 2005; Gobessi et al, 2007; Dighiero and Hamblin, 2008; Dal-Bo et al, 2009). Recientemente se ha detectado una asociación entre altos niveles de expresión de ZAP-70 y CD27, lo que podría estar modificando la capacidad de adhesión y migración de las células LLC (Lafarge et al, 2015).

Por otra parte, las células de LLC en conjunto con las células estromales y de la matriz celular constituyen el “microambiente” de la LLC tanto en MO como en tejido linfoide. Este microambiente permisivo consta de componentes celulares como macrófagos, células T, o células dendríticas foliculares del estroma, que proveen estímulos para la activación de vías de señalización (Tsukada et al, 2002; Burger et al, 2009a; Caligaris-Cappio et al, 2014), mediante proteínas esenciales (quimiocinas, citoquinas, y factores angiogénicos) que interactúan con las células leucémicas a través de los receptores de superficie adecuados o moléculas de adhesión para sustentar la supervivencia y proliferación de células transformadas (Chiorazzi et al, 2005; Burger et al, 2009b; Reinart et al, 2013; Hallek et al, 2015; ten Hacken et al, 2015). La estimulación antigénica, a través del BCR, y la interacción con células accesorias y citoquinas en este microambiente específico serían un factor promotor importante en las etapas iniciales de la enfermedad (Ghia et al, 2008; Zenz et al, 2010; Burger et al, 2009b; Burger et al, 2011). Estas interacciones afectan la supervivencia y proliferación de las células leucémicas confiriendo resistencia a drogas, y posiblemente sean responsables de la enfermedad

residual post-tratamiento. A nivel histo-patológico, la LLC presenta focos de células proliferantes acumuladas en los pseudo-folículos (Caligaris-Cappio et al, 2003). Señales recibidas por contacto directo con otras células o por medio de factores solubles simultáneos o no a la activación del BCR, pueden estimular la proliferación y rescatar de la apoptosis al clon leucémico *in vitro* y probablemente *in vivo*. Estas estructuras incluyen tanto células T CD4+ como distintas células presentadoras de Ag (APC) (Ghia et al, 2002; Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004), lo que sugiere que algunos de los mecanismos requeridos para la expansión de células B normales post contacto antigénico en el CG también podrían estar operando en la patogénesis de la LLC. Aun así se desconocen los procesos involucrados en el desarrollo y mantenimiento de estos pseudo-folículos.

Dicho microambiente incluye numerosos componentes celulares y moleculares implicados en el desarrollo de la LLC, y que involucran diferentes mecanismos de interacción (Figura 5). Particularmente el contacto entre las células de LLC y las NLCs (*nurse like cells*) se establece y mantiene por los receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión expresadas por las células LLC y sus correspondientes ligandos en las NLC (Ysebaert et al, 2011; Filip et al, 2013). Las vías de supervivencia activadas por esta interacción incluye los ligandos CD38-CD31 (*cluster of differentiation*) (Deaglio et al, 2007) y los miembros de la familia TNF (*tumor necrosis factor*), tales como April (*proliferation-inducing ligand*) y BAFF (*B-cell activating factor*), que interactúan con sus receptores correspondientes (Nishio et al, 2005). La estimulación del BCR induce a su vez la secreción de quimiocinas CCL3 y CCL4 (*C-C motif ligand*) (Burger et al, 2009b), que reclutan células T y monocitos al microambiente tisular. Simultáneamente, la liberación extracelular de eNAMPT (*extracellular form of Nicotinamide phosphoribosyltransferase*) por las células de LLC promueve la liberación de citoquinas promotoras tumorales (IL-6, IL-8 [*IL: interleukin*]) e inmunosupresoras (IL-10) (Audrito et al, 2015). Por su parte, la NLC atrae células de LLC mediante la secreción de quimiocinas CXCL12 (*C-X-C motif ligand*) (Bleul et al, 1996; Vaisitti et al, 2010) y CXCL13 (Burkle et al, 2007; Heinig et al, 2014), que interactúan con sus receptores afines CXCR4 y CXCR5 (*C-X-C motif receptor*), los cuales se expresan en altos niveles

en células de LLC. Asimismo, la unión de CD40/CD40L (*Cluster of Differentiation/CD40 ligand*) favorece la supervivencia y proliferación de las células de LLC (Kitada et al, 1999; Ghia et al, 2002; Scielzo et al, 2011), y la interacción del ligando PD-L1 con PD-1 (*programmed cell death protein 1*), que se expresa en altos niveles en la superficie de las células T de pacientes con LLC, favoreciendo la evasión inmune por parte de las células de LLC de la citotoxicidad de células T (Ramsay et al, 2012; McClanahan et al, 2015).

Varios factores contribuyen a la reducción de la citotoxicidad de las células NK, incluyendo la baja expresión de los receptores activadores de células NK, tales como NKp30 (*natural killer cell p30-related protein*) (Reiners et al, 2013), liberación de BAFF soluble por las células NK (Wild et al, 2015), y liberación de BAG6 soluble por las células de LLC (Motta et al, 2005). La adhesión a las células estromales de la médula ósea (BMSC) es mediada por VCAM-1 (*vascular cell-adhesion molecule-1*) o FN (*fibronectin*) con las integrinas VLA-4 (*very late antigen-4*) en las células LLC (Burger et al, 2001), y la quimiotaxis hacia las BMSCs implica el contacto CXCR4-CXCL12 (Coelho et al, 2013). La intercomunicación entre las células LLC y las células dendríticas foliculares (FDC) es a través de CXCR5-CXCL13 y LT $\alpha\beta$ -LT β R (*lympho toxin/LT receptor*), y es esencial para el posicionamiento de las células LLC en los folículos linfoides y para la progresión leucémica *in vivo* (Heinig et al, 2014). Las células de LLC adicionalmente secretan ET-1 (*endothelin 1*), que interactúa con el receptor ETAR (*endothelin subtype A receptor*) en las células endoteliales y promueve la supervivencia y la resistencia a las drogas (Maffei et al, 2014; ten Hacken et al, 2015).

Otra de las características del linfocito B de la LLC es la expresión clonal de sus Igs, a través de un rearrreglo único de los genes *VH* y *VL*. Si bien no está totalmente claro el tipo de interacción entre el microambiente y las células leucémicas, una hipótesis sugeriría que las mismas son más eficientes en aquellos clones LLC con genes *IGHV-M*, que representarían variantes dependientes del microambiente, mientras que las formas NM serían variantes más estrictamente dependientes de las alteraciones genéticas

(Caligaris-Cappio, 2003; Zenz et al, 2010). En este contexto, la enzima AID, previamente mencionada, de importancia en la biología del linfocito B, e indispensable en los procesos de HMS y CI, se ha observado sobre-expresada en pacientes con LLC con genes *IGHV-NM* y con alta progresión tumoral (Oppezzo et al, 2003; McCarthy et al, 2003; Oppezzo et al, 2005; Huemer et al, 2014). Asimismo, datos recientes proponen otras dos funciones adicionales para AID de gran importancia en el área tumoral y de la inmunología: a) la capacidad de demetilar islas CpG a nivel del ADN genómico con la consecuente implicancia en la regulación génica (Agarwal and Daley, 2010; Popp et al, 2010; Chillemi et al, 2014); y b) su requerimiento para el control de células B auto-reactivas (Kuraoka et al, 2011; Meyers et al, 2011).

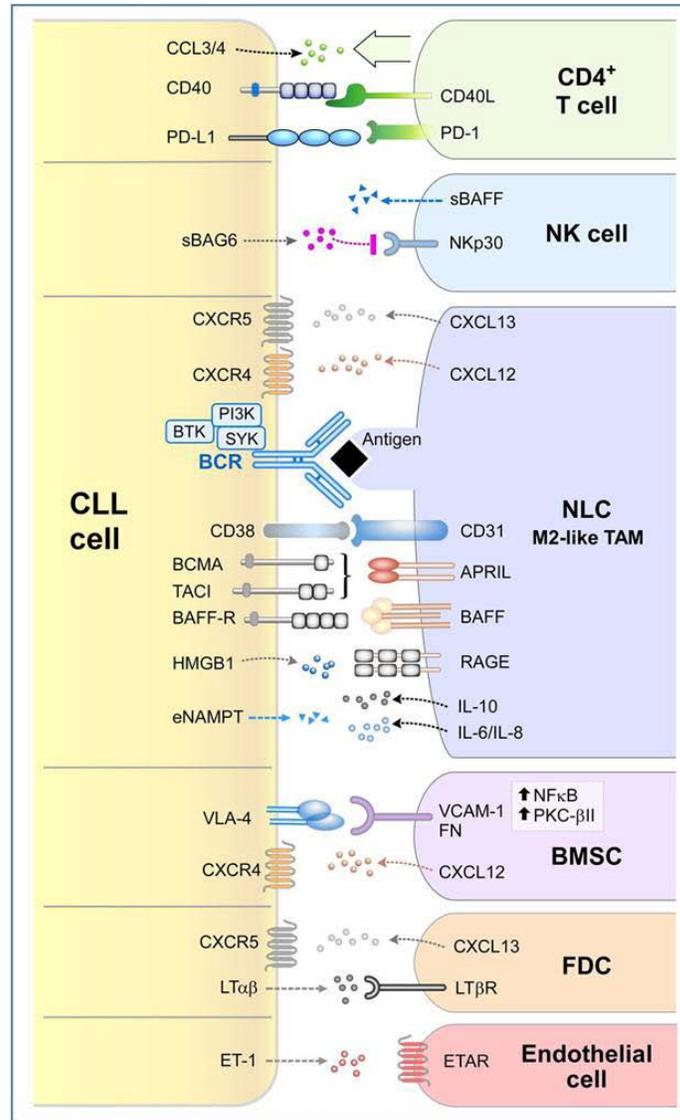


Figura 5. Componentes celulares y moleculares del microambiente de la LLC importantes para la supervivencia y proliferación de células leucémicas, migración y formación de pseudofoliculos. El contacto entre las células de LLC y las accesorias es establecido y mantenido a través de receptores de quemoquinas y moléculas de adhesión expresadas por las células leucémicas (Figura extraída de ten Hacken et al, 2015).

1.4. Factores pronóstico

Sabemos que la LLC se caracteriza por una gran heterogeneidad clínica, situación que ha motivado un gran interés en definir parámetros que permitan predecir el curso de

la enfermedad. Al presente existen diferentes factores pronóstico de esta patología que pueden dividirse en dos grandes grupos: clásicos y biológicos (Moreno and Montserrat, 2008).

Factores clásicos:

- Estadios clínicos
- Recuento de linfocitos en SP y morfología linfocitaria
- Tiempo de duplicación linfocitaria
- Patrón de compromiso de la MO

Actualmente contamos con dos sistemas de **estadificación clínica** aceptados para la LLC: el establecido por Rai et al (1975) y el creado por Binet et al (1981). El primero de ellos proponía originalmente cinco estadios (0, I, II, III, IV) basados en la presencia de linfocitosis, espleno- y hepatomegalia, niveles de hemoglobina (Hb) y recuento plaquetario, que fue reducido en 1987 a tres grupos de riesgo: bajo (estadio 0), intermedio (estadios I y II) y alto (estadios III y IV) (Rai and Sawitsky, 1987). Por su parte, el sistema de Binet distingue tres estadios (A, B, C) acorde al número de áreas linfoides involucradas y la presencia de anemia y/o trombocitopenia. Ambos sistemas se basan en exámenes físicos y pruebas de laboratorio estándar. En la Tabla 1 se detallan ambas clasificaciones así como la correlación entre las mismas.

Tabla 1. Cuadro comparativo de los estadios clínicos de Rai y Binet.

Estadio Rai (1987)	Grupos de riesgo	Características Clínicas	SV (años)	Estadio Binet (1981)	Características Clínicas	SV (años)
0	Bajo	Linfocitosis en SP y MO	>10	A	Hb ≥ 10 g/dL; Pq ≥ 100 x 10 ⁹ /L; y hasta 2 áreas involucradas*	12
I II	Intermedio	Linfocitosis + Linfadenop. + Esplenomeg. y/o hepatomegalia	5	B	Hb ≥ 10 g/dL; Pq ≥ 100 x 10 ⁹ /L; y 3 o más áreas involucradas*	7
III IV	Alto	Linfocitosis + Anemia + Trombocitopenia	1,5	C	Hb < 10 g/dL; y/o Pq < 100 x 10 ⁹ /L	2

*Áreas involucradas: nódulos linfáticos cervicales, axilares e inguinales, bazo e hígado; Hb: hemoglobina; SP: sangre periférica; MO: médula ósea; SV: sobrevida; Linfocitosis: recuento de linfocitos >5x10⁹/L; Anemia: niveles de Hb < 11 g/dL; Trombocitopenia: recuento de plaquetas (Pq) < 100x10⁹/L; Linfadenop: linfadenopatía; Esplenomeg: esplenomegalia.

Los estadios clínicos de Rai/Binet siguen siendo uno de los principales parámetros a considerar como factor pronóstico ya que no sólo identifican pacientes que deben iniciar tratamiento sino que también estiman la sobrevida (SV) de los mismos. No obstante, no resultan suficientes para predecir la evolución de la enfermedad en estadios iniciales.

Desde el punto de vista **morfológico**, actualmente se consideran dos subtipos de LLC: *típica* (>90% de linfocitos de tamaño pequeño y mediano, cromatina compacta, ausencia de nucléolo y citoplasma escaso); y *atípica* (>10% de prolinfocitos o >15% de células plasmocitoides) con estadios clínicos más avanzados y menor sobrevida libre de tratamiento (SLT) (Müller-Hermelink et al, 2008). Otro aspecto característico pero no patognomónico de la LLC es la presencia de sombras de Gümprrecht, consecuencia de la

ruptura de las células neoplásicas, anormalmente frágiles al realizar el frotis de sangre periférica (Hallek, 2015). Respecto a la proliferación linfocitaria, el método mayormente utilizado para su evaluación es el análisis del **tiempo de duplicación linfocitaria** (TDL), definido como el tiempo necesario para duplicar la cantidad de linfocitos en SP. Este parámetro es independiente del estadio clínico, posee valor pronóstico por sí mismo y puede indicar inicio de tratamiento. Mientras que un TDL ≤ 12 meses identifica pacientes con mal pronóstico, un valor de TDL > 12 meses se asocia con un pronóstico favorable con mayor SLT (Montserrat et al, 1986; Molica et al, 1990; Molica and Alberti, 1987; Hallek, 2008; Nabhan et al, 2015). Su principal desventaja es la de ser un dato retrospectivo, pudiendo demorar la decisión de iniciar tratamiento en pacientes con enfermedad agresiva.

Por otra parte, el análisis histológico de la **biopsia de MO** en la LLC, si bien no es necesario para definir el diagnóstico, permite evaluar el patrón de infiltración, su extensión y analizar el tejido hematopoyético, parámetros de importancia pronóstica (Hallek et al, 2008). La presencia de un patrón difuso, sólido, que reemplaza al tejido hematopoyético y adiposo se asocia con citopenias y corresponde a un estadio clínico avanzado (Viswanatha et al, 2011). Cuando ocurre compromiso de la MO este suele ser importante, con $\geq 30\%$ de las células de origen linfoide (Bezares et al, 2009; García - Muñoz et al, 2012). Según el patrón de infiltración se pueden evidenciar dos subgrupos: los pacientes con infiltración *difusa* presentan una SV media de 2-4 años, mientras que en aquellos con patrón *no difuso* la SV es de 8-10 años.

Factores biológicos:

En cuanto a los factores biológicos, los mismos comprenden una variedad de determinaciones que permiten definir con mayor precisión la evolución clínica de los pacientes, entre ellos resulta de interés mencionar:

- Marcadores séricos: CD23_s (*CD23 soluble*), β_2 M (*β_2 -microglobulina*), TK (*timidina-quinasa*)

- Expresión de ZAP-70 y CD38
- Mutaciones en IGHV
- Alteraciones genómicas: citogenética convencional y FISH (Fluorescence in situ hybridization)
- Longitud telomérica y actividad telomerasa

1.4.1. Marcadores séricos

El uso de **marcadores séricos** como factores pronóstico puede predecir SV global o SLT. El **CD23**, es un fragmento del antígeno de membrana con función de citoquina, funcionalmente relevante en la LLC pero con valor pronóstico no del todo definido. Los niveles de CD23s tendrían implicancias en la SV global y SLT en estadios tempranos de la enfermedad, encontrándose altos niveles asociados a mayor actividad tumoral, infiltración medular difusa, TDL<12 meses y progresión (Seiler et al, 2006). Un trabajo reciente (Kriston et al, 2015) demostró la existencia de dos isotipos de CD23: CD23a y CD23b, cuya única diferencia estructural serían seis aminoácidos en la proteína. El isotipo `a` tendría un rol en la supervivencia celular, rescatando a las células de la apoptosis inducida por hidrocortisona; en tanto que el isotipo `b` estaría más involucrado en el aumento de la proliferación, participando posiblemente en el pasaje de G0 a G1/S. Los casos en los que los pacientes expresan mayores niveles del isotipo `a` que del isotipo `b` podrían ser de mejor pronóstico (Fournier et al, 1994; Fournier et al, 1995).

La **β_2M** es una proteína extracelular que se une en forma no covalente al Complejo Mayor de Histo-compatibilidad de clase I. Sus niveles en suero tendrían valor pronóstico, sobre todo en estadios tempranos de la enfermedad, e incluso serían predictivos de respuesta a tratamiento (Knauf et al, 1997; Keating et al, 1998; Shvidel et al, 2015; Strati and Shanafelt, 2015). La enzima **TK** participa en la síntesis de ADN y refleja la capacidad de división celular, encontrándose presente en células en división y ausente en células en reposo. Sus niveles en suero serían un importante marcador de actividad proliferante, capaz de detectar pacientes en riesgo de rápida progresión, sobre todo en estadios tempranos. Algunos trabajos utilizan su valor pronóstico en combinación con

otros parámetros para definir pacientes en estadios iniciales como candidatos para iniciar tratamiento, no habiéndose reportado resultados definitivos (Hallek et al, 1999; Magnac et al, 2003). De todas maneras, en la gran mayoría de los casos, ninguno de estos parámetros son concluyentes al momento de considerar una estrategia terapéutica.

1.4.2. Expresión de ZAP-70 y CD38

Como se mencionó previamente, la tirosina-quinasa **ZAP-70** participa en la transducción de señales generadas a través del BCR, permitiendo la supervivencia y/o proliferación del clon neoplásico (Nolz et al, 2005; Chen et al, 2008a). Diferentes estudios retrospectivos en pacientes con LLC mostraron asociación del aumento de expresión de *ZAP-70* y la ausencia de mutaciones en los genes *IGHV*, relacionado con un pronóstico desfavorable (Rosenwald et al, 2001; Crespo et al, 2003; Krober et al, 2006). No obstante, los estudios multivariados no permitieron ubicar a *ZAP-70* como un predictor independiente de supervivencia (Pflug et al, 2014). Al presente, si bien ha habido acuerdo casi universal sobre el significado pronóstico de *ZAP-70*, existe poco consenso sobre el mejor método de detección y dificultades en la reproducibilidad del ensayo entre laboratorios (Nabhan et al, 2015).

CD38 es una proteína transmembrana con un peso molecular de 45 kDa, que actúa tanto como una enzima de superficie y como receptor, mediante la unión a su ligando CD31, induciendo señales de activación y diferenciación en linfocitos T, B y células NK (Ibrahim et al, 2003). Esta proteína marca activación y maduración celular y participa en la señalización. Se asocia a morfología linfocitaria atípica, infiltración medular no difusa, elevada linfocitosis en SP, grupos de riesgo por FISH, altos niveles de β_2M y pronóstico adverso, con rápida progresión de la enfermedad y corta expectativa de vida (Ibrahim et al, 2001; Chevallier et al, 2002; Thornton et al, 2004; ten Hacken, 2015). Diferentes estudios analizaron la correlación entre CD38 y el estatus mutacional de *IGHV*, observándose discordancias, probablemente relacionadas con la variación en su expresión a lo largo del curso clínico (Damle et al, 1999; Hamblin et al, 1999; Hamblin et al, 2008).

Si bien la función de CD38 continúa siendo estudiada, diferentes autores (Damle et al, 1999; Hamblin et al, 2002) han sugerido que esta proteína jugaría un papel importante en rescatar a las células B maduras de la apoptosis, además de promover la supervivencia y proliferación de las mismas (Damle et al, 1999; Malavasi et al, 2011). Aunque existen controversias respecto de la determinación del punto de corte por citometría de flujo (entre 7-30%) (Montillo et al, 2005; Moreno and Montserrat, 2008; Boonstra et al, 2006), la mayoría de los autores están de acuerdo en que una proporción mayor que el 30% de las células de LLC que expresan CD38 indica un pronóstico desfavorable con tasas inferiores de respuesta a la terapia, menor tiempo desde el diagnóstico hasta el inicio del tratamiento y corta supervivencia global (Ibrahim et al, 2003; Nabhan et al, 2015). Actualmente este parámetro es considerado un factor de valor pronóstico independiente aunque presenta la desventaja de su variación a lo largo de la enfermedad.

1.4.3. Mutaciones de *IGHV*

La presencia de mutaciones en los genes *IGHV* es considerada uno de los principales factores pronóstico en la biología de la LLC, sobre todo en estadios tempranos. Dos grupos (Damle et al, 1999; Hamblin et al, 1999) demostraron independientemente que el nivel de mutaciones presentes en los genes *VH* permite dividir a la LLC en dos grandes grupos acorde al porcentaje de homología respecto de la línea germinal. Aquellos casos con $\geq 98\%$ de homología son considerados NM, se asocian con peor evolución clínica, estadios avanzados, morfología atípica, rearrreglos genómicos de mal pronóstico, evolución clonal y resistencia al tratamiento; mientras que los pacientes con homología $< 98\%$ son considerados M y presentan, en términos generales, mejor pronóstico (Damle et al, 1999; Hamblin et al, 1999).

Sabemos que la respuesta a la estimulación antigénica es mediada por el BCR tanto de células B normales como leucémicas. Cada una de ellas posee un BCR diferente formado por la combinación de los segmentos V, de diversidad (D) y de unión (J; *joining*) para la cadena pesada (H), y de los segmentos V y J para la cadena liviana (L).

Además de la diversidad generada por la unión de los mismos, la introducción de mutaciones somáticas a través del proceso de HMS en el CG, genera una gran variedad en el repertorio de BCRs. Estas regiones reciben el nombre de CDRs (*complementarity determining regions*), siendo la tercera región hipervariable en la cadena pesada (HCDR3) la de mayor importancia en la generación de diversidad y especificidad antigénica en las Igs (Pristch et al, 1999) (Figura 6A). Aunque se sabe mucho menos de los genes de la cadena liviana en la LLC, los datos disponibles indican que el ensamblaje de las cadenas pesada y liviana de las Ig en las células B maligna de la LLC es estocástico y también que las cadenas livianas pueden tener un papel complementario significativo en el reconocimiento del antígeno por los BCRs clonotípicos (Hadzidimitriou et al, 2009).

El locus de *IGH@* se encuentra localizado a nivel de 14q32.33, en un área aproximada de 1250Kb, y contiene los diferentes segmentos VH, DH y JH, sujetos a reordenamientos en el proceso de desarrollo y diferenciación linfoide. Existen entre 123 y 129 segmentos *VH*, 26 segmentos *DH* y 6 segmentos *JH* organizados en sentido 5'→3' desde el telómero hacia la región centromérica (Lefranc, 2001) (Figura 6B). Entre ellos, existen 42-55 segmentos *VH* capaces de producir rearrreglos funcionales, agrupados en 7 familias (*VH1-VH7*) (Figura 7). La familia *VH3* es la más extensa seguida de *VH4* y *VH1*, con 64, 32 y 19 miembros, respectivamente. Por el contrario, las familias *VH2* (4 miembros), *VH5* (2), *VH6* y *VH7* (1 cada una) (Duke et al, 2003), son de tamaño reducido. A su vez, en células B normales, los segmentos más frecuentemente utilizados en los diferentes rearrreglos son los pertenecientes a las familias *VH3* (30-50%), *VH4* (20-30%) y *VH1* (10-20%) (Pritsch et al, 1999; Duke et al, 2003; Ghia et al, 2005; Mauerer et al, 2005).

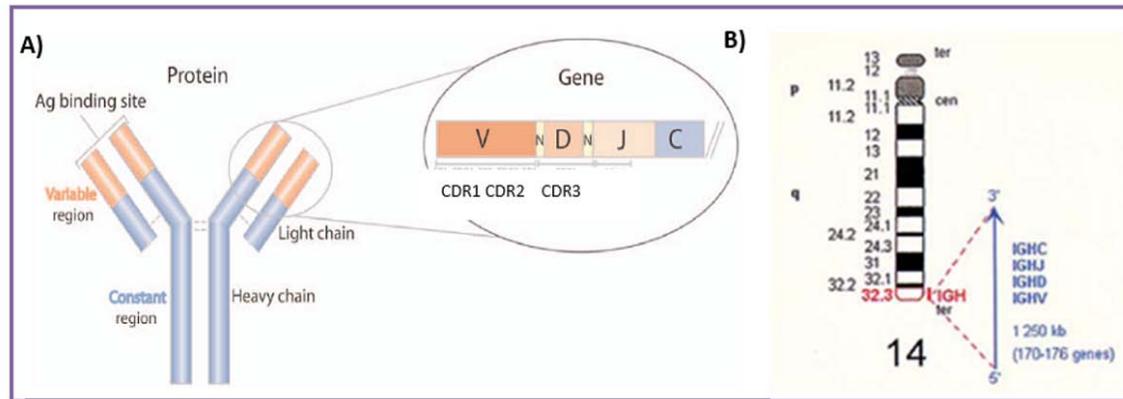


Figura 6. A) Estructura de una molécula de inmunoglobulina (Ig), compuesta por dos cadenas polipeptídicas idénticas pesadas (*H*; *heavy*) y dos livianas (*L*; *light*). Los primeros 110aa aproximadamente, constituyen la región variable (V) requerida para el reconocimiento antigénico. La región constante (C) posee actividad biológica. Se muestra la estructura génica codificante de la región VH. Las regiones CDRs (*complementarity-determining regions*) poseen la mayor diversidad, involucradas en el reconocimiento antigénico, siendo la región HCDR3 la de mayor variabilidad. D (*diversity*); J (*joining*) (adaptado de Walsh and Rosenquist, 2005). **B)** Localización cromosómica del locus IGH@ humano en el brazo largo del cromosoma 14 (14q32.33). Dicho locus contiene los diferentes segmentos VH, DH, JH y segmentos constantes (C), con un total de 170-176 genes en un área aproximada de 1250Kb. El repertorio funcional es de aproximadamente 76-84 genes por genoma haploide (Lefranc, 2001).

En particular, el repertorio *IGHV* encontrado en LLC es sesgado, siendo los genes pertenecientes a las familias *VH3*, *VH1* y *VH4* los más frecuentemente hallados en los pacientes. A su vez, se ha visto que las mutaciones somáticas no se distribuyen de manera uniforme entre las diferentes familias, observándose mayor proporción de *VH3* y *VH4* entre los casos M y de *VH1* entre los NM (Fais et al, 1998; Maurer et al, 2005). Esta jerarquía en el uso de las diferentes familias puede reflejar diferencias en el tipo de Ag involucrado en la transformación leucémica y/o en el estadio de maduración en el cual se llevó a cabo la misma (Stilgenbauer et al, 2002). Asimismo, además de la sobre-representación de *VH3* y *VH4* entre los casos M y de *VH1* en los NM, existen diferencias entre ambos subgrupos en el uso de los segmentos *JH* y *DH*, así como en la estructura de la región HCDR3, particularmente en su longitud. Diferentes trabajos han observado la presencia de rearrreglos IGH e IGL específicos y no al azar en LLC tanto M como NM, los cuales poseían BCRs con secuencias HCDR3 casi idénticas (“*estereotipadas*”) (Ghiotto et al, 2004; Widhopf et al, 2004; Messmer et al, 2004; Tobin et al, 2004;

Stamatopoulos et al, 2007). La expresión de estos receptores estereotipados ha sido reportada el 20%-30% de los pacientes con LLC, más frecuentemente en casos con *IGHV* NM (Messmer et al, 2004; Stamatopoulos et al, 2007), considerándose actualmente que podrían tener importancia a nivel clínico, pudiendo mejorar la estadificación de los pacientes.

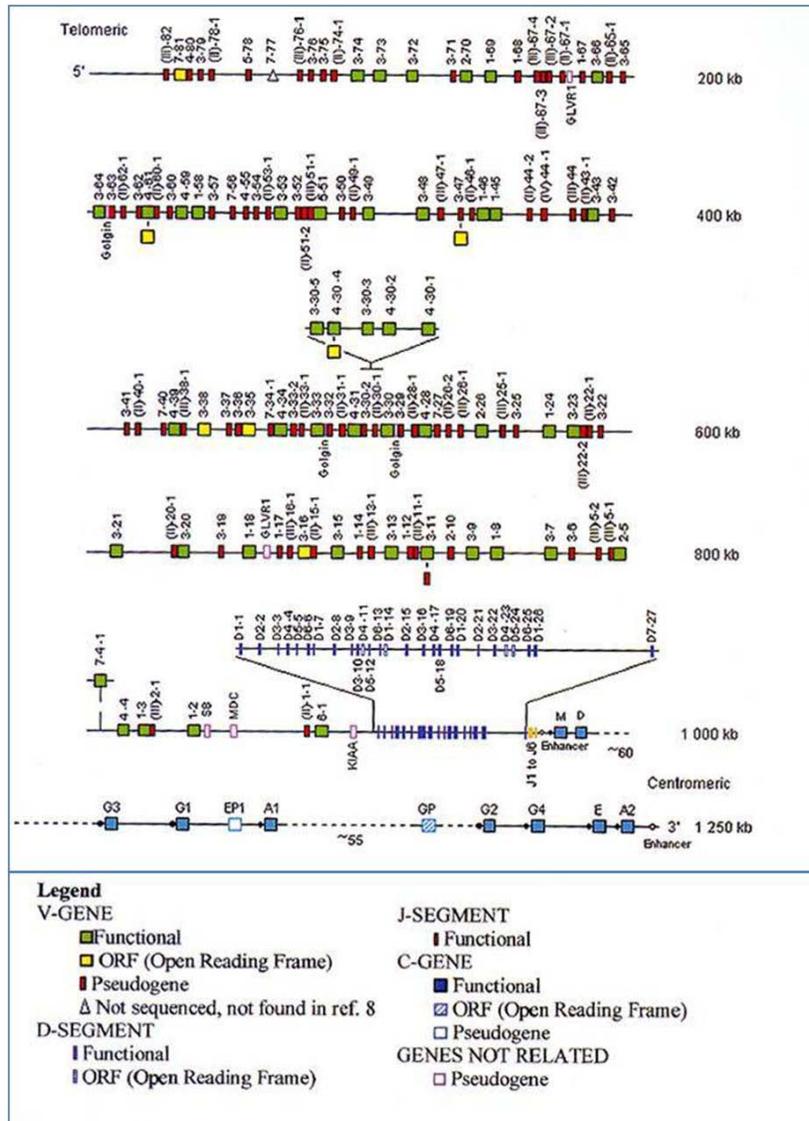


Figura 7. Representación del locus *IGH@* humano en 14q32.33, mostrando los diferentes segmentos de cada familia VH. Los números romanos designan pseudo-genes, no asignados a subgrupos de genes funcionales (Lefranc, 2001).

1.4.4. Alteraciones genéticas

Otro de los factores biológicos importantes es el análisis de las **alteraciones genéticas**. En la LLC, su estudio se ha visto dificultado por el bajo índice mitótico *in vitro* de las células leucémicas y la baja calidad de las metafases en cultivo, aún en presencia de mitógenos específicos. En los últimos años se han incorporado nuevas metodologías, que incluyen el empleo de oligonucleótidos CpG (CpG-ODN) e interleukina-2 (IL-2) (CpG-ODN/IL-2) y la estimulación con CD40L, que han hecho factible incrementar el número de metafases y el porcentaje de pacientes con alteraciones cromosómicas (Dicker et al, 2006; Mayr et al, 2006). Si bien esta patología, a diferencia de otras neoplasias linfoides a células B, no se encuentra asociada a translocaciones específicas, diferentes estudios han encontrado relación entre rearrreglos estructurales y/o cariotipos complejos con progresión de la enfermedad, menor SLT y baja respuesta al tratamiento (Mayr et al, 2006; Shanafelt et al, 2006; Van Den Neste et al, 2007; Rigolin et al, 2012; Travella et al, 2013; Rigolin G, et al, 2015). Durante largo tiempo, la LLC fue considerada una enfermedad genéticamente estable, sin embargo, trabajos posteriores han mostrado la presencia de evolución clonal en el 10-20% de los pacientes, fenómeno que se caracteriza por la aparición de nuevas alteraciones citogenéticas y se asocia a un curso clínico agresivo (Chena et al, 2002; Shanafelt et al, 2006; Stilgenbauer et al, 2007; Berkova et al, 2009; Cavazzini et al, 2012; Janssens et al, 2012).

La introducción de la técnica de FISH como complemento de la citogenética convencional ha permitido mejorar la detección de rearrreglos genómicos clonales en esta patología así como evaluar su importancia como factores de valor pronóstico independiente. La misma combina la citogenética con la resolución de los métodos de biología molecular. La utilización de la técnica de FISH ha tenido un gran impacto en el estudio de la LLC mejorando notablemente la detección de alteraciones, e incrementando al 82% el porcentaje de casos con rearrreglos genómicos (Döhner et al, 2000). Esta metodología posee la ventaja de detectar la presencia de alteraciones genéticas tanto en metafases como sobre núcleos interfásicos (citogenética de interfase) no siendo necesaria una población celular en división activa, presentando un alto nivel de resolución y

sensibilidad. A su vez, la posibilidad de analizar núcleos interfásicos, hace factible la determinación precisa de alteraciones clonales en un gran número de células, posibilitando la evaluación de la verdadera incidencia de las mismas. El empleo de diferentes tipos de sondas permite la identificación de alteraciones cromosómicas de difícil interpretación, así como deleciones y amplificaciones génicas (Popescu and Zimonjic, 1997). Estos estudios mostraron como anomalía más frecuente la deleción 13q14, seguida de la trisomía 12, deleciones de 11q22, lugar donde mapea el gen *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*), 17p13, donde se localiza el gen *TP53* (*Tumor protein p53*), y alteraciones estructurales de 6q y 14q32, observándose un 18-20% de casos sin alteraciones. Estas anomalías fueron asimismo asociadas a diferentes características morfológicas y evolución clínica, estableciéndose un modelo jerárquico de riesgo citogenético donde las deleciones 17p y 11q constituyen las alteraciones de mayor agresividad y la deleción 13q como única anomalía, tiene el mejor pronóstico. En la Tabla 2 se detallan las alteraciones más comunes en LLC, su frecuencia e implicancia clínica.

Tabla 2. Frecuencia y significado clínico de los rearrreglos genómicos más comunes en LLC

Anomalía	Frecuencia (%)	Características clínicas y evolución
Deleción 13q	35-60	Morfología típica, pronóstico favorable si es única anomalía
Trisomía 12	15-25	Morfología atípica, pronóstico intermedio
Deleción 11q	10-20	Adenopatías extensas, pronóstico desfavorable con corta SV y SLT
Deleción 17p	4-10	Morfología atípica, frecuente resistencia a quimioterapia, pronóstico desfavorable con corta SV y SLT
Deleción 6q	4-6	Morfología atípica, evolución clínica poco definida
Translocaciones 14q32	2-4	Morfología atípica, pronóstico desfavorable
Cariotipo normal	18-20	Pronóstico favorable
Anomalías varias	8	Evolución clínica variable

Los porcentajes abarcan diferentes estudios de citogenética y FISH. SV: sobrevida; SLT: sobrevida libre de tratamiento (Adaptado de Montillo et al, 2005).

Estudios más recientes mediante secuenciación de nueva generación reportan la presencia de un amplio espectro de mutaciones en LLC, reflejando la heterogeneidad tanto clínica como biológica de esta patología (Landau and Wu, 2013; Jethwa et al, 2013; Sutton et al, 2015). Entre ellas encontramos las que involucran los genes: *NOTCH1* (*Notch homolog 1, translocation associated*), *MYD88* (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), *TP53*, *ATM*, *SF3B1* (*splicing factor 3B subunit 1*), *POT1* (*Protection of telomeres protein 1*), *CHD2* (*Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2*), *BIRC3*

(*baculoviral IAP repeat-containing protein 3*), entre otros (Quesada et al, 2011; Puente et al, 2011; Braggio et al, 2012; Landau and Wu, 2013; Jethwa et al, 2013; Sutton et al, 2015; Strati and Shanafelt, 2015; ten Hacken et al, 2015). Se ha observado que la frecuencia de estas mutaciones es baja al diagnóstico (5-10% de los casos) (Foà et al, 2013) y aumenta progresivamente con la evolución de la enfermedad ampliando el espectro de los eventos genéticos asociados a la evolución clonal (Rossi et al, 2013), llegando al 15-20% al momento de la recaída y alrededor del 30% en la transformación a Síndrome de Richter (Rossi et al, 2009). Estudios retrospectivos han detectado genes desregulados incluso 10 años antes del diagnóstico de LLC (Chadeau-Hyam et al, 2014), indicando la importancia de estas anomalías en la leucemogénesis.

Finalmente, resulta importante mencionar metodologías complejas que permiten delinear aspectos más específicos de esta patología. Entre ellas, los estudios empleando *arrays* de genoma completo y técnicas de secuenciación WGS (*whole genome sequencing*) y WES (*whole exome sequencing*), han mostrado que la presencia de CNAs (*copy number alterations*) (deleciones o amplificaciones de material génico) o de disomía uniparental, así como el número de CNAs en el genoma, se correlacionan con la progresión de la enfermedad, evolución clonal y enfermedad refractaria (Gunnarsson et al, 2011; Ouillette et al, 2011), siendo de esperar que los avances en las técnicas genómicas permitan, en un futuro próximo, identificar marcadores genéticos cuya presencia pueda orientar en forma más específica la elección del tratamiento (Clifford and Schuh, 2012).

1.4.5 Telómeros y actividad de telomerasa

1.4.5.1 Telómeros

Hace más de 70 años Muller y McClintock establecieron que los extremos de los cromosomas eucariotas poseían una estructura especial necesaria para mantener la integridad de los cromosomas, a los que llamaron ‘telómeros’ (Muller, 1938; McClintock, 1941). Pocos años después, McClintock demostró que los mismos cumplen una función esencial protegiendo la fusión de los extremos de los cromosomas. Décadas más tarde, diferentes técnicas moleculares revelaron que los extremos de los cromosomas consistían en repeticiones ricas en guanina (Blackburn and Gall, 1978). Actualmente se sabe que los telómeros son regiones de ADN no codificante ubicadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos, que se encuentran constituidas por secuencias de ADN altamente conservadas, repetidas en tándem (TTAGGG)_n, orientadas en sentido 5' a 3' hacia el extremo cromosómico (Figura 8). Se encuentran asociados a proteínas específicas y a RNAs no codificantes llamados TERRA (*Telomeric repeat-containing RNA*) que son parte integral de la heterocromatina telomérica. Presentan una estructura característica que previene la fusión y degradación cromosómica, cumpliendo así un rol fundamental en la protección del ADN codificante de la acción de enzimas degradativas y del estrés oxidativo, evitando la pérdida de genes importantes para la vida de la célula y contribuyendo al mantenimiento de la estabilidad cromosómica (Moyzis et al, 1988; Sawyer et al, 1998; Azzalin et al, 2008; Sfeir and de Lang, 2012). También ejercen efectos sobre la transcripción de genes situados en regiones sub-teloméricas (*telomere position effect*) e interactúan con los mecanismos regulatorios del ciclo celular. A su vez participan en la preservación de la integridad y la estabilidad de los cromosomas y median importantes interacciones entre ellos y la matriz nuclear, participando en la localización de los mismos en el núcleo, el apareamiento de los cromosomas homólogos y su migración durante la división celular. La presencia de telómeros funcionales permite una correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis e impide las fusiones de los extremos terminales, constituyendo un factor crítico en la supervivencia celular (Counter et al, 1992; Doheny et al, 2008; Sfeir and de Lang, 2012; Mengual Gomez et al, 2014).

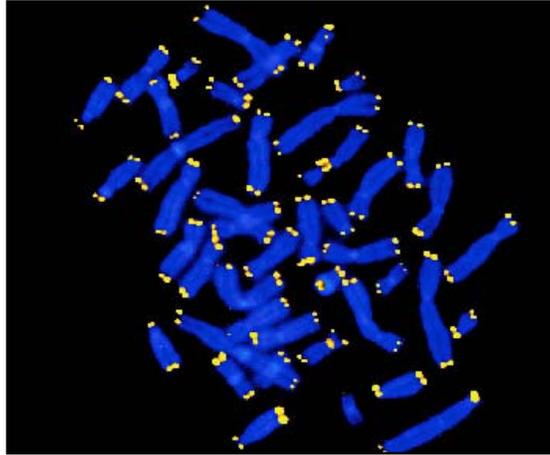


Figura 8. Imagen de cromosomas en metafase mostrando la ubicación de los telómeros (amarillo) mediante FISH.

A nivel estructural, el ADN telomérico consta de una región de doble cadena (formada por la repetición en tándem de la secuencia telomérica “TTAGGG/AATCCC”) y una zona, en el extremo 3’, que carece de la hebra complementaria. Las dos hebras del telómero son asimétricas en cuanto a composición y tamaño, siendo la hebra del extremo 3’ rica en G y la hebra del extremo 5’ rica en C. En los seres humanos y otros vertebrados, los telómeros poseen entre 9-15 kb de repeticiones TTAGGG de doble cadena, seguido por una hebra de simple cadena de 50-300 nucleótidos rica en G (Figura 9A) (van Steensel et al, 1998; Farr et al, 1991; O’Sullivan and Karlseder, 2010; Robles-Espinoza et al, 2015). Asimismo, forman una estructura secundaria en forma de bucle, llamados *loop* de los telómeros, o *T-loop*, que protege el extremo terminal de los cromosomas (Figura 9 B). En ella, el extremo 3’ simple cadena invade la región de ADN doble cadena y se complementa con la zona rica en C, dando lugar a una estructura de triple hebra denominada *loop* de desplazamiento o *D-loop* (Zvereva et al, 2010; Mengual Gomez et al, 2014). Esta estructura se encuentra estabilizada por proteínas específicas de unión al ADN telomérico.

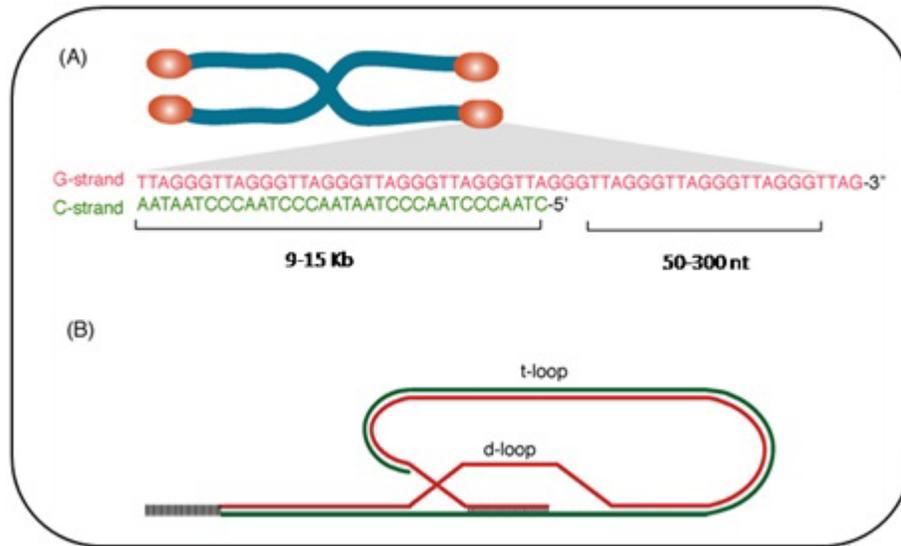


Figura 9. Esquema de la estructura telomérica. **A)** Secuencia doble cadena, donde la cadena roja es la rica en guaninas (con su región simple cadena) y la cadena verde es rica en citocinas, con las respectivas longitudes promedio. **B)** Formación del *t-loop* y *d-loop*, con la región simple cadena protegida (Modificado Denchi, 2009).

Estas estructuras se han observado también en células de ratón, plantas y algunas levaduras (de Lange *et al*, 2004; Raices *et al*, 2008), sugiriéndose una participación muy importante de las mismas en la protección de los extremos teloméricos, distinguiendo a estos de roturas en el ADN que necesitan ser reparadas por la maquinaria de reparación del daño al ADN (nucleasas de ADN y enzimas de procesamiento) (Figura 10), cuya activación puede determinar disfunción telomérica e inestabilidad genómica.

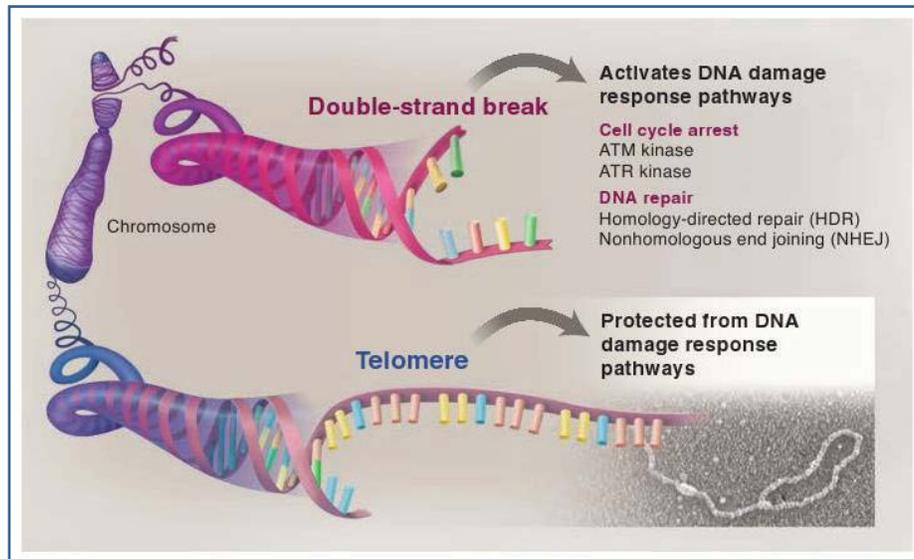


Figura 10. Comparación entre la hebra simple producida por ruptura de la doble cadena de ADN y la hebra simple del telómero. Ante una ruptura cromosómica se pueden activar dos vías de señalización (vía de quinasas ATM o ATR), que arrestan el ciclo de división y pueden inducir la muerte celular. Los cromosomas rotos son generalmente reparados por dos posibles vías de reparación del ADN (NHEJ [*non-homologous end-joining*] y HDR [*homology-directed repair*]), permitiendo a la célula continuar con sus divisiones con un genoma intacto. Si la maquinaria de reparación de daño actuara sobre los telómeros traería consecuencias desfavorables en la estabilidad genómica. Los mamíferos resuelven este problema de la protección de sus extremos teloméricos a través del uso del complejo *shelterin* y una estructura alterada (*t-loop*) que juntos aseguran que las cuatro vías permanezcan bloqueadas (de Lange et al, 2009).

Además el extremo 3' extendido rico en G del telómero puede formar estructuras alternativas, complejas, llamadas G-cuádruplex. Las mismas adoptan diferentes conformaciones, y se mantienen unidas por planos cuadrados de cuatro guaninas que interactúan mediante la formación de puentes de hidrógeno. La formación de tales estructuras puede dificultar la replicación del ADN y el mantenimiento de los telómeros por parte de la enzima telomerasa (Zvereva et al, 2010; Hansel et al, 2011; Mengual Gomez et al, 2014; Robles-Espinoza et al, 2015)

1.4.5.2 Acortamiento telomérico

Durante la síntesis de ADN se produce una replicación incompleta en la cadena que se sintetiza en forma discontinua, generando pérdidas progresivas de secuencias teloméricas durante las sucesivas divisiones celulares, lo que determina el acortamiento de los telómeros (Sawyer *et al*, 1998; Fitzpatrick *et al*, 2007; Codd *et al*, 2010). Este proceso es debido a la imposibilidad de la ADN polimerasa de completar la síntesis del extremo 5' terminal, denominado 'problema de replicación de los extremos' (*end replication problem*). Datos de la literatura muestran una disminución de 25-200 pares de base (pb) con cada duplicación de la población celular *in vitro* y entre 20 y 40 pb por año *in vivo* (Fitzpatrick *et al*, 2007; Codd *et al*, 2010). En individuos normales se observa una longitud telomérica (LT) de entre 12000 a 14000 pb al momento del nacimiento, alrededor de 10000 pb en adultos jóvenes y entre 5000 a 7000 pb en mayores de 70 años (Shay *et al*, 1996), con una considerable variación inter-individual y baja variación intra-individual en los diferentes tejidos (Okuda *et al*, 2002; Wilson *et al*, 2008; Walsh *et al*, 2015).

De este modo, los telómeros limitan la cantidad de veces que una célula se puede dividir, ya que la proliferación celular se frena cuando la longitud de los mismos alcanza un valor crítico que puede llevar a la muerte celular y, consecuentemente, a la degeneración tisular relacionada con el envejecimiento (Brown *et al*, 1997; Jacob *et al*, 2003; Robles-Espinoza *et al*, 2015). Estas observaciones llevaron a considerar que la LT serviría como un "reloj mitótico" que permitiría la salida del ciclo celular cuando los telómeros llegan a un tamaño críticamente corto, definido como límite de Hayflick (1965) o estado de mortalidad 1 (M1) punto donde se produce la senescencia replicativa (Figura 11). No obstante, mutaciones en genes relacionados con el control del ciclo celular, como *TP53* y *RBI*, pueden permitirle a las células de una población clonal escapar de la senescencia y seguir proliferando, causando pérdidas teloméricas continuas, inestabilidad cromosómica y asociaciones teloméricas. Dichas células entran en una segunda etapa denominada crisis o estado de mortalidad 2 (M2) con telómeros críticamente cortos (~3kb), en la que la mayor parte morirá por apoptosis, pero una pequeña sub-población

con alteraciones genómicas puede sobrevivir por reactivación de la producción de telomerasa, con la consecuente estabilización de sus telómeros, llevando a una proliferación indefinida y adquisición de un fenotipo inmortal (Counter et al, 1992; Mengual Gomez et al, 2014).

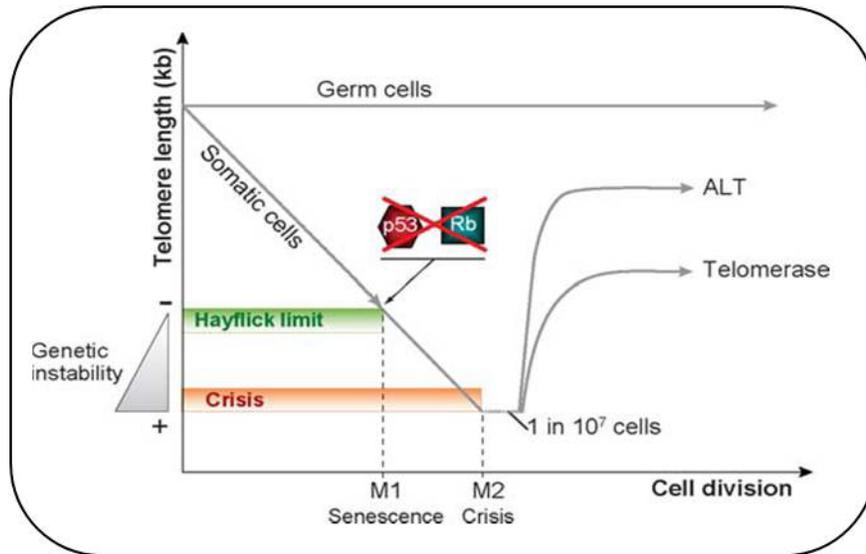


Figura 11. Esquema del ensayo de Hayflick. La LT se acorta hasta alcanzar el punto límite de Hayflick en el que algunas células ingresan en senescencia, en tanto que otras por medio de la inactivación de p53 y Rb continúan dividiéndose, con aumento de inestabilidad genética y mayor acortamiento telomérico. En el punto de crisis, los telómeros no son capaces de proteger los extremos cromosómicos, produciéndose fusiones teloméricas y muerte celular por apoptosis. Algunas células continúan proliferando, manteniendo estable la LT a través de la activación de la enzima telomerasa o por el mecanismo alternativo (ALT) (Stewart et al, 2006).

1.4.5.3 Telomerasa y proteínas teloméricas

La telomerasa es una enzima transcriptasa reversa que se encuentra constituida por una subunidad catalítica *hTERT* (*human-Telomerase Reverse Transcriptase*) que presenta actividad de transcriptasa reversa, una subunidad genómica *hTR* o *hTERC* (*human Telomerase RNA Component*) que provee el molde para la adición de nuevas repeticiones teloméricas al extremo 3' simple cadena, y proteínas estabilizadoras (Figura 12). En

humanos, el gen que codifica para *hTERT* se localiza sobre el brazo corto del cromosoma 5 (5p15.33) y tiene una longitud de 41923 bases, en tanto que *hTR* se ubica sobre brazo largo del cromosoma 3 (3q26.2), con una extensión de 541 bases. La telomerasa sintetiza las secuencias repetitivas de ADN características de los telómeros, estabilizando la longitud de los mismos y manteniendo su integridad. Su mecanismo de acción se basa en la unión por complementariedad de bases de la subunidad hTR a la región telomérica simple cadena, seguido de una elongación, donde se adicionan nucleótidos y luego su translocación que permite repetir el proceso empleando el mismo sitio de unión (Etcheverry, 2009; Wyatt et al, 2010).

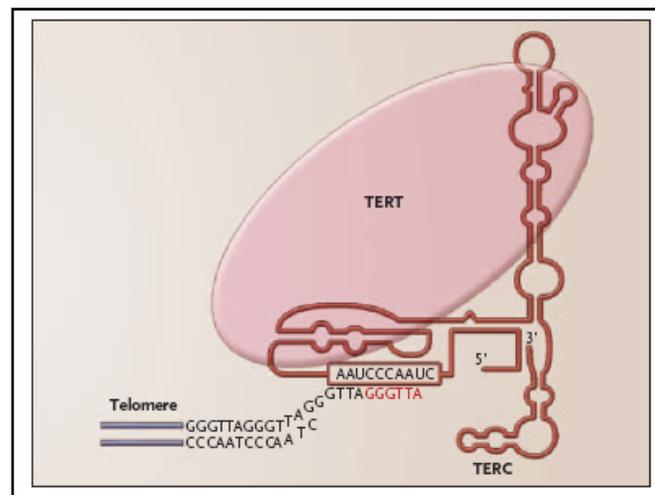


Figura 12. Estructura de la enzima telomerasa (Artandi et al, 2006)

La expresión de telomerasa se encuentra reprimida en la mayoría de las células del tejido somático normal, presenta bajos niveles en poblaciones celulares con alto potencial proliferativo como linfocitos activados y células de las criptas intestinales, detectándose alto nivel de expresión en células progenitoras (*stem*) y germinales, así como en las células tumorales y en las líneas celulares inmortalizadas. Estudios con células de ratones deficientes de telomerasa han provisto evidencias concretas de la relación existente entre la pérdida de repeticiones teloméricas y la predisposición a fusiones teloméricas (Blasco et al, 1997), sustentando un rol importante de la reducción telomérica y de la actividad de

telomerasa en la carcinogénesis (Kim et al, 1994; Shay et al, 1996). De hecho, el 85% de las neoplasias humanas muestran aumento de la actividad de telomerasa, asociada al estadio clínico y la progresión tumoral (Brunori and Gilson, 2005; Cusanelli and Chartrand, 2015), en tanto que en el 15% restante, los telómeros son mantenidos a través de mecanismos alternativos a la telomerasa (ALT), los cuales incluyen procesos de recombinación homóloga entre repeticiones teloméricas (Cesare and Reddel, 2010) que generan la elongación de los extremos cromosómicos (Nabetani and Ishikawa, 2011). Las células ALT positivas se caracterizan por presentar longitudes teloméricas heterogéneas y cercanas a 20kb y por la presencia de moléculas circulares de ADN, producidas por recombinación intra-cromosómica, que al ser incorporadas a la región telomérica provocan la elongación de los telómeros (Nabetani and Ishikawa, 2011).

ALT se observa particularmente en ciertos tipos de tumores como sarcomas, tumor pancreático neuroendócrino y tumores de cerebro, pero raramente en las neoplasias más comunes como colon, mama, pulmón, próstata o páncreas. Más recientemente se observó que muchos de los tumores que presentaban ALT tenían mutaciones en los genes *ATRX* (*alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*) y *DAXX* (*death-domain associated protein*), que codifican proteínas que interactúan entre sí a nivel de los telómeros (Jiao et al, 2011; Heaphy et al, 2011). Presumiblemente, la ausencia del complejo funcional *ATRX/DAXX* permite la recombinación homóloga que resulta en ALT. Estos datos son compatibles con la idea que determinadas alteraciones genéticas podrían otorgar ventajas selectivas que resultan en el mantenimiento de los telómeros, y que la telomerasa no se encuentra indefinidamente activada en todas las *stem cell* precursoras de cáncer (Killela et al, 2013). Otra evidencia en este aspecto fue la detección de mutaciones a nivel del promotor del gen *hTERT*, detectada en aproximadamente el 70% de los melanomas y en un pequeño número de líneas celulares derivadas de diferentes tumores (Horn et al, 2013; Huang et al, 2013). Estas mutaciones son infrecuentemente observadas en tumores de origen epitelial siendo más comunes en neoplasias no epiteliales, particularmente sarcoma y tumores de cerebro (Heaphy et al, 2011).

La telomerasa es activa durante la fase S del ciclo celular, y se piensa que se dirige a los telómeros para su elongación de una manera aleatoria, a pesar de que algunos estudios muestran que es reclutada preferentemente en los telómeros más cortos (Hemann et al, 2001; Zhao et al, 2009; Armanios and Blackburn, 2012). Estudios en células humanas mostraron que la sobreexpresión de *hTERT* les permite extender su tiempo de vida en cultivo y desarrollar un fenotipo neoplásico (Bodnar et al, 1998; Cairney and Keit, 2008). En cuanto a *hTR*, la reducción de la regulación de esta subunidad conduce a la pérdida de actividad de la telomerasa, generando acortamiento telomérico e inhibición del crecimiento celular (Autexier et al, 1996; Niida et al, 1998). No obstante, la sobreexpresión de *hTERT* en ausencia de *hTR* no es suficiente para promover el potencial neoplásico (Cayuela et al, 2005), sugiriendo la importancia de ambos componentes para la correcta actividad de la enzima (Blackburn et al, 2005; Cairney et al, 2008; Robles-Espinoza et al, 2015).

Asimismo, la expresión de la telomerasa presenta una alta regulación, ya que tanto su actividad como su inactividad no deseadas, pueden conducir a la predisposición tumoral o al agotamiento de células madres, respectivamente (Gonzalez-Suarez et al, 2001; Hao et al, 2005; Robles-Espinosa et al, 2015). La presencia de una isla CpG en la región promotora de *hTERT* sugiere que la metilación puede jugar un rol importante en la regulación transcripcional de este gen (Bechter et al, 2002). No obstante, a diferencia de la asociación general entre metilación del promotor y silenciamiento génico (Robertson et al, 2000), el promotor de *hTERT* está hiper-metilado en la mayoría de los tumores telomerasa-positivos e hipometilado en los tejidos normales telomerasa negativos (Dessain et al, 2000; Guilleret et al, 2002), en tanto que la hipo-metilación parcial puede resultar en algún nivel de actividad transcripcional (Renaud et al, 2007; Köchling et al, 2015; Zhang et al, 2015). No obstante, otros autores no encontraron correlación entre la actividad de telomerasa y el nivel de metilación del promotor, sugiriendo la presencia de otros mecanismos en la regulación transcripcional de este gen (Auchter et al, 2012; Panero et al, 2014). Killela et al (2013) sugieren la presencia de dos caminos que permitirían mantener la longitud de los telómeros a lo largo de las sucesivas divisiones en células neoplásicas: 1) a través de la regulación epigenética de la actividad de la

telomerasa que ocurre en las células *stem* de los tejidos que tienen alto nivel de renovación, y 2) a través de mutaciones somáticas que mantienen la LT, tales como mutaciones en el promotor de *hTERT* o en los genes *ATRX* o *DAXX*. Acorde a esta hipótesis, aquellas neoplasias que se originan en tejidos que están en constante renovación tales como carcinomas del epitelio gastrointestinal, la piel o la médula ósea, tendrían baja probabilidad de tener mutaciones debido a que la telomerasa ya está epigenéticamente activada en sus células precursoras. Por el contrario, los tumores que se originan en células que no están en constante renovación, tales como las neuronas, células gliales, fibroblastos, hepatocitos, epitelio pancreático ductal, tendrían mayor probabilidad de tener mutaciones. Posiblemente, los tumores que exhiben altas frecuencias de ALT tendrían también mayor proporción de mutaciones que serían mutuamente excluyentes.

Asimismo, la actividad de la telomerasa es regulada *in cis* por un complejo de seis proteínas: TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 y TPP1, denominado complejo protector de los telómeros o *shelterin complex* (de Lange 2005; Deng et al, 2008; Palm and de Lange, 2008). En particular, TRF1 y TRF2 se unen al ADN formando homodímeros e incrementando de este modo la afinidad de cada una de ellas por el ADN telomérico. A pesar de la similitud en sus secuencias y arquitectura, presentan funciones diferentes. TRF1 está involucrada en un mecanismo de retroalimentación negativo que permite el acortamiento telomérico mediante la inhibición de la telomerasa (van Steensel and de Lange, 1997), en tanto que TRF2 si bien ejerce también una regulación negativa de la LT, participa en la formación del t-loop, protege al extremo 3' simple cadena, y estabiliza los telómeros evitando de esta manera las fusiones terminales (de Lange 2005). Por su parte, POT1 es el único componente de este complejo con una alta especificidad por el extremo simple cadena, participando también en el mantenimiento telomérico por parte de la telomerasa y protegiendo el extremo 5' de los cromosomas (Lei et al, 2004). Finalmente, TPP1 colabora en el control de la LT a través del reclutamiento de POT1 hacia la región telomérica (Ye et al, 2004) e interacciona con TIN2 para regular la unión entre TRF1 y TRF2 (Court et al, 2005). TIN2 presenta múltiples sitios de unión a diferentes proteínas del complejo, siendo esencial para su estabilidad. RAP1 se asocia a la región telomérica a

través de su interacción con TRF2 y es crítica para inhibir NHEJ (*non-homologous end-joining*) a nivel de los telómeros (Sarthy et al, 2009) (Figura 13).

Además del complejo *shelterin*, se encuentra el complejo no-protector de los telómeros (*non-shelterin*) que comprende un grupo de factores multifuncionales tales como proteínas relacionadas con la reparación y replicación del ADN MRE11/NBS1/RAD50 (*MNR complex*) y RPA1 (*replication protein A1*) que evitan la degradación de los telómeros y facilitan su elongación, siendo necesarias para evitar la disfunción telomérica, la senescencia celular y la transformación maligna (Gilson and Geli, 2007; O'Sullivan and Karlseder, 2010; Sfeir et al, 2010) (Figura 13).

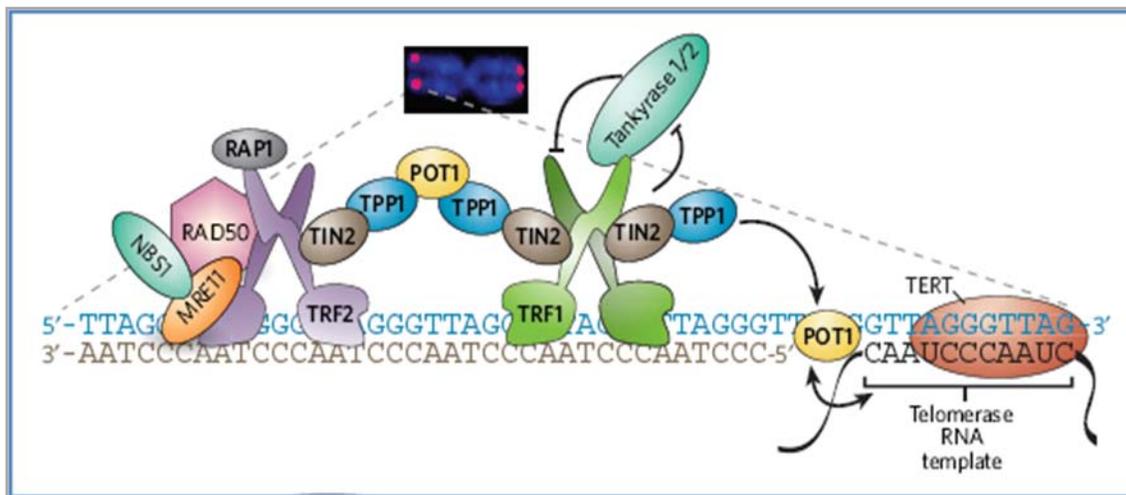


Figura 13. Esquema del complejo *shelterin* y *non-shelterin* de los telómeros. Representación de cada uno de sus componentes, con las interacciones entre las proteínas y con la secuencia telomérica. El complejo telomerasa (con el templado de RNA y la transcriptasa reversa) interactúan con el extremo simple cadena del telómero. (Las proteínas del complejo protector se encuentran con letra negra). (Modificado de Verdun and Karlseder, 2007).

1.4.5.4. Complejo ribonucleoproteico

Actualmente sabemos que existe una gran variedad de RNAs no codificantes (ncRNA), estructural y funcionalmente diversos, que han sido recientemente implicados en numerosas enfermedades humanas, incluyendo al cáncer. Entre ellos los RNA pequeños nucleolares (snoRNA), el grupo más abundante de los ncRNA, se clasifican en dos familias: **C/D box** y **H/ACA box** (*Hinge*/secuencia ACA), y son requeridos para la modificación post-transcripcional del RNA ribosomal (rRNA) (McMahon et al, 2015). Los RNAs que presentan dominio H/ACA box constituyen una gran familia de ncRNAs de secuencia conservada en arqueas y eucariotas (Meier, 2005; Kiss et al, 2010). La secuencia C/D box guía la metilación del rRNA junto a la Metil-transferasa Fibrillarina, en tanto que la secuencia H/ACA box conduce la pseudo-uridilación del rRNA, requiriendo para ello de la Pseudo-uridina-sintasa Diskerina, de un *core* de proteínas (NOP10, NHP2 y GAR1) y de ncRNAs. El complejo formado por las secuencias H/ACA box y las proteínas de unión a estas, se denomina complejo ribonucleoproteico (RNP) H/ACA (McMahon et al, 2015) (Figura 14). Este complejo RNP H/ACA es esencial en tres procesos celulares fundamentales: la síntesis de proteínas, el empalme del RNAm, y el mantenimiento de la integridad genómica (Kiss et al, 2010).

La biogénesis de la telomerasa requiere una vía de ensamblaje común con estos ncRNAs, que incluyen snoRNAs (small nucleolar RNAs) y scaRNA (small Cajal body), los cuales están involucrados en la modificación del RNA ribosomal y el splicing de RNAs, respectivamente (Kiss et al, 2006, Matera et al, 2007). La subunidad hTR de la telomerasa contiene en su extremo 5' el templado o molde de RNA para la síntesis de la secuencia telomérica, y en el extremo 3' la secuencia H/ACA, con alta afinidad por las proteínas DKC1 (Diskerin), NOP10 (NP10 ribonucleoprotein), NHP2 (NHP2 ribonucleoprotein) y GAR1 (GAR1 ribonucleoprotein). En tanto que la secuencia H/ACA box es esencial para la estabilización de hTR, su procesamiento, localización nuclear y actividad telomerasa (Theimer et al, 2006; Mitchell et al, 1999a; 1999b; Meier et al, 2005; Kiss et al, 2010). Asimismo, encontramos otras dos proteínas, Pontina y Reptina, dos ATPasas necesarias para la estabilización de DKC1 y hTR in vivo. El modelo

actualmente aceptado es que DKC1, Pontina y Reptina forman un andamio que recluta y estabiliza a hTR, y ensamblan la partícula ribo-núcleo-proteica telomerasa. Luego que este complejo se ha formado, se cree que Pontina y Reptina se disocian del complejo y liberan la actividad catalítica de la enzima (Veinteicher et al, 2008). La localización sub-celular de esta última parece estar regulada por la recientemente identificada TCAB1 (Telomerase Cajal body protein 1) (Zhong et al, 2011) (Figura 15).

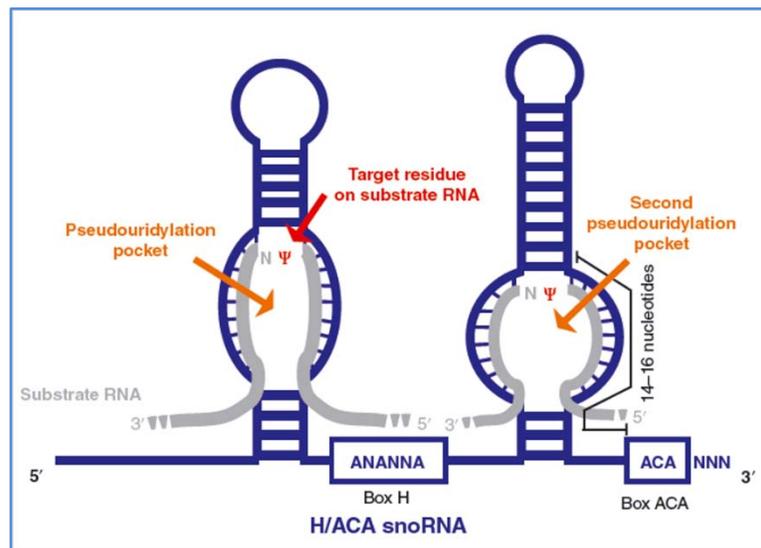


Figura 14. Estructura secundaria esquemática de una caja H/ACA de un RNA nucleolar pequeño (snoRNA). Representación esquemática de una caja H/ACA snoRNA (azul) que contiene varios elementos evolutivamente conservados, incluyendo una caja H (ANANNA), un motivo caja ACA y dos bolsillos de pseudo-uridilación. Los bolsillos de pseudo-uridilación se muestran apareados a las bases de la secuencia complementaria en el RNA sustrato (gris). La posición de la uridina diana modificada a pseudo-uridina (Ψ) en el RNA sustrato está indicado por la flecha roja.

Estas cuatro proteínas asociadas a H/ACA box (DKC1, NHP2, NOP10 y GAR1) se han descrito principalmente en disqueratosis congénita, patología que se caracteriza por la presencia de telómeros muy cortos en tejidos altamente proliferantes. Las mutaciones causales encontradas en pacientes con esta entidad, están situadas en los genes que

controlan la homeostasis telomérica, incluyendo los componentes de la telomerasa: *hTR*, *hTERT*, *DKC1*, *NOP10* y *NHP2*, la proteína protectora telomérica TIN2 y la proteína TCAB1, la cual facilita el tráfico de la telomerasa a los cuerpos de Cajal (Zhong et al, 2011). Particularmente NHP2 y NOP10 son importantes para la acumulación *in vivo* de RNAs con dominio H/ACA, en tanto que GAR1 es requerida para la localización nucleolar y función del complejo RNP (Collins et al, 2006). Se ha observado expresión del gen NHP2 en varios tejidos, y se plantea que podría estar regulada a nivel transcripcional en función de la especificidad tisular y del estado de proliferación celular, y que la baja regulación de su expresión puede resultar en la detención del crecimiento que acompaña a la diferenciación celular (Kang et al, 2002). Por su parte, DKC1 actúa en varios procesos celulares, tales como biosíntesis de RNA y de proteínas en general (Filipowicz et al, 2002), en el mantenimiento telomérico a través del correcto procesamiento de hTR y su estabilización dentro del complejo telomerasa (Collins and Mitchell, 2002; Alawi and Lin, 2011; Chang et al, 2002; Cohen et al, 2007), así como en la regulación de la apoptosis (Yoon et al, 2006). Curiosamente, los experimentos *in vitro* han demostrado que la pérdida de la función de DKC1 afecta a la actividad de la telomerasa mediante la reducción de los niveles de hTR, y por lo tanto conduce a un acortamiento prematuro de los telómeros (Mitchell et al, 1999b; Montanaro et al, 2008).

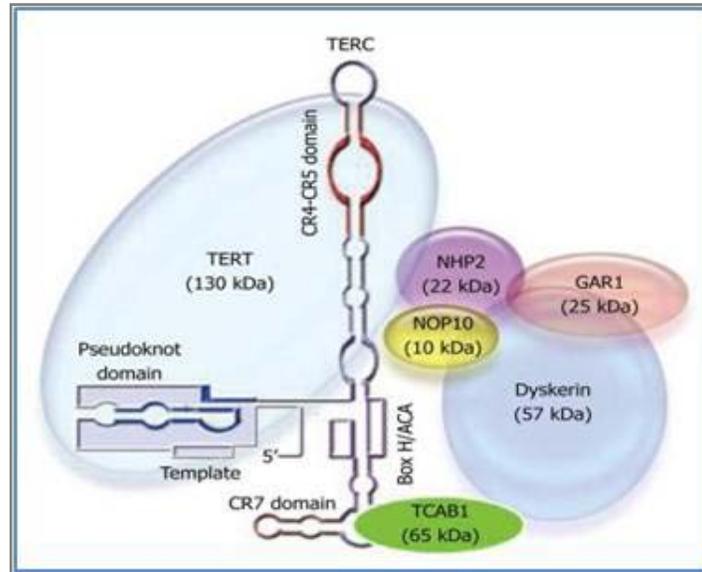


Figure 15. Ilustración simplificada de la enzima telomerasa mostrando sus principales componentes: hTERT, hTR (TERC), Disquerina, NOP10, NHP2, GAR1, y TCAB1 (Ly 2011).

Al presente existe muy poca información respecto de los genes asociados a H/ACA box en LLC. Poncet et al (2008) detectan una reducción de *DKC1* en tanto que Ronchetti et al (2013) encuentran desregulación de los genes de este complejo mediante microarrays, sugiriendo que podrían ser nuevos marcadores moleculares en LLC, situación que determina nuestro interés en efectuar estos estudios

2: Objetivos

2. Objetivos

Teniendo en cuenta lo anteriormente expresado, el objetivo general del presente trabajo de investigación se encuentra dirigido al estudio de la longitud telomérica y los genes involucrados en su regulación en LLC, tendiente a definir su participación en el proceso de desarrollo y progresión de la enfermedad, siendo sus objetivos específicos:

- ❖ Analizar la LT absoluta en muestras de pacientes con LLC, mediante PCR en tiempo real (qPCR), y evaluar el nivel de disfunción telomérica presente en la patología.
- ❖ Cuantificar los niveles de expresión de los genes asociados a H/ACA box: NOP10, NHP2, GAR1 y DKC1, así como de hTERT y hTR, subunidades catalítica y nucleotídica de la telomerasa, mediante q-PCR.
- ❖ Establecer el nivel de interacción entre los mismos y su asociación con la LT, tendiente a definir el rol de los niveles de transcripto en la regulación del tamaño telomérico en la LLC.
- ❖ Correlacionar los resultados obtenidos con los factores pronóstico de la LLC, a fin de establecer el significado clínico de la disfunción telomérica presente en las células leucémicas y su rol en el desarrollo y progresión de esta entidad, contribuyendo a una mejor caracterización biológica de la patología.

3. Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Población estudiada

En el presente estudio se evaluaron 134 pacientes con LLC. Simultáneamente, se estudiaron 61 individuos sanos que constituyeron la población control. En la Tabla 3 se muestra la distribución por edad y sexo de los individuos evaluados. Las muestras fueron obtenidas por el médico hematólogo, previa conformidad y consentimiento informado de los pacientes, y derivadas al Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET-Academia Nacional de Medicina. Los estudios efectuados en este trabajo fueron evaluados y aprobados por el Comité de Bioseguridad y el Comité de Docencia e Investigación del IMEX y el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

Tabla 3. Distribución por edad y sexo de pacientes con LLC y controles

Grupo	Nº de individuos	Edad media (Rango) (Años)	Sexo		Estadios RAI (%)		
			F	M	0	I-II	III-IV
Pacientes	131	65,5 (36-89)	52	82	32,1	55	12,9
Controles	61	64,9 (33-88)	40	21	-	-	-

El diagnóstico y la progresión de la enfermedad fueron definidos en base a los criterios establecidos por el *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* (Hallek et al, 2008) y la *World Health Organization* (WHO) (Müller-Hermelink et al, 2008). Para los estadios clínicos se tuvo en cuenta la clasificación de Rai (1975). Se consideró **enfermedad progresiva** a la aparición de síntomas B, linfocitosis progresiva, presencia de linfadenopatías, hepato- o esplenomegalia, transformación a una histología más agresiva (Síndrome de Richter, leucemia prolinfocítica), ocurrencia de anemia o trombocitopenia, y **enfermedad estable** a la ausencia de síntomas de progresión (Hallek et al, 2008; Dupont et al, 2015). Los estadios Rai estuvieron disponibles en 106 casos con la siguiente distribución: 0: 35 (33%), I-II: 57 (53,8%) y III-IV: 14 (13,2%).

3.2. Metodología

3.2.1. Separación de células mononucleares de SP por Ficoll-Paque PLUS (FPP)

Reactivos:

- Etilen-diamin-tetra acetato de sodio (EDTA).
- Ficoll-Paque PLUS - GE Healthcare (Buffer estéril para separación de células mononucleares).
- PBS 1 X (Solución salina balanceada).
- TRI Reagent (Sigma Aldrich).

Procedimiento:

El método FPP permite separar poblaciones de una suspensión celular empleando un medio de alta densidad y centrifugando a baja velocidad. Se parte de muestras de SP anticoaguladas con EDTA al 5%. Las mismas son fraccionadas en dos partes iguales, para la obtención de ADN y ARN.

1. Se colocan 3 ml de FPP en un tubo estéril de 15 ml.
2. Se preparan 4 ml de una dilución de SP en PBS 1X (1:1) y se mezcla homogeneizando por inversión.
3. Se traspa esta dilución cuidadosamente con pipeta Pasteur estéril al tubo con FPP, teniendo especial cuidado de no mezclar ambas fases.
4. Se centrifuga durante 30 min. a 400 g.
5. Se descarta la fase superior (plasma y plaquetas) y cuidadosamente se recupera la interfase de células mononucleares, y se la coloca en un tubo Eppendorf estéril.
6. Se resuspende agregando PBS 1X, se centrifuga durante 10 min. a 600-1000g, se descarta el sobrenadante y se realizan 2 lavados más con PBS 1X hasta que el pellet se observe limpio.

La muestra destinada para la extracción de ARN es luego resuspendida en 1ml de TRI Reagent (solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina) y colocada en freezer a -70°C hasta su procesamiento, en tanto que la muestra asignada para el aislamiento de ADN es directamente almacenada en freezer -20°C hasta el momento de la extracción.

3.2.2. Extracción de ADN genómico

Reactivos:

- Proteinasa K (PK, solución de trabajo 200 $\mu\text{g/ml}$ en agua bidestilada estéril)
- Buffer PK (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 5 mM y SDS 0,5 %)
- Fenol (saturado en Tris/HCl 0,5 M; pH 8)
- Alcohol isoamílico
- Cloroformo
- IAC (Alcohol isoamílico : Cloroformo (1:24)
- Alcohol etílico absoluto
- Alcohol etílico 70%
- NaCl 3 M
- Agarosa
- Buffer de siembra 6X (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol en agua desionizada)
- Bromuro de etidio 0,25 $\mu\text{g/ml}$ en agua destilada

Procedimiento:

- Digestión del ADN: Se homogeniza la muestra de linfocitos en buffer PK y se digiere con proteinasa K (200 µg/ml) durante 24hs a 37°C.
- Extracción de ADN: método de fenol/cloroformo.

Se realizan tres extracciones consecutivas con:

1. un volumen de fenol
 2. un volumen de fenol:IAC (1:1)
 3. un volumen de IAC.
- En todos los casos, se centrifuga 5 minutos a 12000g y se recupera la fase acuosa superior.
 - El ADN de alto peso molecular se precipita con 1/10 volúmenes de NaCl 3 M y 1,5 volúmenes de alcohol etílico absoluto.
 - Se recupera el ADN con un capilar de vidrio sellado en sus extremos y se lava con alcohol etílico 70%.
 - La concentración del ADN obtenido se estima por espectrofotometría de luz ultravioleta (UV) a 260 nm y 280 nm. La pureza de los ácidos nucleicos relativa a proteínas se estima a través de la relación OD_{260}/OD_{280} (pureza óptima cuando la relación equivale a 1,8).
 - La calidad del ADN se evalúa mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio 0,25 µg/ml.

3.2.3 Extracción de ARN total

Reactivos:

- TRI Reagent (Molecular Research Center)
- Cloroformo
- Isopropanol

- Alcohol etílico 75%
- Agua estéril tratada con dietilpírocarbonato (DEPC) al 0,1%

Procedimiento:

El aislamiento de ARN total se realiza mediante la técnica de TRI Reagent/Cloroformo.

- Se parte de la muestra resuspendida en TRI Reagent contenida en tubo Eppendorf.
- Se efectúa una extracción con 200 μ l de cloroformo, centrifugando a 9000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- Se agregan 500 μ l de isopropanol a la fase acuosa recuperada, se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifuga a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C.
- Se descarta el sobrenadante, y el precipitado de ARN así obtenido se lava con 1 μ l de etanol 75%, centrifugando a 7500 rpm por 5 minutos.
- Se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet a 65°C durante diez minutos
- Se resuspende, dependiendo de su tamaño, en 30-50 μ l de agua estéril tratada con DEPC al 0,1%.
- Se cuantifica la concentración de ARN por espectrofotometría a 260nm, y se evalúa su pureza a través de la relación OD₂₆₀/OD₂₈₀ (relativa a proteínas) y OD₂₆₀/OD₂₃₀ (relativo a la presencia de fenol).

3.2.4. Reacción de retro-transcripción inversa (RT-PCR)

Reactivos

- M-MLV *Reverse Transcriptase* (Promega)
- M-MLV RT *Reaction Buffer* 1X
- dNTPs (Promega)
- *Random primers* (Promega)

Procedimiento:

- La síntesis del ADNc se efectúa mediante RT-PCR en un volumen final de 20 μ l empleando 1 μ g de ARN total.
- La mezcla de la reacción se compone de los siguientes elementos:
 - M-MLV RT *Reaction Buffer* 1X
 - dNTPs 10mM cada uno
 - Random primers 250 ng/ μ l
 - 10U M-MLV Reverse Transcriptase.
- Cada reacción se lleva a cabo en un ciclador TPersonal (Biometra) El programa de PCR utilizado consiste en una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, la retrotranscripción a 37°C por 60 minutos y finalmente la inactivación de la enzima transcriptasa inversa a 95°C durante 15 minutos.
- Se conserva el producto en freezer a -20°C hasta su utilización.

3.2.5. Análisis de la LT mediante la técnica de TRF (Terminal Restriction Fragments)

Reactivos:

- Enzimas de restricción *HinfI* y *RsaI* (Promega)
- Buffer C (10 mM Tris-HCl, pH 7,9; 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ y 1 mM de ditioneitol, DTT) (Promega)
- Agarosa
- Buffer TBE (1X: Tris/borato 89 mM, EDTA 1 mM)
- Bromuro de etidio 0,25 μ g/ml
- Buffer de siembra 6X: 30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol en agua desionizada.

- Membrana nylon (ZetaProbe GT, BioRad)
- HCl 0,25 N
- Solución de desnaturalización: NaOH 0,5 N-NaCl 1,5 M
- Solución de neutralización: Tris/HCl 0,5 M-NaCl 1,5 M
- Solución salina de citrato de sodio (SSC) (1X: 150 mM cloruro de sodio y 15 mM de citrato de sodio)
- Sonda telomérica (TTAGGG)₇ 5 pmol/μl (15 pmoles por membrana)
- [$\gamma^{32}\text{P}$] dATP (3000 Ci/mmol)
- Enzima T4 polinucleótido kinasa (T4PNK) (Promega)
- Buffer kinasa (Promega)
- Columnas Sephadex G-50 (ProbeQuant G-50 micro columns, GE Healthcare)
- Solución de pre-hibridación:
 - ✓ SSC 5X
 - ✓ Denhardt 5X (Ficoll 0,5 g, polivinilpirrolidona 0,5 g y seroalbúmina bovina, BSA 0,5 g)
 - ✓ SDS 0,5% (dodecil sulfato de sodio)
 - ✓ Na₂HPO₄ 0,1 M
 - ✓ Formamida desionizada 20% v/v
 - ✓ Blotto (*Bovine Lactato Transfer Technique Optimizer*) (1X: 5% leche en polvo descremada disuelta en agua)
- SDS 1%
- Películas radiográficas (AGFA)
- Chasis de 25 x 30 cm con pantallas amplificadoras (AGFA)

Procedimiento:

Digestión con enzimas de restricción *HinfI* y *RsaI* (ambas cortan por fuera del *core* de las repeticiones teloméricas)

- Se coloca en un tubo Eppendorf 10 µg de ADN y 5 µl de Buffer C (1X), seguido de 5µl (50 U) de *HinfI* y 5 µl (50 U) de *RsaI*, llevando a volumen final de 50 µl.
- Se incuba durante 16-24 horas a 37°C.

Electroforesis y transferencia (*Southern blot*)

- Se verifica la digestión del ADN en un mini gel (11 x 14 cm) de agarosa al 1%, mediante electroforesis de 1 µl del producto. El ADN digerido se visualiza como un *smear* o chorreado.
- Seguidamente se realiza una nueva electroforesis, en un gel de agarosa al 0,8% de mayor tamaño (15 x 22 cm), en el que se siembra todo del volumen de la digestión. Éste se corre durante 20-24hs a 35V a temperatura ambiente.

Ambos geles se preparan con buffer TBE 0,5X, con bromuro de etidio 0,25 µg/ml, y se corren en cuba electroforética sumergidos en el mismo buffer. Conjuntamente a las muestras se siembra el marcador de peso molecular λHindIII.

- Se visualiza el gel sobre un transiluminador UV de 300 nm.
- Se realiza la depurinización del ADN, incubando el gel en HCl 0,25 N, durante 15 minutos.
- Se desnaturaliza con solución alcalina por 30 minutos.
- Se efectúa una última incubación por 40 minutos en solución de neutralización.

En los 3 casos, se retira la solución utilizada antes de agregar la correspondiente al paso siguiente.

- Se realiza la transferencia de las muestras de ADN a una membrana de nylon (ZetaProbe GT, BioRad) en condiciones de alta fuerza iónica. Esto se lleva a cabo por capilaridad en 10X SSC durante 24 horas (Southern, 1975).

- Se lava la membrana con 2X SSC.
- Se fija el ADN transferido a la membrana covalentemente (*crosslinking*) por exposición a la luz UV durante 10 minutos.
- Se seca en horno a 80°C durante 2hs.

Preparación de la sonda para *Southern blot*

Marcado y purificación

Se marca la sonda telomérica (TTAGGG)₇ a través de la reacción de *5'end-labelling*, en un volumen final de 25 µl, de la siguiente manera:

- Se colocan 15 pmol de la sonda en un tubo Eppendorf y se agrega buffer kinasa 10 X. Seguidamente se incorporan 5U de T4PNK y 150 µCi de [$\gamma^{32}\text{P}$] dATP.
- Se aísla la sonda por cromatografía de exclusión molecular en columnas Sephadex G-50 y, luego de la centrifugación, se la recupera en la fracción del eluido de las columnas (ProbeQuant G-50 micro columns), manteniéndose dentro de un contenedor de plomo hasta el momento de hibridación de la membrana.

Hibridación con sondas radioactivas

- Se coloca la membrana en solución de pre-hibridación durante 4-5 horas a 42°C en estufa de hibridación (Techne).
- Se incorpora la sonda telomérica (TTAGGG)₇ marcada a la solución, incubando la membrana a 42°C durante 24 horas.
- Se realizan dos lavados secuenciales de la misma con 2X SSC/SDS 1%, a 42°C y 45°C, durante 15 minutos cada uno de ellos.
- Luego se lava dos veces con 1X SSC/SDS 0,1%, a 48°C y 50°C, durante 30 minutos cada vez.

- En caso de que el contador Geiger detectase excesiva marca en los bordes de las membranas se realizan lavados a mayor temperatura con la última solución mencionada.
- La membrana hibridada y lavada se expone a una película radiográfica en chasis de 25 x 30 cm que contiene pantallas amplificadoras, durante 10 días a -70°C . La placa es revelada, fijada, lavada y secada con procesador automático.
- Las autorradiografías se evalúan mediante análisis densitométrico de cada calle respecto del marcador de peso molecular, con el software *GelPro*.

Interpretación de los resultados

El estudio de LT mediante TRF permite visualizar la señal de hibridación en forma de un chorreado correspondiente a todas las poblaciones de distintas longitudes teloméricas de un determinado tejido o tipo celular. La media de LT de cada muestra es evaluada dentro del rango de 2-23 kb y calculada considerando la siguiente ecuación: $\text{TRF} = \Sigma (\text{OD}_i) / \Sigma (\text{OD}_i/L_i)$, donde OD_i y L_i corresponden a la intensidad de señal y la longitud, respectivamente, en la posición i de la autorradiografía. Los resultados así obtenidos se promedian y se comparan con un control positivo (línea celular K-562) y un control negativo de acortamiento telomérico (sangre de cordón umbilical, que por ser un tejido joven no presenta reducción de la LT). Simultáneamente, se evalúa SP de individuos sanos como controles normales. En la Figura 16 se muestra una autorradiografía con los tres controles mencionados anteriormente.

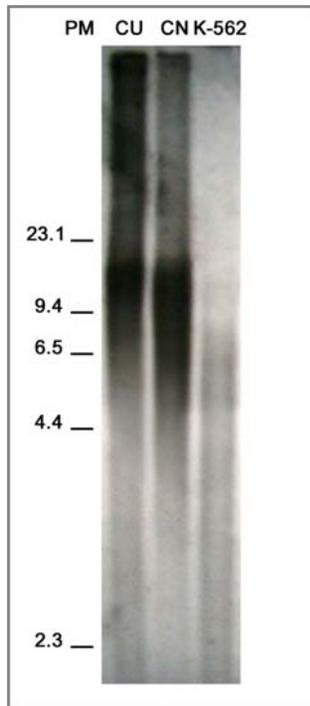


Figura 16. Ejemplo de autorradiografía mostrando los TRF de sangre de cordón umbilical (CU), sangre periférica de un control normal (CN) y la línea celular K-562. PM: peso molecular.

3.2.6. Cuantificación absoluta de la LT

La cuantificación absoluta de la LT se efectúa mediante la técnica de q-PCR con metodología SYBR Green, basada en la detección de los productos de PCR mediante el empleo de un fluorocromo intercalante (SYBR Green I) en el ADN doble cadena (ADNdc). Este fluorocromo se une al surco menor del ADNdc aumentando su fluorescencia. Durante los consecutivos ciclos de la reacción de PCR la cantidad de ADNdc aumenta de manera exponencial y, por consiguiente, la cantidad de intercalante que puede unirse al mismo y emitir fluorescencia a una longitud de onda de 530nm. La señal fluorescente aumentará gradualmente durante la fase de extensión, será máxima al final de cada fase y disminuirá o será nula en cada fase de desnaturalización (Figura 17). Esta técnica de PCR cuantitativa no es específica de la secuencia amplificada y, por lo tanto, puede detectarse fluorescencia emitida por productos no específicos y/o dímeros de *primers*. Posteriormente al ciclado, a fin de evaluar la especificidad de la amplificación, se realiza un análisis de curvas de *melting* que permite evidenciar eventuales productos inespecíficos que pudieran alterar la calidad de la estimación cuantitativa. En el análisis

de *melting* la temperatura es aumentada lentamente por encima del punto de desnaturalización luego de la amplificación del fragmento. La fluorescencia será máxima a temperaturas bajas, cuando todo el ADN se encuentra como ADNdc, pero disminuirá de manera drástica cercano al punto de *melting* del producto específico. Este punto corresponde a la temperatura de *melting* (T_m) la cual es característica de cada producto ya que la desnaturalización de un fragmento de ADN depende de su longitud, su secuencia de bases y su contenido en GC, pudiendo identificarse cada uno de ellos de manera específica.

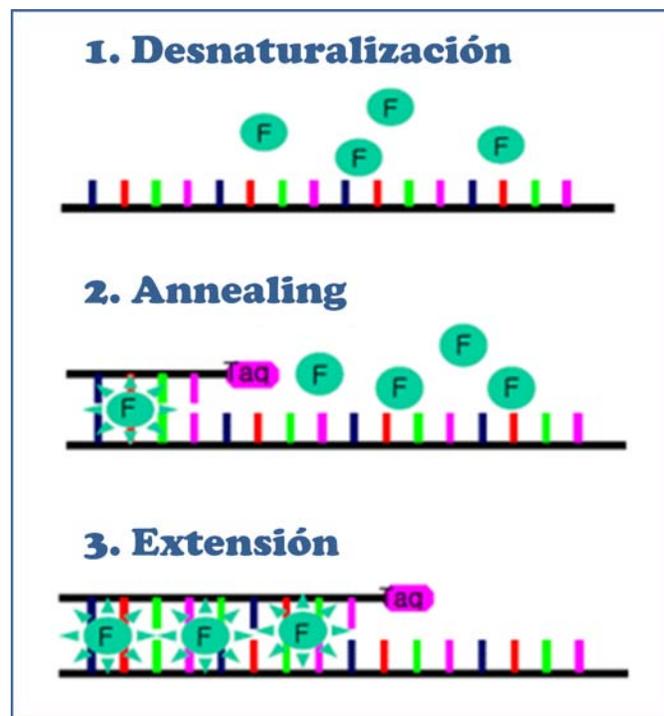


Figura 17: Mecanismo de acción de SYBR Green. F: fluorocromo; Taq: Taq Polimerasa

3.2.6.1. Medición de la LT absoluta

Reactivos:

- SYBRGreen máster mix (Roche)
- ADN de pacientes y controles

- *Primers* específicos para *RPLP0* y TEL
- Estándares para *RPLP0* y TEL

Procedimiento:

La cuantificación absoluta de la LT implica la realización de dos PCRs consecutivas: la primera de ellas (PCR1) permite amplificar la secuencia telomérica con *primers* específicos de la región y la segunda PCR (PCR2) amplifica un gen de copia única, *RPLP0* (*ribosomal protein, large, P0*), que codifica para la fosfoproteína ribosomal P0 de expresión constitutiva. La PCR2 es de gran utilidad ya que permite controlar la calidad del ADN de cada muestra, así como determinar el número de copias genómicas por muestra, necesario para la cuantificación absoluta de la LT. Se emplearon los *primers* descritos por O'Callaghan *et al* (2008) (Tabla 4). Ambas PCRs se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l, empleando 20 ng de ADN de pacientes y controles sanos, 1X SYBRGreen máster mix y 100 nmol/L de *primers* (tanto para telómeros como para el gen *RPLP0*). Como control negativo de amplificación se utilizó agua en reemplazo de ADN.

Tabla 4. Secuencias de los *primers* empleados en el análisis de LT

<i>Primer</i>	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)
TEL F	CGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT	>76
TEL R	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT	
RPLP0 F	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	75
RPLP0 R	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	

F: *forward*; R: *reverse*.

Para la cuantificación se siguió el protocolo de SYBR Green, utilizándose el kit de PCR y el software de LightCycler Roche (Roche Diagnostics). Todas las muestras se evaluaron por duplicado. Las condiciones de la reacción que permitieron obtener la mejor

eficiencia y reproducibilidad fueron: 95°C 10min, seguido de 45 ciclos de 95°C 15s y 60°C 1min; la curva de *melting* se realizó con 1 ciclo de 95°C 20s, 50°C 15s y 98°C con una rampa de temperatura de 0,1°C/s.

Construcción de las curvas estándar

Para la realización de las curvas de calibración, se utilizaron diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 y 1/1000000) de un oligonucleótido sintético que contiene 14 repeticiones de la secuencia telomérica TTAGGG para la PCR1 y de un estándar sintético de *RPLP0* para la PCR2 (O'Callaghan *et al*, 2008) (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencias de los estándares empleados

Estándar	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)
TEL	(TTAGGG) ₁₄	84
RPLP0	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGG CCAGGACTCGTTTGTACCCGTTGATGATAGAATGGG	75

Pb: Pares de base

Dado que ambas curvas de calibración se efectúan con oligonucleótidos sintéticos, se puede calcular el número de repeticiones teloméricas y de copias del gen *RPLP0* presentes en cada dilución del estándar. Los cálculos se realizan de la siguiente manera:

Para el estándar telomérico:

- La secuencia presenta una longitud de 84 pb, cuyo peso molecular (PM) es de 26667,2.
- El peso de una molécula es su PM/número de Avogadro. Por lo tanto, el peso de una molécula de estándar es $26667,2/6,02 \times 10^{23} = 0,44 \times 10^{-19}$ g/molécula.

- El primer punto de la curva de calibración, que contendrá el estándar más concentrado, se efectúa con 60 pg de oligonucleótido (60×10^{-12} g) por reacción.
- El mismo contiene $60 \times 10^{-12} \text{g} / 0,44 \times 10^{-19} \text{ g/molécula} = 1,36 \times 10^9$ moléculas de oligonucleótido.
- La cantidad de secuencias teloméricas en el punto más concentrado del estándar es entonces: $1,36 \times 10^9 \text{ moléculas} \times 84 \text{ pb} = 1,18 \times 10^8 \text{ kb}$.

Para el gen de copia única *RPLP0*:

- El estándar *RPLP0* presenta una longitud de 75 pb, con un PM de 23268,1.
- El peso de una molécula del estándar es su PM/número de Avogadro: $23268,1 / 6,02 \times 10^{23} = 0,38 \times 10^{-19} \text{ g/molécula}$.
- El punto de la curva más concentrado tendrá 200 pg de oligonucleótido estándar ($200 \times 10^{-12} \text{ g}$).
- El mismo contiene $200 \times 10^{-12} \text{ g} / 0,38 \times 10^{-19} = 5,26 \times 10^9$ copias del amplicón *RPLP0*.
- Dado que se tienen dos copias de *RPLP0* por genoma diploide, el estándar más concentrado tendrá $2,63 \times 10^9$ copias por genoma diploide.

En la Figura 18 se muestra un ejemplo de la curva de calibración para el gen *RPLP0* y para la secuencia telomérica, cada una con las respectivas curvas de amplificación y la *Tm* específica del producto amplificado.

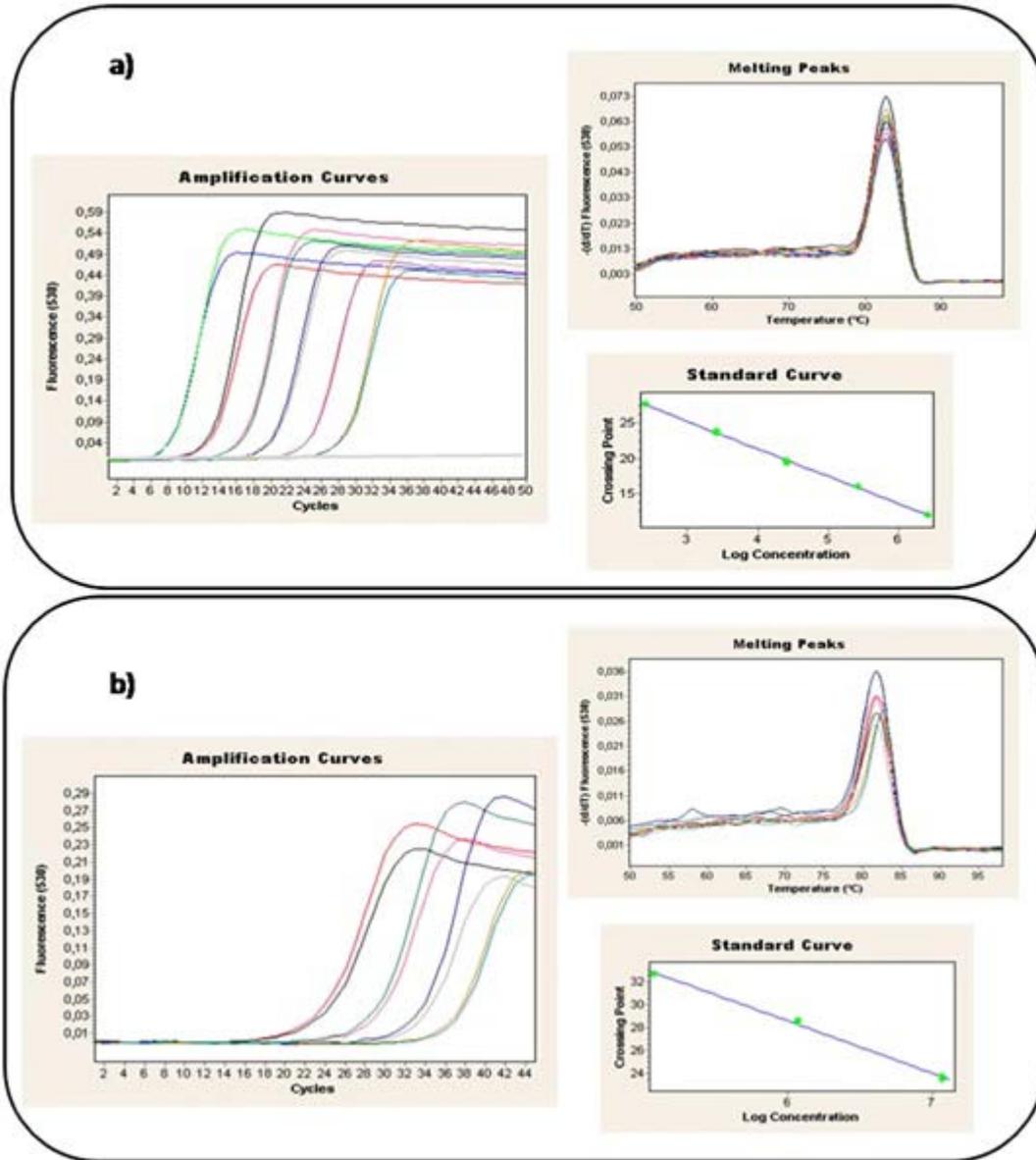


Figura 18. Curvas de calibración con diluciones seriadas de los estándares: a) gen *RPLP0*; b) secuencia telomérica.

Análisis de los datos

El análisis de los datos se efectuó con el software LightCycler (Roche) y el programa Excel MS. Una vez finalizada la amplificación, el software del equipo produce un valor para cada muestra de la reacción que equivale al total de kilobases de la secuencia telomérica por tubo de reacción, basado en la curva de calibración realizada. Este valor es exportado a una planilla de Excel MS, donde a través de cálculos matemáticos (cociente entre valor exportado y el número de copias genómicas de *RPLP0* por muestra de reacción) se establece la LT absoluta en kilobases por genoma diploide.

3.2.7. Análisis de expresión génica

3.2.7.1. Diseño de *primers*

En este estudio se realizó el análisis de expresión de los genes del complejo RNP (*NOPI0*, *NHP2* y *GAR1*) y de *DKC1*, que participa en la estabilización de la telomerasa, y de *hTERT* y *hTR*, subunidades catalítica y nucleotídica de dicha enzima. Para los genes del complejo RNP y *DKC1* se diseñaron *primers* específicos a partir de las secuencias del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (*NOPI0*: NC_000015.10; *NHP2*: NC_000005.10; *DKC1*: NC_000023.11; *GAR1*: NC_000004.12), empleando el software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), y teniendo en cuenta: tamaño de los *primers*, estabilidad del extremo 3', *Tm*, contenido de CG, ausencia de estructuras secundarias, auto-complementariedad, concentración de cationes y dNTP en la reacción, entre otras (Thornton and Basu, 2011). Se efectuó el análisis de la estructura secundaria mediante el software Beacon Designer™ Free Edition (<http://www.premierbiosoft.com/crm/jsp/com/pbi/crm/clientside/EligibleForDiscountLoginForm.jsp?LoginForFreeTool=true&PID=1>), a fin de seleccionar los mejores *primers* en cuanto a la formación de dímeros cruzados y auto-dímeros (aquellos que presentaban mayores valores de $-\Delta G$). Finalmente se procedió a analizar la estructura secundaria del producto esperado, mediante el software mFold (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/mFold/>). Solo se tuvieron en cuenta los

primers que generaban un producto sin estructuras secundarias, o que tenían una *Tm* menor que la temperatura de *annealing* de la PCR.

Para los genes *hTR* y *hTERT* se emplearon *primers* previamente descritos en la literatura (Chiodi et al, 2013; Bieche, et al, 2000). En la Tabla 6 se detallan las secuencias de los *primers* empleados para cada gen en estudio.

Tabla 6. Secuencias de los *primers* empleados en este estudio

Nombre del <i>primer</i>	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)	Referencia
β -actina F	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	97	Ferri, et al, 2015
β -actina R	CCAACCGCGAGAAGATGA		
hTR F	TCTAACCTAACTGAGAAGG	126	Chiodi, et al, 2013
hTR R	GTTTGCTCTAGAATGAACGG		
hTERT F	TGACACCTCACCTACCCAC	95	Bieche, et al, 2000
hTERT R	CACTGTCTTCCGCAAGTTCAC		
NOP10 F	TTCGGACTGTGAGCCCTGATGCCTTT	70	Presente trabajo
NOP10 R	TCAATCGCCACGAGAGACTGGATGCC		
NHP2 F	CTTCTGTCCATCAGTGCCAT	105	Presente trabajo
NHP2 R	AGCATTTACTTTCCCCACCC		
DKC1 F	TGAAGAGAGAGATTGGGGACT	85	Presente trabajo
DKC1 R	ATGGGAAGAGGGGTTAGAGG		
GAR1 F	CGGAGGTCGTGGAGGCTTT	77	Presente trabajo
GAR1 R	CTCGGAAGTGGTTGCTGCTG		

3.2.7.2. PCR en tiempo real (q-PCR) para medición de expresión génica

Reactivos:

- Sybr Select Master Mix (Applied Biosystems®)
- *Primers* específicos para cada gen
- ADNc de pacientes y controles

Procedimiento:

- La expresión de los genes que codifican para las ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (*NOPI0*, *NHP2*, *DKC1* y *GARI*) y para las dos subunidades de la enzima telomerasa (*hTERT* y *hTR*) se evaluaron mediante la técnica de q-PCR a partir de los ADNc previamente obtenidos.
- Se empleó un termociclador Rotor GENE Q (Qiagen).
- Para la cuantificación se utilizó el protocolo de amplificación de SYBR GREEN, empleándose el kit Sybr Select Master Mix, el cual suministra todos los componentes necesarios para la reacción, exceptuando los *primers*.
- Se utilizó el gen *β -actina* de expresión constitutiva como control interno de la reacción de PCR (Ferri et al, 2015).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, empleando 2,5 μ l de ADNc de pacientes y controles, 2X SYBR Selected Master Mix, y 175 nM/L de cada primer para cada gen de interés, incluyendo al gen de referencia. Como control negativo se empleó agua en lugar de ADNc de pacientes y controles. Se estandarizaron las condiciones de q-PCR para cada gen, lográndose un único ciclado para todos ellos: desnaturalización inicial de 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C durante 2 minutos, 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 segundos y *annealing* y extensión a 60°C por 1 minuto. Finalizando con una curva de *melting* de 50 a 99°C (Figura 19).

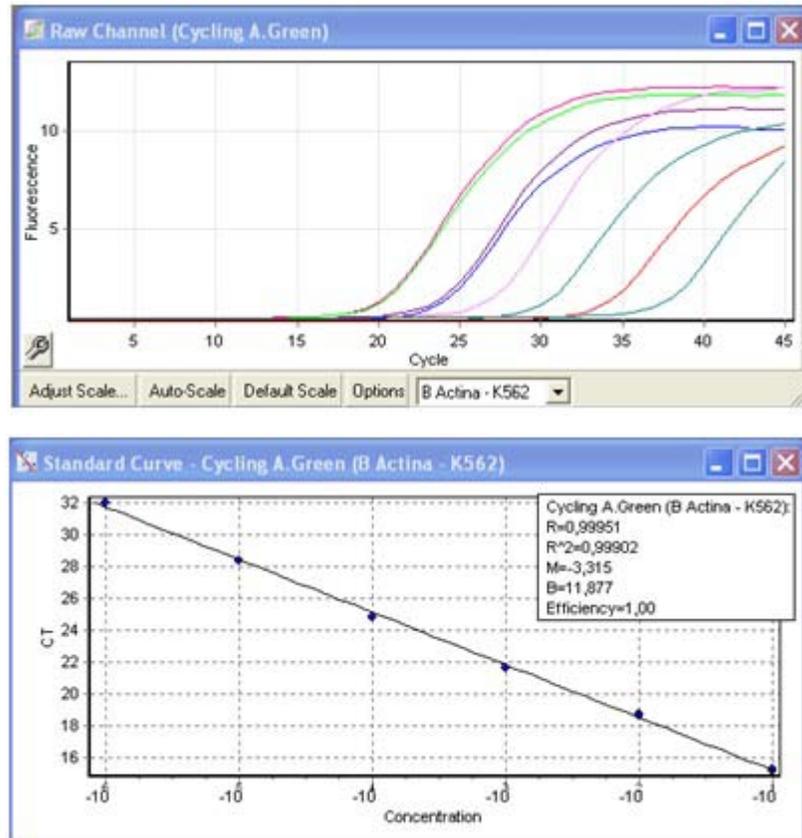


Figura 19. Curvas de calibración con diluciones seriadas del gen β -Actina: a) curvas de amplificación. b) Curva estándar.

3.2.8. Análisis del estado mutacional de IGHV

3.2.8.1. A partir de ARN y su correspondiente ADNc

Reactivos

- Enzima *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen)
- *Buffer* 10X sin magnesio (Invitrogen)
- MgCl 50mM (Invitrogen)
- dNTPs (Promega)
- Primers específicos para cada segmento
- H₂O para PCR

- ADNc de pacientes.

Procedimiento

Para el análisis del perfil mutacional de los genes *IGHV* se procedió a amplificar las muestras mediante la técnica de PCR a partir de los ADNc previamente obtenidos. Se utilizaron las condiciones y *primers* propuestos por Pritsch et al (1993) y Campbell et al (1992) (Tabla 7). Esta técnica emplea seis reacciones de PCR por cada muestra con seis *primers forward* (VH1-6) específicos para cada familia VH, y un único *primer reverse* (JH). Cuando la amplificación no resulta satisfactoria, se repite la reacción con *primers* que amplifican secuencias en la región *leader* (LH1-6) y un único *primer* antisentido C μ . La reacción de PCR se lleva a cabo en un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción para ambas PCRs VH y LH contiene: Buffer PCR 10X, 50 mM MgCl, 10 mM dNTPs, H₂O PCR grade, 10 μ M de cada *primer* y 5 U/ μ L de enzima *Taq* DNA polimerasa. Como control negativo se empleó agua en lugar de ADNc y como control positivo se amplificó un paciente con LLC con segmento VH conocido. La amplificación se realizó empleando el siguiente ciclado: desnaturalización inicial a 93°C por 3 minutos, seguida de 33 ciclos a 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, y una extensión final de 7 minutos a 72°C con enfriamiento a 4°C por 10 minutos.

Tabla 7. Secuencias de los *primers* empleados en este estudio

Gen	Primers	Referencia
Forward		
VH1	5'- CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG -3'	Pritsch et al, 1993
VH2	5'- TCCTGCGCTGGTGAAAGCCACACA -3'	Pritsch et al, 1993
VH3	5'- GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA -3'	Pritsch et al, 1993
VH4	5'- TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC -3'	Pritsch et al, 1993
VH5	5'- GAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAA -3'	Pritsch et al, 1993
VH6	5'- CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG -3'	Pritsch et al, 1993
LH1	5'- CATGGACTGGACCTGG -3'	Campbell et al, 1992
LH2	5'- ATGGACACACTTTGCTCCAC -3'	Campbell et al, 1992
LH3	5'- CCATGGAGTTTGGGCTGAGC -3'	Campbell et al, 1992
LH4	5'- ATGAAACACCTGTGGTTCTTCC -3'	Campbell et al, 1992
LH5	5'- ATGGGGTCAACCGCCATCC -3'	Campbell et al, 1992
LH6	5'- ATGTCTGTCTCCTTCCTCATC -3'	Campbell et al, 1992
Reverse		
JH	5'- CTTACCTGAGGAGACGGTGACC -3'	Pritsch et al, 1993
C _μ	5'- CTCTCAGGACTGATGGGAAGCCCCG -3'	Campbell et al, 1992

3.2.8.2. A partir de ADN

Reactivos

- Kit KAPA2G Fast HotStart DNA Polymerase (5U/ μ l) (Biosystems)
- dNTPs (Biosystems)
- Primers específicos para cada segmento

Procedimiento

Amplificación por PCR:

Para el análisis del perfil mutacional de los genes *IGHV* a partir de muestras de ADN se utilizaron las condiciones y *primers* descritos previamente (van Dongen et al, 2003) (Tabla 8). Esta técnica emplea seis reacciones de PCR por cada muestra con seis *primers forward* (VH1-6), específicos para cada familia VH, y un único primer reverse (JH). La reacción de PCR se lleva a cabo en un volumen final de 50 μ l empleando 50 ng de ADN. La mezcla de reacción para la PCR contiene:

- 5X KAPA2G Buffer A (con Mg)
- 10mM dNTPs,
- H₂O PCR grade,
- 10 μ M de cada *primer*
- 5U/ μ l de enzima KAPA2G Fast HotStart DNA Polymerase.

Como control negativo se empleó agua en lugar de ADNc y como control positivo se amplificó un paciente con LLC con segmento VH conocido. La PCR se realizó empleando el siguiente ciclado: desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 seg., *annealing* a 60°C por 15seg, extensión a 72°C durante 15 seg, y una extensión final de 72°C por 1 minuto.

Tabla 8. Secuencias de los *primers* empleados para la amplificación de genes *IGHV* a partir de ADN.

Gen	Primers
Forward	
VH1	5' - GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG -3'
VH2	5' - GTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCC -3'
VH3	5' - CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG -3'
VH4	5' - CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTG -3'
VH5	5' - CGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGT -3'
VH6	5' - TCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTG -3'
Reverse	
JH	5' - CTTACCTGAGGAGACGGTGACC -3'

3.2.8.3 Electroforesis en gel de agarosa

Reactivos

- Agarosa (Invitrogen)
- Buffer TBE 10X:
 - Tris Base 108g
 - Ácido Bórico 55g
 - EDTA 0,5M pH 8.0 40mL
 - H₂Od c.s.p. 1L
- Bromuro de etidio (5 mg/ml)
- Loading Buffer:
 - Glicerol 50%
 - Xylene Cyanol 0,25%
 - Azul de Bromofenol 0,25%
 - 50bp DNA ladder (Invitrogen)

Procedimiento

Los productos de PCR obtenidos tanto a partir de ADNc como de ADN fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% (0,8g agarosa en 40mL buffer TBE 0,5X) con bromuro de etidio (5 mg/ml) (2 μ l muestra + 10 μ l *loading* buffer) y visualizados bajo luz UV, para observar la banda correspondiente al segmento VH amplificado. Conjuntamente a la muestra analizada se corrieron los controles positivo y negativo, además de un marcador de peso molecular (ladder ADN 50pb). El tamaño de producto esperado es entre 200-500pb (Figura 20a y b).

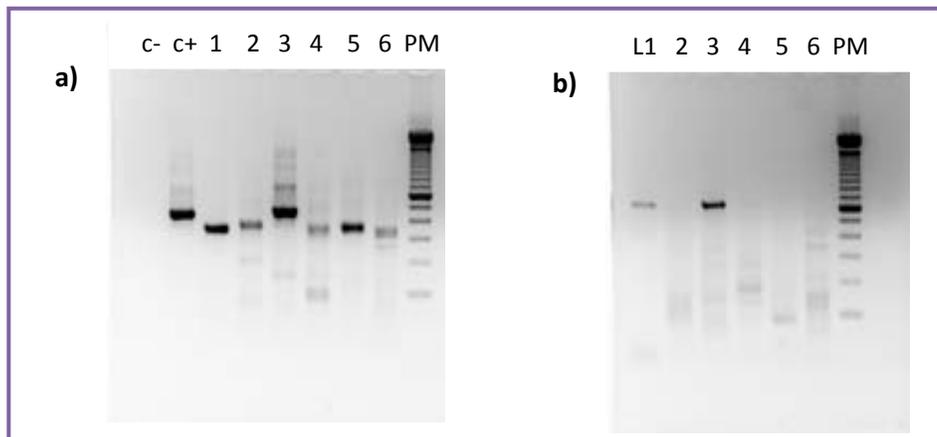


Figura 20. Gel de agarosa al 2% mostrando amplificación por PCR a partir de cDNA de la misma muestra con *primers*: a) VH-JH, mostrando amplificación policlonal, y b) LH-C μ , con definición de segmento LH3. C-: control negativo, C+: control positivo, PM: marcador de peso molecular.

3.2.8.4. Análisis de secuencias

Los productos de PCR fueron secuenciados bidireccionalmente. Luego de comprobar que la secuenciación es informativa, con picos definidos y no superpuestos en el cromatograma, se elige la zona de la secuencia que se va a analizar, que debe encontrarse contenida entre las secuencias de los *primers* utilizados. En la Figura 21 se observa el cromatograma de una secuencia y la zona elegida a partir del mismo:

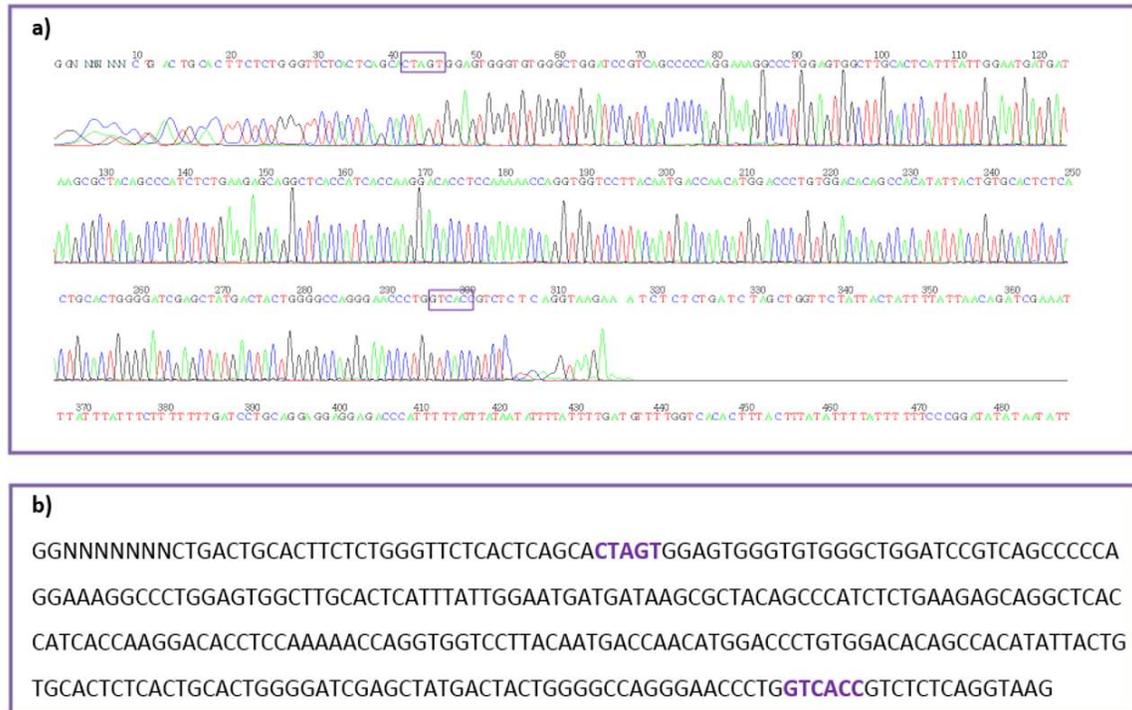


Figura 21. Ejemplo del análisis de una muestra: a) secuenciación automática y b) zona de la secuencia (delimitada en violeta) que se analizó en las bases de datos IMGT e IgBlast.

Las secuencias son luego ingresadas y analizadas mediante las bases de datos ImMunoGeneTics (IMGT; <http://imgt.cines.fr/>) e IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) las cuales permiten identificar los segmentos clonales involucrados y el porcentaje de homología respecto de la línea germinal (Figura 22). Como se mencionó previamente, se consideran M aquellas secuencias *IGHV* con menos del 98% de homología, y como NM aquellas con un nivel de homología mayor o igual al 98%.

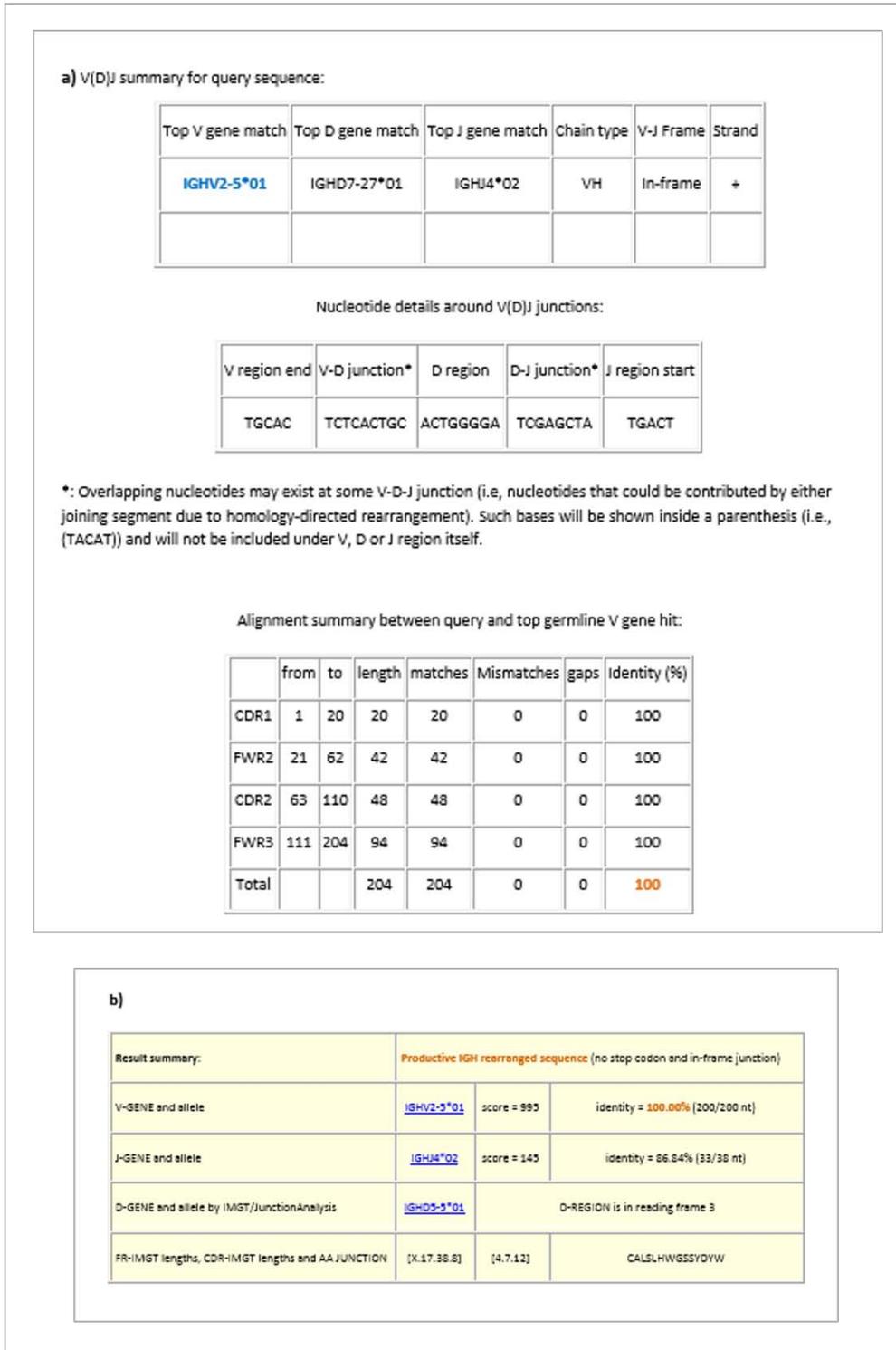


Figura 22. Ejemplo del resultado obtenido del análisis de una secuencia previamente mostrada empleando la base de datos: a) IgBlast y b) IMGT, mostrando los segmentos y subsegmentos V-D-J correspondientes (azul) y el porcentaje de homología (naranja) respecto de la línea germinal.

Para la definición de *clusters* o subsets de secuencias de rearrreglos IGHV-D-J se empleó el criterio establecido por Messmer et al (2004): uso de los mismos rearrreglos V-D-J, del mismo marco de lectura *IGHD* y un MAS (*mean alignment score*) mayor o igual al 60%. Brevemente, para la evaluación de los *clusters*HCDR3, todos los rearrreglos de secuencias *IGHD* en marco de lectura correcto (in-frame) se convirtieron a secuencias aminoacídicas (AA) y se alinearon con las secuencias AA HCDR3 putativas utilizando el software de alineamiento múltiple Clustal Omega. Para este alineamiento se toma la región HCDR3 entre los codones 107-117 (según la numeración IMGT), considerando la presencia de los codones conservados 105-106. Las nomenclaturas de los *clusters* se determinaron según los datos obtenidos por Messmer et al (2004), Stomatopoulos et al (2007), Murray et al (2008) y Bomben et al (2009). Para el análisis de los mismos se establecen pares de alineamientos entre la secuencia incógnica y cada una de las secuencias de los *clusters*. En cada par de secuencias se determina un score de alineamiento, luego se establece el MAS, considerado como el valor medio de todos los scores determinados por Clustal Omega.

3.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente empleando el test de *Mann-Whitney*. El análisis de las variables clínicas y moleculares entre grupos se llevó a cabo mediante los test *t* de Student o Kruskal-Wallis (para variables cuantitativas) y Chi-cuadrado o exacto de Fisher (para variables categóricas). El análisis de sobrevida SV global y SLT entre grupos se realizó mediante el método de *Kaplan-Meier*, en tanto que las diferencias entre las curvas se evaluaron con el *log-rank* test. El período analizado se extendió desde el diagnóstico hasta el comienzo del tratamiento o la última consulta médica. Para todos los test, se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Para el análisis estadístico se utilizó el programa *GraphPad Prism* versión 5.0.

**4. Capítulo Primero:
Análisis de Longitud Telomérica y
su relación con rearrreglos
genómicos**

4.1. Resultados

4.1.1. Pacientes estudiados

En el presente trabajo se realizó la medición de la LT mediante q-PCR en 107 muestras de ADN de pacientes con LLC al momento del diagnóstico (63 hombres; edad media: 64,5 años; rango: 36 a 89 años), que presentaban estudio citogenético y de FISH, efectuado en nuestro laboratorio. En la Tabla 9 se detallan las características clínico-biológicas de los pacientes estudiados:

Tabla 9. Características clínico-biológicas de los pacientes con LLC

Características	Pacientes LLC
Nº de pacientes	107
Sexo F/M	43/64
Edad media (años) (rango)	64,5 (36 - 89)
Estadios clínicos (%)	
Rai 0	34,1%
Rai I-II	51,8%
Rai III-IV	14,1%
Recuento de glóbulos blancos (x10 ⁹ /L) (rango)	41,1 (5,4 - 210)
Linfocitos (%) (rango)	76,4 (34 - 97)
Plaquetas (x10 ⁹ /L) (rango)	213,3 (16,4 - 900)
Hemoglobina (g/dL) (rango)	12,6 (7 - 15,5)
LDH (UI/L) (rango)	371,1 (128 - 882)
β ₂ M (μg/mL) (rango)	3,21 (1,17 - 15)

F: femenino; M: masculino; LDH: lactato deshidrogenasa; β₂M: β₂microglobulina.

4.1.2. Validación de la técnica de q-PCR

En primer lugar se llevó a cabo la validación de la técnica de q-PCR, mediante el análisis de 46 pacientes con LLC que tenían estudios previos de LT por TRF. Para efectuar la conversión de los valores de LT absoluta (kb/genoma diploide) a su valor equivalente de LT por Southern blot (kb) se empleó la fórmula de regresión:

$$y = 0,0746x + 0,5285 \quad \text{donde: } x = \text{Log [LT (q-PCR)]}, \quad y = \text{Log [LT (TRF)]}$$

Este análisis permitió observar una correlación significativa entre ambas metodologías ($p < 0,0026$), haciendo factible continuar nuestro estudio con el empleo de la técnica de q-PCR (Figura 23).

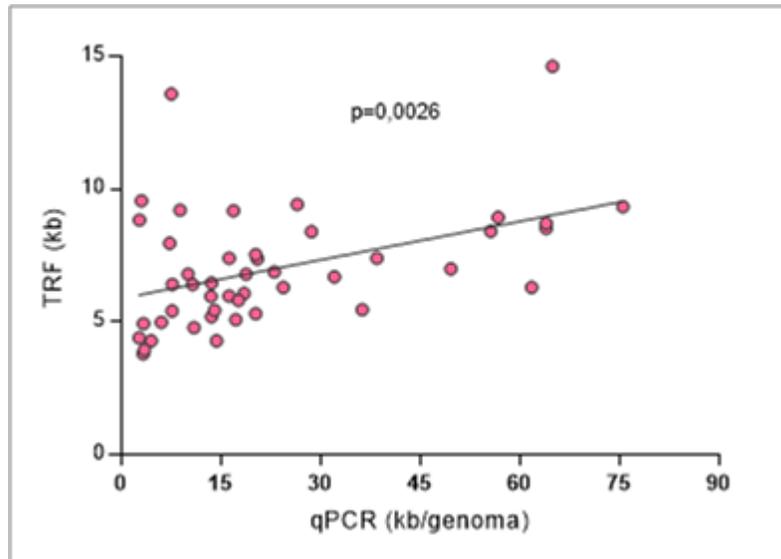


Figura 23. Correlación de la LT entre la metodología q-PCR y el ensayo de TRF ($p=0,0026$).

4.1.3. Análisis de la LT en pacientes con LLC y controles

El análisis de la LT en el total de 107 pacientes con LLC y 61 controles normales (sin antecedentes de neoplasias) (21 varones; edad media: 56,5 años; rango 21-91 años), mostró un acortamiento significativo en los pacientes ($6,80 \pm 0,68$ kb) comparado con el grupo total de controles ($7,26 \pm 0,9$ Kb) ($p=0,0001$) (Figura 24), así como también

respecto de 40 controles pareados por edad (\pm dos años) (16 hombres; edad media: 64,8 años; rango: 34-88 años) ($7,09 \pm 0,48$ kb) ($p < 0,0002$).

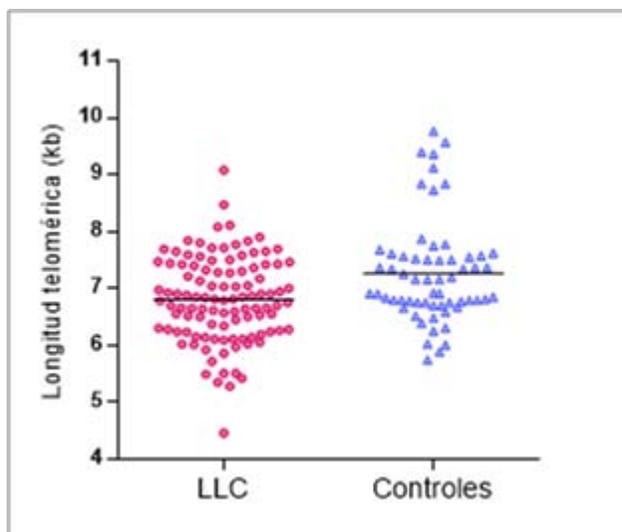


Figura 24: Distribución de la LT en 107 pacientes con LLC y 61 controles normales ($p=0,0001$). Los datos de LT absoluta (kb/genoma diploide) fueron convertidos en su valor equivalente de LT por Southern blot (kb).

4.1.4. Correlación de la LT con la edad

A continuación nos interesó evaluar la LT en función de la edad tanto en individuos normales como en los pacientes con LLC. Esto permitió detectar una correlación positiva en los controles ($p < 0,0001$; $R^2: 0,4545$) (Figura 25), en tanto que los pacientes con LLC no mostraron asociación entre la LT y la edad o el sexo ($p=0,13$ y $p=0,1$, respectivamente), sustentando el concepto que estas dos características tienen poco o ningún efecto sobre la LT de pacientes con esta neoplasia (Ricca et al, 2007; Hoxha et al, 2014).

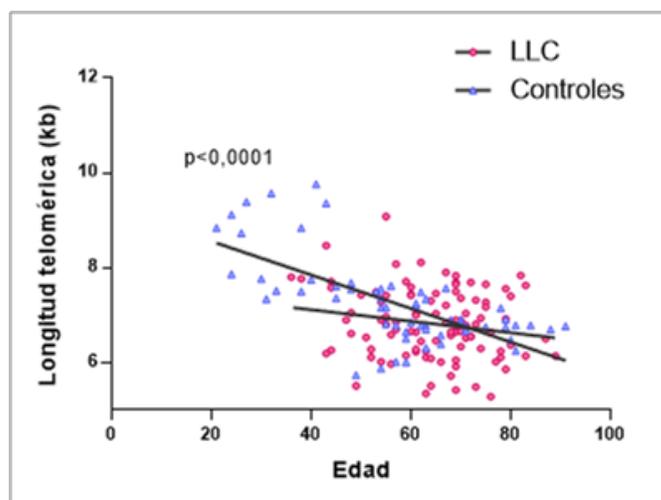


Figura 25. Correlación entre edad y LT en pacientes con LLC (no significativo) y controles ($p < 0,0001$).

4.1.5. Correlación entre LT y alteraciones genéticas

De los 107 pacientes analizados por citogenética, 63 de ellos presentaron cariotipo normal (SA) y los restantes 44 mostraron alteraciones cromosómicas clonales: 14 casos con trisomía 12 (+12) como única alteración y 30 con anomalías numéricas y estructurales (grupo AC: alteraciones cromosómicas). La Figura 26 muestra la distribución de anomalías genéticas por cromosoma en nuestra serie de pacientes.

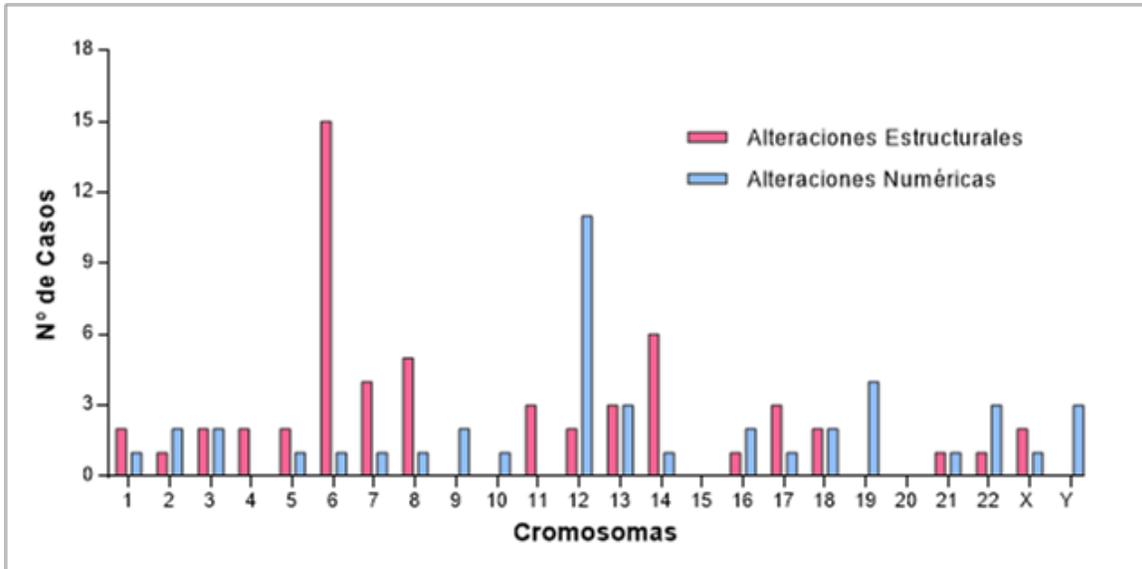


Figura 26. Histograma mostrando la distribución de alteraciones estructurales y numéricas por cromosoma en nuestra cohorte de pacientes con LLC

En este contexto, se efectuó el análisis de la LT de los pacientes con LLC distribuidos acorde a los grupos de riesgo establecidos por FISH y citogenética. El mismo mostró una reducción progresiva del tamaño telomérico desde los casos con del13q14 ($6,99 \pm 0,57$ kb) como única alteración (de buen pronóstico), que presentaron los telómeros más largos, seguido por aquellos sin alteraciones (SA), con +12 (de pronóstico intermedio), y los pacientes con del11q22 y del17p13 (asociados a corta supervivencia) que mostraron los telómeros más cortos. Las LT de los pacientes con del11q22 ($n=10$) ($6,53 \pm 0,68$ Kb), del17p ($n=7$) ($6,48 \pm 0,50$ Kb) y con ambas alteraciones ($n=4$) ($6,34 \pm 0,41$ Kb) no mostraron diferencias significativas, por lo que fueron evaluados como un único grupo denominado del11q/17p ($6,47 \pm 0,56$ Kb). En la Tabla 10 se detallan los grupos de riesgo citogenético analizados, el número de pacientes de cada uno, su distribución por edad y sexo, el cariotipo y la LT observada; 17 casos (22 %) mostraron más de una alteración ($6,43 \pm 0,63$ kb). En esta Tabla se incluye también el grupo de pacientes con alteraciones cromosómicas clonales en el cariotipo, característica asociada a peor evolución clínica.

Tabla 10. Distribución de pacientes con LLC de acuerdo a los grupos de riesgo por FISH y citogenética.

Grupo	Nº de casos (%)	Edad (años)(rango)	Sexo		Cariotipo	Media LT±DS (kb)
			F	M		
del13q14 sola	24 (22,4)	64,3 (36-83)	8	16	Normal	6,99±0,57
Sin alteraciones	18 (16,8)	60,6 (43-87)	12	6	Normal	6,96±0,77
Trisomía 12	14 (13,1)	68,3 (54-76)	5	9	+12	6,56±0,92
del11q/17p	21 (19,6)	66,6 (43-89)	8	13	Normal	6,47±0,56*
Alteraciones cromosómicas	30 (28,0)	63,7 (44-82)	10	20	Anormal	6,89±0,59

*Diferencias significativas entre pacientes con del11q/17p con respecto a los casos con: del13q como única alteración ($p=0,0037$), sin alteraciones ($p=0,028$), y con aberraciones cromosómicas ($p=0,014$). F: femenino; M: masculino; LT: longitud telomérica; DS: Desvío estándar.

El análisis de la LT no mostró diferencias significativas entre los pacientes con del13q14 como única alteración y aquellos SA comparado con los controles. Por el contrario, los casos con del11q/17p presentaron telómeros significativamente más cortos que aquellos con sólo del13q14 ($p=0,0037$), SA ($p=0,028$), no encontrándose diferencias respecto de los casos con trisomía 12. Los pacientes con del11q/17p también mostraron telómeros más cortos que los casos con AC ($p=0,014$) y que el resto de los pacientes en conjunto ($p=0,045$) (Figura 27).

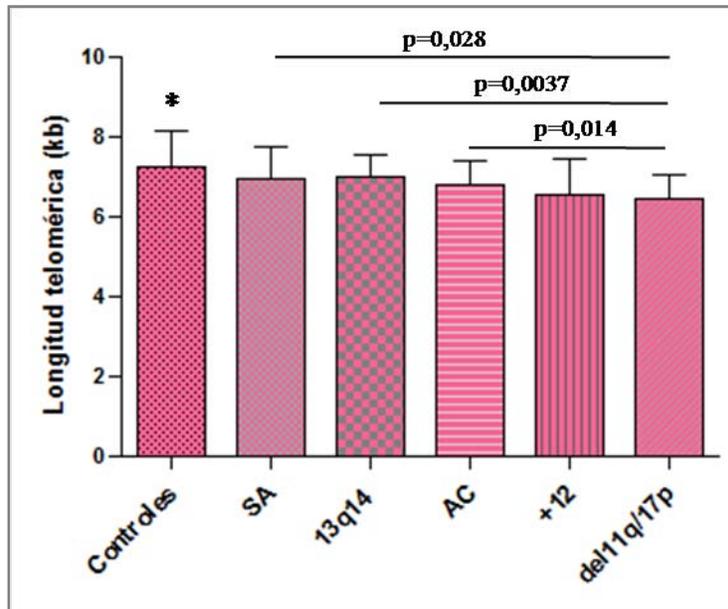


Figura 27. Longitud telomérica en los diferentes grupos de riesgo genético y controles. *Diferencias significativas respecto de del11q/17p, +12 y AC ($p < 0,0001$). LT significativamente acortada en el grupo del11q/17p respecto de SA ($p = 0,028$), del13q14 ($p = 0,0037$) y AC ($p = 0,014$).

Simultáneamente, el análisis considerando el número de alteraciones por FISH reveló una reducción significativa de LT en pacientes con 2 o más anomalías ($6,43 \pm 0,63$ Kb) comparados con aquellos SA ($6,96 \pm 0,77$ Kb) ($p = 0,033$) y con 1 alteración ($6,82 \pm 0,69$ Kb) ($p = 0,045$) (Figura 28).

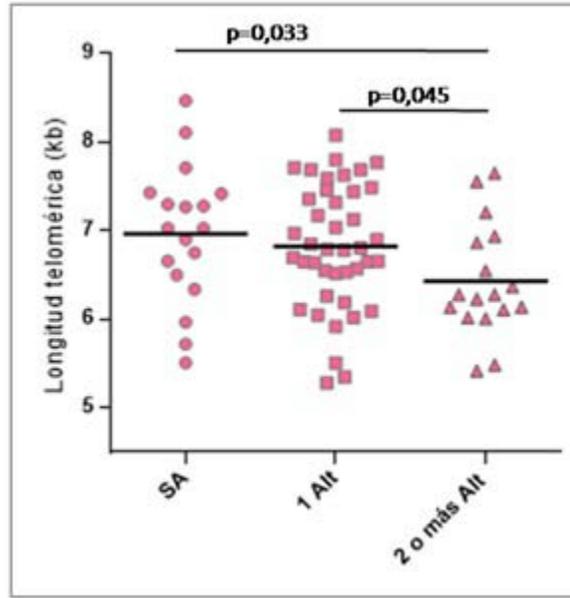


Figura 28. Distribución de LT en pacientes analizados por FISH teniendo en cuenta el número de alteraciones. Diferencias significativas en la media de LT entre los casos con 2 o más alteraciones respecto de aquellos sin alteraciones (SA) ($p=0,033$) y con una alteración (1 Alt) ($p=0,045$). SA: sin alteración; Alt: alteración.

Teniendo en cuenta el análisis citogenético, observamos que el grupo con AC presentó una media de LT significativamente más corta que la población control ($p=0,046$). Cuando éste fue dividido de acuerdo al número de alteraciones, se observó una reducción de la LT desde los casos con una alteración ($6,92\pm 0,66$ Kb), dos alteraciones ($6,83\pm 0,79$ Kb) y tres o más anormalidades ($6,78\pm 0,48$ Kb), aunque sin alcanzar diferencias significativas. Los pacientes con solo una alteración no presentaron diferencias respecto de los controles, mientras que en los casos con dos o más anormalidades se observó un acortamiento telomérico significativo ($6,79\pm 0,56$ Kb) ($p=0,03$). Además, los casos con 2 o más alteraciones mostraron una tendencia a tener telómeros más cortos comparados con el grupo SA/1 alteración ($6,96\pm 0,74$ Kb) (Figura 29).

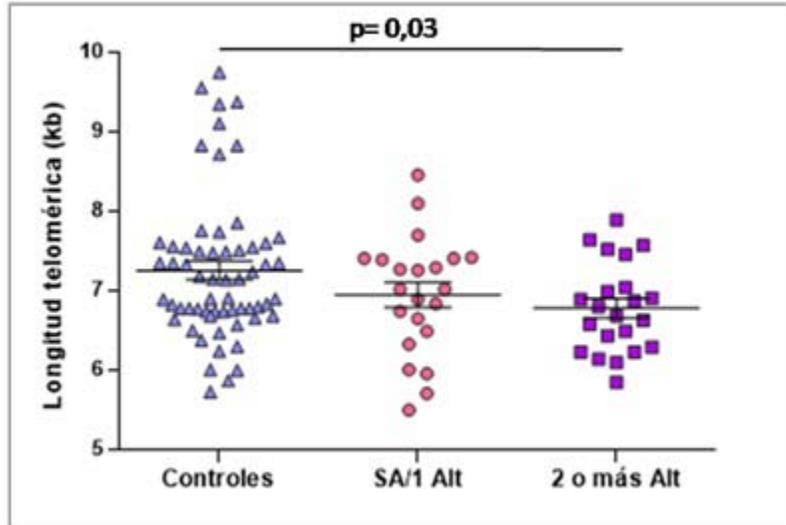


Figura 29. LT de acuerdo al número de alteraciones detectadas por citogenética. SA/1 alt: grupo sin alteraciones o con una sola alteración. Alt: alteraciones.

Asimismo, no se observaron diferencias en las medias de LT entre los casos con dos o más anomalías detectadas por FISH o citogenética y aquellos con delección 11q/17p, sustentando la asociación de ambos parámetros de mal pronóstico (mayor número de alteraciones y presencia de del11q/17p) con el acortamiento telomérico.

Finalmente, utilizando como punto de corte la LT media de los pacientes (6,8 kb), se dividió la cohorte en dos grupos: telómeros cortos (<6,8 kb) y telómeros largos (\geq 6,8 kb), observándose asociación entre los telómeros cortos y anomalías de peor pronóstico (del11q/17p), con diferencias significativas respecto de los casos con del13q14 y SA ($p=0,042$), con AC ($p=0,041$) y toda la población ($p=0,045$) (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de alteraciones genéticas en relación a la LT.

Longitud Telomérica	SA	del13q14	+12	del11q/17p	AC	Total pacientes
Corto (<6.8 kb)	7	10	8	16*	13	53
Largo (≥6.8 kb)	11	14	6	5	17	54

*Diferencias significativas con respecto a del13q14 sola (p=0,042), Sin alteraciones (SA) (p=0,042), aberraciones cromosómicas (AC) (p=0,041) y la cohorte completa (p=0,045).

4.1.6. Correlación con las características clínicas de los pacientes

A fin de evaluar el significado clínico de los resultados obtenidos, se analizaron las características clínico-biológicas de los pacientes en función de la LT (Tabla 12). La evaluación de los factores pronósticos de LLC teniendo en cuenta la presencia de telómeros cortos vs largos no mostró diferencias significativas. El análisis de estos parámetros comparando los casos con dos o más alteraciones por FISH o citogenética con respecto a los pacientes SA/1 alteración mostró una tendencia a mayores niveles de β_2 Microglobulina en el primer grupo respecto del segundo (5,29 $\mu\text{g/mL}$ y 2,88 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (p=0,07).

Tabla 12. Comparación de características clínicas con las alteraciones genómicas.

Características	SA + 1 Alteración	2 o más Alteraciones
Recuento de glóbulos blancos ($\times 10^9/\text{L}$) (rango)	38,8 (5,4 – 185,8)	44,2 (9,5 - 108,6)
Linfocitos (%) (rango)	74,6 (10 - 91)	77,8 (50,9 - 92)
Plaquetas ($\times 10^9/\text{L}$) (rango)	195,9 (73 - 378)	194,8 (110 - 323)
Hemoglobina (g/dL) (rango)	12,8 (10,4 – 15,4)	12,5 (8,2 - 15)
LDH (UI/L) (rango)	381,5 (159 - 607)	363,5 (185 - 606)
$\beta_2\text{M}$ ($\mu\text{g/mL}$) (rango)	2,9 (1,2 - 6)	5,3 (1,3 - 15)

LDH: lactato deshidrogenasa; $\beta_2\text{M}$: β_2 microglobulina

Simultáneamente, se evaluó la evolución clínica de los pacientes. Dicho análisis mostró una SLT significativamente más corta en los casos con 2 o más alteraciones (analizadas por ambas técnicas), respecto de aquellos SA/1 alteración ($p=0,0006$) (Figura 30). Además, si bien no se encontraron diferencias significativas, se observó una reducida SLT en pacientes con telómeros cortos (40 meses) respecto de los que presentaban telómeros largos (96 meses) (Figura 31).

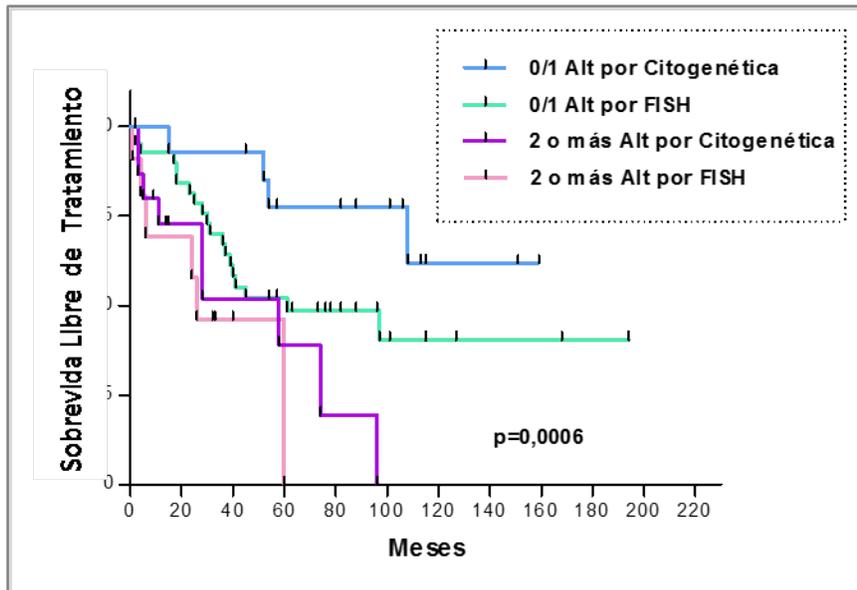


Figura 30. Sobrevida libre de eventos en pacientes con LLC. Se observaron diferencias significativas entre pacientes con 2 o más alteraciones por citogenética o FISH respecto de aquellos sin alteraciones/1 alteración ($p=0,0006$). Alt: Alteraciones.

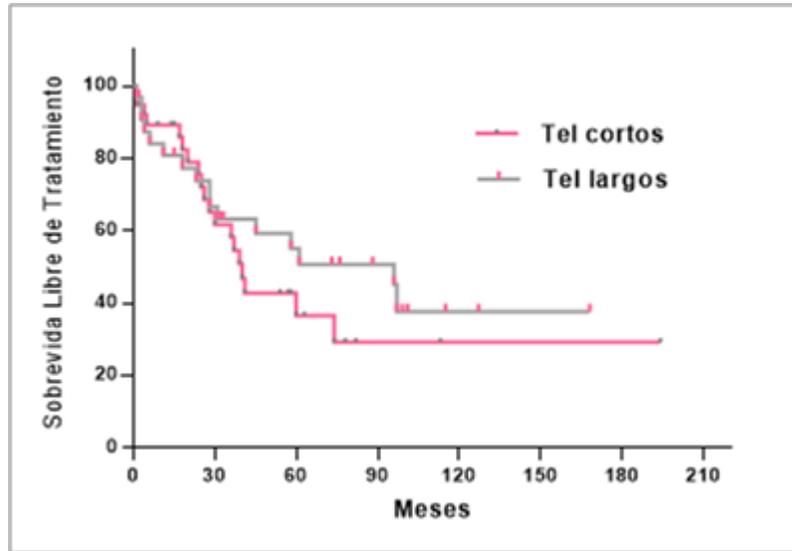


Figura 31. SLT en pacientes con telómeros cortos (40 meses) respecto de aquellos con telómeros largos (96 meses). Tel: telómeros.

4.2. Discusión

Los telómeros disfuncionales han sido relacionados con alteraciones genómicas, incluyendo pérdida de heterocigosidad, disrupción génica y aneuploidía, así como también con el desarrollo de células clonales con un fenotipo tumoral agresivo. En este estudio, hemos analizado la relación entre LT y anomalías cromosómicas detectadas por citogenética convencional y FISH en pacientes con LLC, empleando por primera vez el ensayo de qPCR para cuantificar de forma absoluta la LT, confirmando la utilidad de esta técnica para la evaluación del tamaño telomérico en esta patología.

Nuestros resultados mostraron asociación entre los telómeros cortos y las aberraciones genómicas de alto riesgo así como también con la presencia de 2 o más alteraciones citogenéticas, apoyando hallazgos previos basados en otras metodologías (Roos et al, 2008; Rossi et al, 2009; Lin et al, 2010). A la inversa, los casos de LLC con telómeros largos se caracterizaron por presentar delección 13q14, ausencia de alteraciones citogenéticas o sólo una anomalía, factores asociados a mejor pronóstico. Estos resultados concuerdan con datos previos (Roos et al, 2008; Mansouri et al, 2013),

sustentando que la presencia de telómeros disfuncionales constituye un evento clave en el desarrollo de inestabilidad genómica en los tumores, correlacionado con el incremento de la complejidad genética (Jones et al, 2012).

Al presente, existe escasa información sobre la relación entre telómeros cortos y anomalías cromosómicas detectadas por citogenética convencional. Estudios en mieloma múltiple mostraron asociación entre LT acortada, anomalías cromosómicas y aumento de la frecuencia de las asociaciones teloméricas (Cottliar et al, 2003; Wu et al, 2003), en tanto que no se encontraron diferencias en la LT entre los casos con cariotipos normales y anormales o de acuerdo con diferentes aberraciones genómicas en pacientes con linfoma de células del manto (Cottliar et al, 2009; Jebaraj et al, 2013). Nuestros resultados en LLC apoyan el rol del acortamiento de los telómeros en el origen de la inestabilidad genómica (Lin et al, 2010) y refuerzan datos de la literatura que muestran el valor pronóstico adverso de las alteraciones cromosómicas en esta patología (Mayr et al, 2006; Travella et al, 2013; van de Neste et al, 2007). En esta línea, Mansouri et al (2013) detectaron que el aumento en el número de CNA (*copy number alterations*) detectadas por *array*-SNP (*single nucleotide polymorphism*) de alta resolución, se encontraba correlacionado con la disminución de la LT en pacientes con LLC. Rossi et al (2008) demostraron el rol de los telómeros cortos como predictores independientes de transformación a Síndrome de Richter, proceso asociado a una mayor complejidad genética. Asimismo, Lin et al (2010) observaron una reducción crítica en la LT durante la progresión de la enfermedad asociada a la pérdida de la función de protección terminal de los telómeros (*end-capping function*), fusiones de los extremos de los cromosomas e inestabilidad genómica, y demostraron que los mismos constituyen eventos comunes en pacientes con LLC.

La mayoría de nuestros casos (86%) fueron estudiados en etapas tempranas de la enfermedad. Diferentes autores (Hoxha et al, 2014; Augereau et al, 2011; Lin et al, 2014) hallaron evidencias de daño telomérico en pacientes en estadios iniciales de la LLC, sugiriendo que el acortamiento de los telómeros podría ser un posible marcador de

progresión clínica. Además, Ricca et al (2007) demostraron que la LT no siempre es estable en el tiempo, indicando que la misma estaría influenciada por la historia natural de la enfermedad. De acuerdo con estos hallazgos, tres pacientes de nuestra serie fueron estudiados al diagnóstico y durante la evolución clonal, mostrando una clara reducción en su LT (datos no mostrados), sustentando que la disfunción telomérica es un evento importante en la acumulación de alteraciones cromosómicas durante la progresión clínica. Un estudio reciente (Mansouri et al, 2013) también detecta modificaciones en la LT durante el curso de la enfermedad, observando que los casos con LT mayores al momento del diagnóstico tuvieron un mayor desgaste de los extremos cromosómicos, mientras que los pacientes con telómeros cortos podían mostrar incremento en su LT. No obstante, resulta importante evaluar un mayor número de casos para clarificar estos hallazgos.

Simultáneamente, nuestros resultados no mostraron diferencias en la LT al comparar los casos con dos o más anomalías y los pacientes con deleciones 11q/17p, respaldando la asociación de telómeros cortos con alteraciones cromosómicas en LLC. Como se sabe, alteraciones genómicas como 11q/17p determinan ventajas en la supervivencia y el aumento de la proliferación celular promoviendo la erosión de los telómeros (Kienle et al, 2005). Del mismo modo, en los casos de LLC con complejidad genómica, se observó una rápida cinética de progresión, documentada por un corto tiempo de duplicación linfocitaria, menores tiempos de progresión a una etapa más avanzada y un incremento en los marcadores de proliferación, lo cual indica la importancia de la disfunción telomérica en la generación de inestabilidad genómica y evolución clonal en esta patología. En este contexto, Brugat et al (2010) hallaron en pacientes con LLC con evolución clínica desfavorable, un subgrupo de células con rearrreglos teloméricos asociados a disfunción de los extremos cromosómicos, múltiples aberraciones citogenéticas y medias de LT muy cortas.

En referencia a las características clínicas, nuestros resultados mostraron una SLT significativamente más corta en los pacientes con 2 o más alteraciones en comparación con aquellos SA más una anomalía, sustentando una fuerte correlación entre los

telómeros cortos y la complejidad genética, y mostrando su impacto en la evolución clínica. Estos datos concuerdan con estudios previos, incluyendo los de nuestro grupo, que muestran el significado clínico adverso de las anomalías cromosómicas y los cariotipos complejos en la LLC (Mayr et al, 2006; Haferlach et al, 2007; Travella et al, 2013), y refuerzan la importancia de identificar este subgrupo de pacientes en el diseño de estrategias de tratamiento adaptadas al grupo de riesgo (Rigolin et al, 2012). Además, aunque no se encontraron diferencias significativas, se observó una SLT más corta en los casos con LT menores a la media de los pacientes respecto de los casos con telómeros largos. Estos resultados están en concordancia con datos previamente publicados (Sellman et al, 2011; Mansouri et al, 2013; Hoxha et al, 2014; Lin et al, 2014), apoyando la participación de la disfunción telomérica en la progresión de la enfermedad. Sin embargo, en un análisis multivariado la LT no mostró ser un factor pronóstico independiente para la supervivencia global y el tiempo al primer tratamiento (Mansouri et al, 2013; Hoxha et al, 2014), hallazgo que podría estar relacionado con su fuerte asociación con factores de riesgo desfavorables para la LLC.

En conclusión, nuestros resultados sustentan la asociación del acortamiento de los telómeros con aberraciones genéticas y complejidad genómica, detectadas por FISH o citogenética convencional en LLC e indican la importancia de la disfunción telomérica en el desarrollo de la inestabilidad genómica en esta patología. Sin duda, la evaluación de la LT resulta de importancia no sólo en la comprensión de las características biológicas de la enfermedad, sino que también proporciona información de valor pronóstico, así como la posibilidad de elegir la mejor población de pacientes pasibles de beneficiarse con los nuevos enfoques terapéuticos con inhibidores de la telomerasa. Asimismo, cabe destacar que el presente es el primer estudio de LT en LLC empleando la técnica de qPCR, confirmando su utilidad en el análisis del acortamiento telomérico presente en la patología.

**5. Capítulo Segundo:
Estatus mutacional de los genes
IGHV y telómeros**

5.1. Resultados

5.1.1. Características generales

El estudio del perfil mutacional de los genes *IGHV*, empleando PCR específica para cada familia VH y posterior secuenciación directa, se llevó a cabo en un total de 69 pacientes con LLC (41 varones; edad media: 64,3 años; rango: 36-87 años). Del total de pacientes evaluados, 49 fueron estudiados a partir de ARN y 20 a partir de ADN. En la Tabla 13 se detalla la edad, sexo, estadio clínico al diagnóstico, estado mutacional y rearrreglos *IGHV-D-J*. Entre estos, 40 (57,97%) fueron M (<98% de homología respecto de la línea germinal) mientras que los 29 restantes (42,03%) fueron $\geq 98\%$ (de homología). Un único paciente presentó doble rearrreglo (caso 53). Asimismo, entre los casos NM el 72,4% de las secuencias fueron completamente NM (100% homología), 10,4% fueron mínimamente NM (99-99,9%) y 17,2% *borderline* (98-98,9%). Respecto de los pacientes M, 87,5% de los casos mostraron secuencias con <96% de homología y 12,5% entre 96-97,9%. La media de edad fue mayor para los pacientes con LLC M (65,18 años) respecto de los NM (63,28 años), observándose una mayor proporción de varones en ambos grupos (55% y 65,5%, respectivamente). La distribución por estadios Rai mostró una mayor frecuencia de casos en estadio 0 en las LLC M (39,4%) respecto de las NM (23,8%).

Tabla 13. Análisis del estado mutacional y los rearrreglos de *IGHV* de 69 pacientes con LLC

Caso	Edad/ Sexo	Estadio Rai	Gen VH	Segmento DH	Segmento JH	Homología (%)
1	44/M	I	V4-59*07	D2-15*01	J6*02	M (87,9)
2	36/F	ND	V1-3*01	D5-24*01	J3*02	M (88,5)
3	64/M	I	V3-23*01	D4-17*01	J6*02	M (89,0)
4	57/M	III	V3-23*01	D2-15*01	J4*02	M (90,3)
5	71/F	I	V4-34*01	D3-9*01	J6*02	M (90,6)
6	43/M	0	V3-21*04	D5-18*01	J4*02	M (90,9)
7	83/F	II	V3-7*03	D6-13*01	J5*02	M (91,0)
8	80/M	0	V3-72*01	D3-22*01	J3*02	M (91,0)

Estatus mutacional de los genes IGVH y Telómeros

9	64/M	0	V3-33*01	D3-10*01	J4*02	M (91,7)
10	70/M	0	V3-7*01	D4-17*01	J3*01	M (92,0)
11	69/M	I	V3-7*03	D2-08*01	J4*02	M (92,0)
12	56/F	0	V4-34*01	D2-15*01	J6*02	M (92,0)
13	79/F	II	V4-61*02	D5-18*01	J3*02	M (92,3)
14	68/F	0	V3-23*01	D3-22*01	J6*01	M (92,4)
15	73/F	IV	V4-34*01	D5-18*01	J6*02	M (92,4)
16	49/F	ND	V3-48*02	D2-8*02	J4*02	M (92,5)
17	64/M	ND	V4-59*1	D6-19*01	J1*01	M (92,6)
18	55/F	IV	V3-23*01	D2-2*01	J4*02	M (92,7)
19	74/F	I	V3-7*03	D3-22*01	J4*02	M (93,0)
20	59/M	0	V3-74*01	D4-23*01	J3*02	M (93,0)
21	69/M	IV	V3-15*01	D2-21*01	J4*02	M (93,0)
22	72/F	0	V3-30*04	D3-22*01	J4*02	M (93,4)
23	60/M	II	V3-7*01	D6-19*01	J3*02	M (93,5)
24	67/M	III	V1-69*13	D3-10*01	J6*02	M (93,5)
25	60/M	ND	V3-7*01	D6-19*01	J3*02	M (93,5)
26	47/M	I	V4-59*01	D3-22*01	J4*02	M (93,8)
27	75/F	ND	V5-51*01	D2-2*01	J5*02	M (94,1)
28	71/F	I	V3-21*01	D3-16*01	J4*02	M (94,2)
29	79/F	II	V3-43*01	D4-17*01	J4*02	M (94,3)
30	68/M	0	V3-72*01	D2-26*01	J6*02	M (95,0)
31	63/F	0	V4-59*03	D6-13*01	J4*01	M (95,0)
32	75/M	I	V3-74*01	D6-13*01	J6*13	M (95,0)
33	65/F	0	V4-59*03	D6-13*01	J4*01	M (95,0)
34	79/M	I	V3-74*01	D6-13*01	J6*13	M (95,0)
35	55/F	II	V4-59*08	D3-22*01	J4*02	M (95,3)
36	83/M	IV	V3-23*01	D6-19*01	J1*01	M (95,8)
37	60/M	0	V7-4*1*01	D4-11*01	J4*02	M (96,5)
38	60/M	ND	V4-61*02	D4-23*01	J4*02	M (96,5)
39	87/F	0	V3-21*01	D1-26*01	J6*02	M (96,8)
40	52/M	ND	V5-51*01	D3-10*01	J6*02	M (96,9)
41	52/M	III	V4-4*07	D3-3*02	J4*02	NM (98,0)
42	48/M	ND	V3-7*01	D3-22*01	J6*03	NM (98,4)
43	63/M	ND	V3-21*01	D5-24*01	J6*02	NM (98,4)
44	70/M	0	V4-61*02	D5-18*01	J6*02	NM (98,5)
45	69/M	I	V3-66*01	D1-26*01	J1*01	NM (98,5)

46	71/F	0	V3-23*01	D3-10*01	J5*02	NM (99,0)
47	80/F	II	V3-21*01	D3-22*01	J6*02	NM (99,0)
48	75/M	IV	V3-21*01	D3-3*01	J6*02	NM (99,5)
49	69/F	II	V3-74*01	D3-22*01	J5*02	NM (100)
50	54/M	III	V1-69*01	D3-3*01	J6*03	NM (100)
51	57/M	II	V3-11*01	D3-3*01	J3*02	NM (100)
52	69/F	0	V5-51*01	D5-24*01	J6*02	NM (100)
53#	65/F	II	V3-33*01/ V1-46*01	D2-2*02/ D6-13*01	J3*02/ J4*02	NM (100)
54	61/M	II	V1-69*01	D3-3*01	J6*02	NM (100)
55	65/M	0	V3-48*03	D3-22*01	J5*02	NM (100)
56	54/F	IV	V1-58*01	D3-16*01	J3*02	NM (100)
57	62/F	II	V4-59*02	D3-3*01	J5*02	NM (100)
58	53/M	II	V1-69*01	D3-3*01	J6*02	NM (100)
59	56/M	II	V3-23*01	D3-10*01	J4*02	NM (100)
60	51/M	I	V3-49*03	D3-3*01	J4*02	NM (100)
61	38/M	II	V3-21*02	D5-12*01	J6*02	NM (100)
62	72/M	I	V3-48*01	D2-8*01	J5*02	NM (100)
63	73/M	ND	V1-3*01	D6-19*01	J4*02	NM (100)
64	64/F	ND	V3-23*01	D3-3*01	J4*02	NM (100)
65	63/M	0	V3-33*01	D3-22*01	J4*02	NM (100)
66	69/F	ND	V1-2*04	D3-16*01	J3*02	NM (100)
67	68/M	ND	V3-11*01	D3-16*02	J4*02	NM (100)
68	69/M	ND	V1-69*02	D2-2*01	J5*02	NM (100)
69	76/F	ND	V3-71*03	D1-20*01	J6*03	NM (100)

ND: No Determinado. F: Femenino. M: Masculino; # doble rearreglo.

5.1.2. Análisis de los rearreglos *IGHV-D-J*

5.2.2.1. Distribución de familias y genes *VH*

Con respecto a las familias *IGHV*, encontramos que la más frecuentemente utilizada en nuestra serie fue *IGHV3* (60% de los casos), seguida por *IGHV4* (20%), *IGHV1* (14,29%), *IGHV5* (4,28%) e *IGHV7* (1,43%), no hallándose expresión de las familias *IGHV2* e *IGHV6* (Figura 32a). Los casos que expresaban las familias *IGHV3* e *IGHV4*

presentaron una mayor frecuencia de LLC-M (57,1% y 78,6%, respectivamente). En contraste, el 80% de pacientes con *IGHV1* fueron LLC-NM, con diferencias significativas respecto de *IGHV4* ($p=0,0111$) y de la serie entera ($p=0,0167$).

En referencia al uso de los genes *IGHV*, en nuestra serie encontramos representados 26 de los 42 segmentos funcionales descriptos (Matsuda et al, 1998). Los segmentos más frecuentemente utilizados fueron: *IGHV3-23* (11,42%), *IGHV3-7*, *IGHV3-21* y *IGHV4-59* (10% cada uno), seguido por *IGHV1-69* (7,1%) e *IGHV4-34* (4,3%) (Figura 32b); en conjunto los mismos representaron el 58% de los genes expresados. Asimismo, se pudo observar que el gen *IGHV1-69* estuvo asociado al estatus NM (75% de los casos, todos ellos con 100% de homología). En tanto que *IGHV3-7* e *IGHV4-59* se relacionaron al estatus M (85,7% en ambos casos), todos con homología menor al 96%, respecto de la línea germinal.

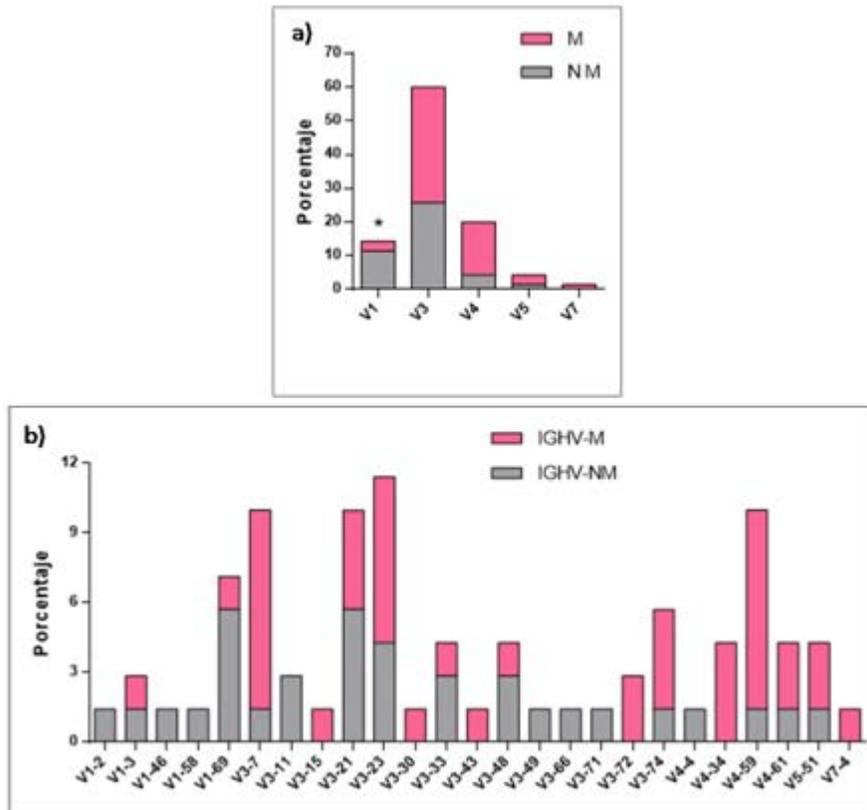


Figura 32. a) Distribución de rearrreglos en pacientes con LLC Mutados (M) y No Mutados (NM) para cada familia IGHV con diferencias significativas para *IGHV1* respecto de *IGHV4*

($p=0,0111$) y de la serie entera ($p=0,0167$); b) Genes *IGHV* usados en nuestra serie de pacientes con LLC y su distribución acorde al estatus mutacional.

5.1.2.2. Distribución de familias y genes *DH*

El análisis de las familias *IGDH* mostró la siguiente distribución: *IGHD3* (42,9%), *IGHD2* (17,1%), *IGHD6* (15,7%), *IGHD5* (11,4%), *IGHD4* (8,6%) e *IGHD1* (4,3%) (Figura 33a), observándose un mayor uso de la familia *IGHD3* en las LLC-NM (63,33%), con diferencias significativas respecto de *IGHD2* ($p=0,04$) e *IGHD6* ($p=0,0148$) y del total de la serie ($p=0,0113$). Asimismo, 20 de los 26 diferentes segmentos *IGHD* (Matsuda et al, 1998) fueron expresados en nuestros casos, siendo el más frecuentemente utilizado *IGHD3-22* (15,71%), seguido por *IGHD3-3* (12,85%), *IGHD6-13* (8,57%), *IGHD6-19* e *IGHD3-10* (7,14% cada uno), representando entre todos el 51,43% de los mismos (Figura 33b). Los genes *IGHD6-13* y *IGHD6-19* mostraron mayor frecuencia de casos M (83,3 y 80%, respectivamente), en tanto que el gen *IGHD3-3* se encontró asociado únicamente a *IGHV*-NM.

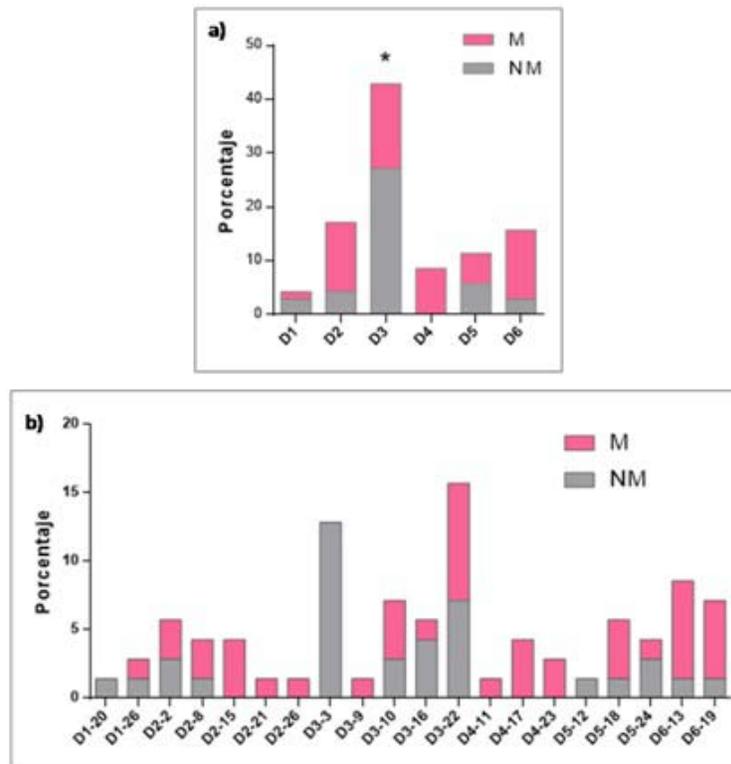


Figura 33. a) Distribución de familias *IGHD* en pacientes con LLC Mutados (M) y No Mutados (NM). *Diferencias significativas en la frecuencia de *IGHD3* respecto del resto de la serie ($p=0,0068$). b) Distribución de los segmentos *IGHD* en pacientes con LLC M y NM.

5.1.2.3. Distribución de familias y genes *JH*

Con respecto a los segmentos IGHJ, el más frecuentemente utilizado fue IGHJ4 (35,71%), seguido de IGHJ6 (32,86%), IGHJ3 (15,71%), IGHJ5 (11,43%) e IGHJ1 (4,28%), no habiéndose detectado ningún caso IGHJ2 (Figura 34a). El segmento IGHJ4 se encontró asociado a pacientes M (68%), con diferencias significativas respecto de IGHJ5 ($p=0,0473$). Por su parte IGHJ6 mostró una distribución similar de casos M y NM (52,17% y 47,82%, respectivamente). En cuanto a los genes, *IGHJ4*02* (32,86%) fue el más frecuentemente utilizado en nuestra serie, seguido de *IGHJ6*02* (24,29%), *IGHJ3*02* (14,29%) e *IGHJ5*02* (11,43%) (Figura 34b).

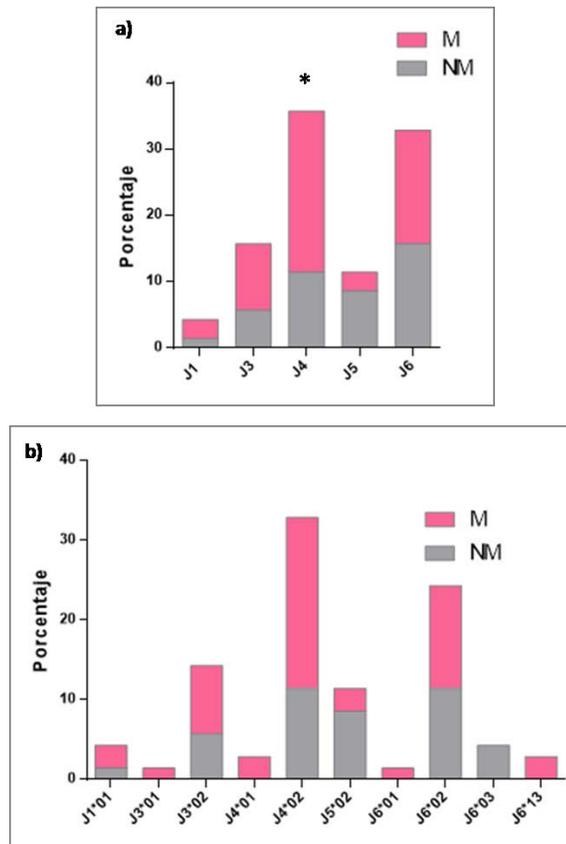


Figura 34. **a)** Distribución de los segmentos IGHJ en pacientes con LLC Mutados (M) y No Mutados (NM). *Diferencias significativas entre IGHJ4 e IGHJ5 ($p=0,0473$). **b)** Genes *IGHJ* utilizados en nuestra serie y su distribución acorde al estatus mutacional.

5.1.2.4. Análisis de receptores estereotipados

El análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de los HCDR3 en nuestros pacientes se efectuó tomando como referencia las series publicadas por Bomben et al (2009), Messmer et al (2004) y Hazdimistrou et al (2011). Esta evaluación mostró la presencia de receptores estereotipados en seis casos (8,7%) (Tabla 14). Dos de ellos expresaron *IGHV4-34*, uno correspondiente al cluster #4 de Bomben et al (2009), dos fueron *IGHV3-21*, ambos del cluster #2 de Mesmer et al (2004), y los dos restantes expresaron *IGHV4-59*1* (cluster 77; Hazdimistrou et al, 2011) e *IGHV1-69*; cuatro de los seis pacientes (66,7%) fueron mutados. A su vez, 5/6 casos (83,3%) utilizaron *IGHJ6*. La evaluación de las secuencias HCDR3 en estos pacientes mostró una longitud media de 18,6 aminoácidos (aa) (rango: 11-26 aa), con una media de HCDR3 más larga en la familia IGHV4 (21,3 aa) respecto de IGHV3 (11 aa). Con respecto a los genes *IGHV*, si bien son muy pocos pacientes, se observó mayor longitud en los casos con expresión de *IGHV4-34* (media: 24 aa) respecto de aquellos que expresaban *IGHV3-21* (media: 11 aa).

Tabla 14. Secuencias HCDR3 de pacientes con LLC con receptores estereotipados.

Caso	Gen VH	DH	JH	Homología (%)	Secuencia HCDR3	Longitud de la secuencia (aa)	Cluster Bomben (2009)	Cluster Mesmer (2004)	Cluster Hadzidimitriou (2011)
12	V4-34*01	D2-15*01	J6*02	M (92)	CAGRFYCSGATCLSS QYYYYSGLDVW	26	-	-	16
15	V4-34*01	D5-18*01	J6*02	M (92,4)	CARGYPDTPVERRYY YYGLDIW	22	4	-	4
17	V4-59*1	D6-19*01	J1*01	M (92,6)	CARGPHTSGWNALQ HW	16	-	-	77
39	V3-21*01	D1-26*01	J6*02	M (96,8)	CTRDANGMDVW	11	-	2	2
47	V3-21*01	D3-22*01	J6*02	NM (99,0)	CAGDRNAMDVW	11	2	2	2
54	V1-69*01	D3-3*01	J6*02	NM (100)	CARPKDSYDFWSGY HVLYYYYGMDVW	26	7	9	7H

M: Mutado; NM: No Mutado.

5.1.3. Correlación del estatus mutacional con la LT

Una vez caracterizada nuestra población de pacientes, evaluamos si existía asociación entre el estatus mutacional y los rearrreglos de *IGHV* con la LT. Dicho análisis mostró telómeros más cortos tanto en los pacientes con LLC M ($7,04\pm 0,53$ kb) como NM ($6,79\pm 0,72$ kb) respecto de controles ($7,26\pm 0,9$ Kb), con diferencias significativas con este último grupo ($p=0.017$) (Figura 35). Si bien los pacientes con LLC-NM presentaron menor LT que los M, no se alcanzaron diferencias significativas entre ambos grupos. Un análisis más detallado de la LT de cada grupo, mostró una distribución similar de telómeros largos (TL) y cortos (TC) para ambos: *IGHV* M (TC: 40%, TL: 60%) e *IGHV* NM (TC: 48,3%, TL: 51,7%).

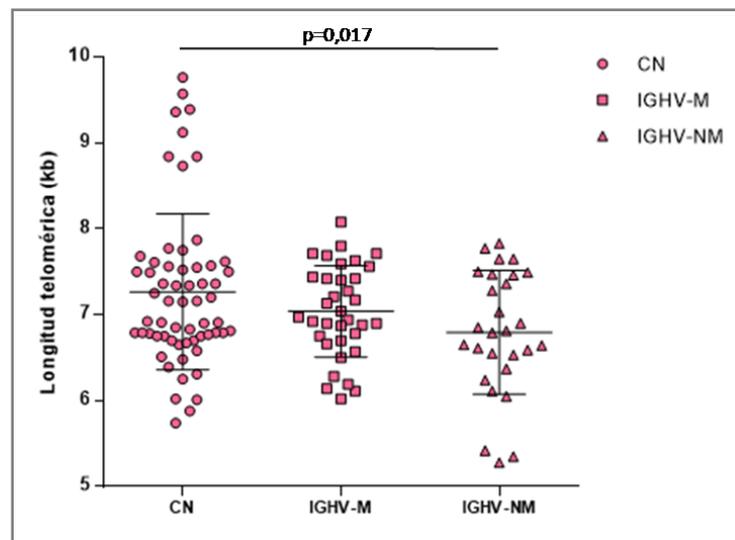


Figura 35. Longitud telomérica en pacientes con *IGHV* Mutado (M), No Mutado (NM) y controles.

Posteriormente evaluamos la LT en las familias más representadas observando los siguientes valores: VH1 ($7,01\pm 0,66$ kb), VH3 ($6,88\pm 0,69$ kb), y VH4 ($6,72\pm 0,8$ kb) (Figura 36).

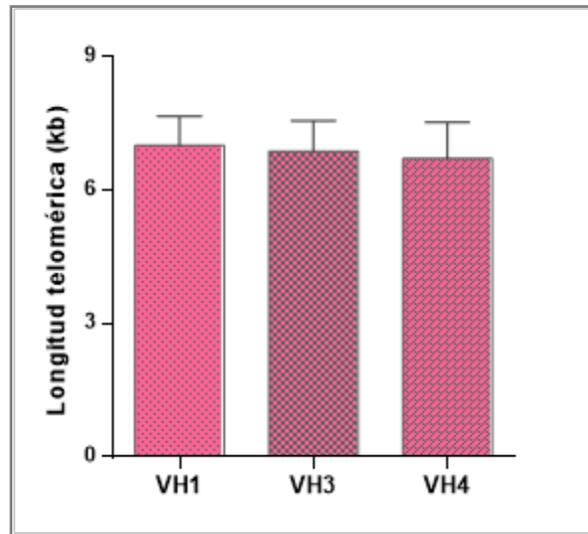


Figura 36. Longitud telomérica en las familias más representadas de nuestros pacientes con LLC.

En cuanto a los genes más frecuentemente expresados, encontramos las longitudes medias más largas en los casos que expresaban *IGHV3-74* ($7,56 \pm 0,28$ kb) e *IGHV4-59* ($6,99 \pm 0,76$ kb), y las más cortas en *IGHV4-34* ($6,07 \pm 0,63$ kb), en tanto que los pacientes que expresaban los segmentos *IGHV1-69* ($6,54 \pm 0,78$ kb) e *IGHV3-21* ($6,69 \pm 0,85$ kb) mostraron LT intermedias (Figura 37).

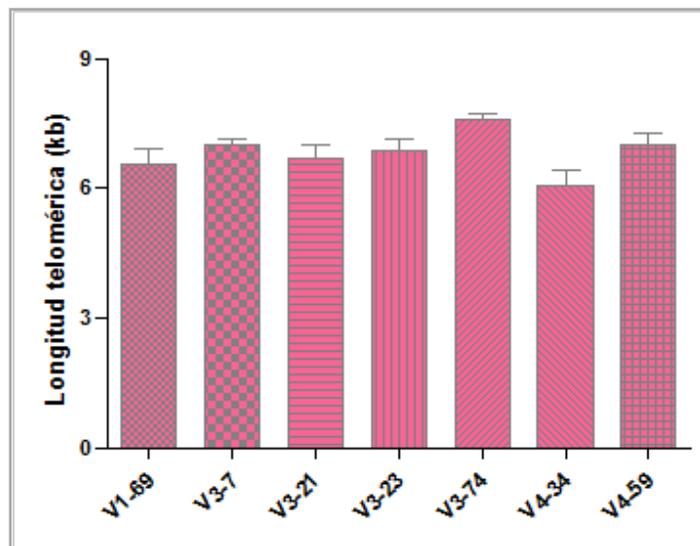


Figura 37. Longitud telomérica en los genes *IGHV* más frecuentes de nuestra población.

Al evaluar la LT en función de los distintos genes, pudimos observar que aquellos que expresaban *IGHV3-21*, asociado a mal pronóstico, presentaron mayor proporción de telómeros cortos. En cuanto a los restantes genes, los pacientes con *IGHV3-74* presentaron únicamente telómeros largos, en tanto que aquellos que expresaban *IGHV4-34* mostraron solamente telómeros cortos (Figura 38), por su parte los casos con *IGHV4-59* mostraron mayor proporción de telómeros largos.

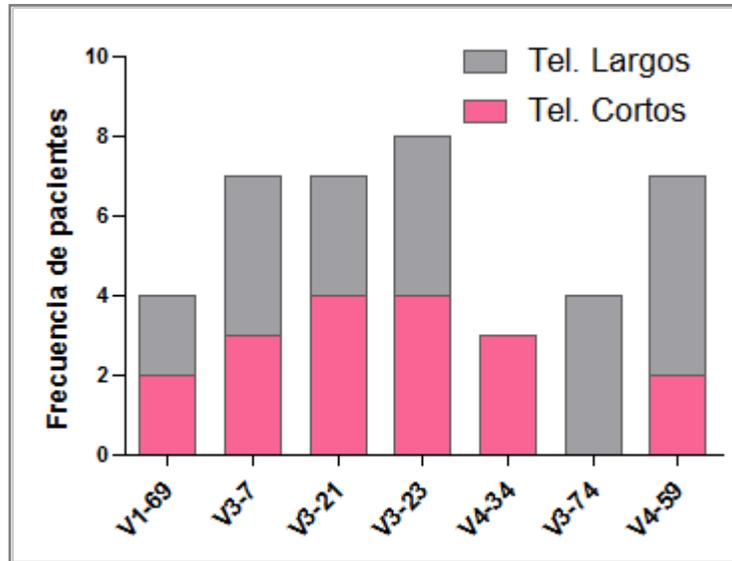


Figura 38. Distribución de telómeros cortos y largos en los genes *IGHV* más representados.

5.1.4. Correlación del estatus mutacional de *IGHV* con las características clínicas de los pacientes

Simultáneamente, analizamos las características clínicas de los pacientes con *IGHV* M y NM, observándose un aumento en el recuento de glóbulos blancos, el porcentaje de linfocitos, los niveles de LDH y β_2 M, así como una disminución en el recuento de plaquetas en los casos NM respecto de los mutados, con diferencias significativas para el recuento de glóbulos blancos ($p=0,0252$) (Tabla 15).

Tabla 15. Comparación de las características clínicas de los pacientes con IGHV-M y NM.

Características	IGHV-M	IGHV-NM
Recuento de glóbulos blancos (x10 ⁹ /L) (rango)	39,2 (7,3- 210)	59,6 (9,5-185,9)*
Linfocitos (%) (rango)	78,7 (50,9-97)	79,3 (33-95)
Plaquetas (x10 ⁹ /L) (rango)	199 (10-900)	179,2 (39-323)
Hemoglobina (g/dL) (rango)	12,7 (7,6-15,5)	12,6 (8,2-14,7)
LDH (UI/L) (rango)	371,7 (128-647)	414,6 (133-882)
β ₂ M (μg/mL) (rango)	2,8 (1,2-6)	4,5 (1,1-15)

LDH: Lactato deshidrogenasa; β₂M: β₂ Microglobulina. * p=0,0252

Asimismo, se efectuó el análisis de la evolución clínica de los pacientes, observándose una disminución en la SLT y SV global en los casos NM (61 meses y 108 meses, respectivamente) respecto de los M (97 meses y 228 meses, respectivamente) con diferencias significativas en la SV global (p<0,0001) (Figura 39).

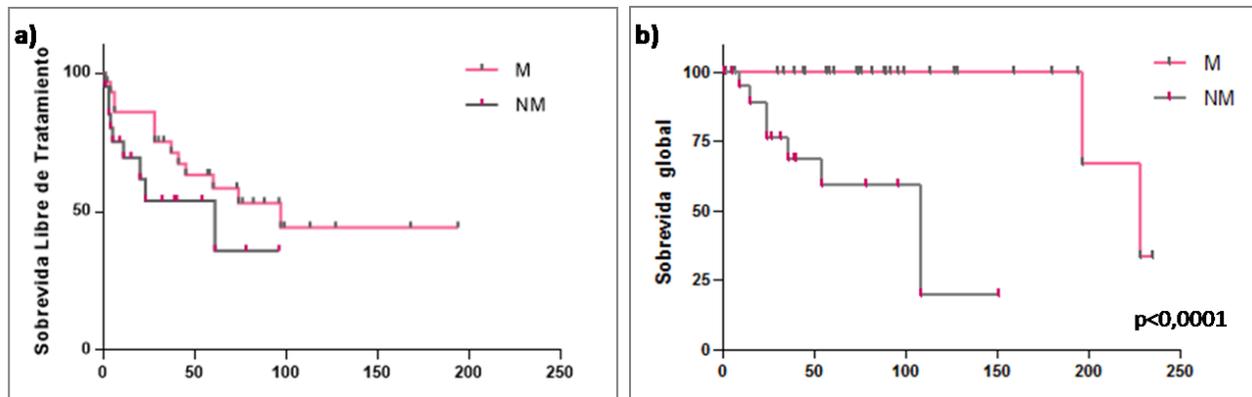


Figura 39. Análisis de sobrevida en pacientes con LLC M y NM. a) Sobrevida libre de tratamiento; b) Sobrevida global (p<0,0001)

5.2. Discusión

En el presente capítulo se efectuó la caracterización del estatus mutacional y los rearrreglos de *IGHV-D-J* de nuestra serie de pacientes con LLC y su relación con la LT. Como es sabido, el repertorio de genes *IGHV* en LLC ha demostrado estar sesgado tanto a nivel de las familias como de los genes utilizados, mostrando asimismo importantes variaciones étnicas y geográficas.

Nuestros resultados presentaron una proporción de casos M y NM concordante con lo observado en series de otras poblaciones (Duke et al, 2003; Maurer et al, 2005; Stamatopoulos et al, 2007), confirmando que, en al menos la mitad de los casos, los genes *IGHV* poseen un número relevante de mutaciones somáticas. La evaluación del uso de las distintas familias *IGHV* mostró una distribución *IGHV3>IGHV4>IGHV1*, similar a la descrita para Uruguay (Bianchi et al, 2010). La misma resultó diferente a la encontrada en países de occidente (Duke et al, 2003; Widhopf et al, 2004; Stamatopoulos et al, 2007), los cuales tienen una mayor representación de la familia *IGHV3*, seguida de *IGHV1* e *IGHV4*. Cabe señalar que esta distribución *IGHV3>IGHV4>IGHV1* caracteriza a las series de Asia, aunque con porcentajes diferentes para *IGHV1* e *IGHV4* (Ikematsu et al, 1994; Koiso et al, 2006; Hojjat-Farsangi et al, 2007; Chen et al, 2008b), y se la observa también en el único estudio publicado de Brasil, con un escaso número de pacientes (Pimentel et al, 2008). Las diferencias observadas respecto de los datos de Brasil resultan de interés, pudiendo reflejar variaciones de origen genético y/o la influencia de factores ambientales. En este aspecto, sabemos que la población Argentina posee contribuciones ancestrales tanto de población europea (mayormente de la zona mediterránea) (79%), como amerindia (17%) y africana (4%) (Seldin et al, 2007; Avena et al, 2012). Simultáneamente, la estructura genética de la población brasilera es marcadamente distinta, con un alto grado de mezcla entre individuos de distintos orígenes étnicos con variaciones genotípicas importantes (Ghiolo et al, 2012), lo que sustentaría los resultados observados. En cuanto a la baja representación de las familias *IGHV5* e *IGHV7* así como la ausencia de expresión de *IGHV2* e *IGHV6* en nuestra serie también fueron observadas en otros estudios, independientemente del origen étnico de la serie

(Tabla 16). En cuanto a la diferente distribución de HMS, la misma podría reflejar diferencias en los tipos de antígenos con los que han interactuado las células B individualmente antes de su transformación leucémica o bien diferencias en los estadios de maduración en los que han sido transformadas (Damle et al, 1999; Stilgenbauer et al, 2002).

En la Tabla 16 se muestra la distribución comparativa de las familias IGHV en series de diferentes regiones geográficas. Este análisis permitió observar una proporción significativamente menor de IGHV1 respecto de los datos publicados para España ($p=0,0019$) y Suecia ($p=0,0176$); como también una menor expresión de IGHV4 respecto de China ($0,0133$). Por el contrario nuestra población mostró una mayor frecuencia de IGHV3 respecto de España ($p=0,0076$).

Tabla 16. Datos de genes VH reportadas para distintos países

	Total de secuencias reportadas	Familias <i>IGHV</i> (%)							Referencias
		VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	VH7	
USA	1188	27	2,0	48	20,3	1	0,7	0,3	Widhopf et al, 2004
Suecia	407	28	2,0	47	19,5	<2	<2	<2	Tobin et al, 2004
Italia	1456	22	2,1	51	21,4	2,3	0,6	0,5	Bomben et al, 2009; Nardini et al, 2003
España	56	39	3,6	36	17,8	1,8	0	1,8	Crespo et al, 2003
Francia	39	23	10	41	15,4	7,7	2,5	0	Maloum et al, 2000
Mediterráneo	927	24	2,8	46	23,4	2,4	0,8	0,2	Stamatopoulos et al, 2007
Inglaterra	243	26	5,7	49	15,6	2,5	1,2	0	Hamblin et al, 1999; Duke et al, 2003
Japón	155	9,7	3,9	50	33	2,6	1,3	0	Koiso et al, 2006; Ikematsu et al, 1994; Nakahashi et al, 2009
China	111	9,0	2,7	47	37,8	2,7	0	0,9	Irons et al, 2009; Chen et al, 2008b
Irán	87	18	0	56	20,7	1,1	3,4	0	Hojjat-Farsangi et al, 2009
Brasil	37	11	5,4	38	35,2	8,1	2,7	0	Pimentel et al, 2008
Uruguay	80	18	2,5	53	22,5	1,3	1,3	2,5	Bianchi et al, 2010
Venezuela	87	25	0	48	21,8	4,6	0	0	Marquez et al, 2012
Argentina	70	14,3*	0	60*	20*	4,3	0	1,4	Presente trabajo

*Diferencias significativas para *IGHV1* respecto de España ($p=0,0019$) y Suecia ($p=0,0176$); *IGHV3* respecto de España ($p=0,0076$), e *IGHV4* respecto de China ($0,0133$).

Simultáneamente, se efectuó la comparación de los genes *IGHV* de nuestra serie con los datos de otras regiones geográficas (Tabla 17).

Tabla 17. Frecuencia de los genes VH reportadas para distintos países

Referencias	Total de secuencias	Segmentos <i>IGHV</i> (%)				
		1-69	3-7	3-21	3-23	4-59
<u>USA</u>						
Mauerer et al, 2005	375	18	4,3	1,6	7	0
Weinberg et al, 2007	172	12,2	5,2	0	6,4	5,8
Messmer et al, 2004	172	10,5	8,2	1,2	6,4	4,7
Pasqualucci et al, 2000	41	4,9	4,9	4,9	9,8	4,9
<u>Europa</u>						
Tobin et al, 2004	407	14	3	9	5	NI
Pritsch et al, 1993	25	4	0	4	16	0
Bomben et al, 2007	1426	11,9	5,8	4,1	9,4	3,2
Nardini et al, 2003	30	3,3	6,6	3,3	0	0
Crespo et al, 2003	56	21,4	1,8	1,8	5,4	1,8
Maloum et al, 2000	39	10,2	2,6	2,6	12,8	0
Stamatopoulos et al, 2007	927	12,6	6,6	3,5	9	2,4
Ghia et al, 2005	553	10,7	5,4	3	9,2	2
Hamblin et al, 1999	84	11,9	7,1	2,4	11,9	1,2
Duke et al, 2003	159	11,3	5	5,7	8,2	0,6
Abramenko et al, 2007	189	21,7	4,8	5,8	1,6	3,7
<u>Asia</u>						
Koiso et al, 2006	43	2,3	NI	7	14	NI
Nakahashi et al, 2009	80	1,25	5	7,5	8,75	0
Chen et al, 2008b.	65	1,5	4,6	3	7,7	10,8
Irons et al, 2009	46	2,2	2,2	4,3	8,7	1
Hojjat-Farsangi et al, 2009	87	5,7	12,6	0	4,6	0
<u>América del Sur</u>						
Pimentel et al, 2008	37	5,4	5,4	0	10,8	8,1
Bianchi et al, 2010	80	7,5	12,5	1,3	11,3	1,25
Marquez et al, 2012	87	14,9	8	9,2	14,6	2,3
Argentina	70	7,14	10	10*	11,42	10*

*Diferencias significativas en nuestros pacientes con *IGHV3-21* respecto de las publicadas para Estados Unidos ($p=0,0002$) y Europa ($0,0236$), y de *IGHV4-59* respecto de todas las series (Estados Unidos: $p=0,0051$; Europa: $p=0,0002$; Asia: $p=0,0085$; restantes publicaciones de América del Sur: $p=0,0242$). NI: no identificado.

La misma permitió observar que nuestros pacientes tenían sobre-expresión de *IGHV3-7*, *IGHV3-21* e *IGHV4-59*, y una menor representación de *IGHV1-69* respecto de otras regiones geográficas (Duke et al, 2003; Ghia et al, 2005; Messmer et al, 2004; Stamatopoulos et al, 2007; Bomben et al, 2009). Particularmente, se encontraron diferencias significativas para *IGHV3-21* respecto de los datos publicados para Estados Unidos ($p=0,0002$) y Europa ($0,0236$), así como también para *IGHV4-59* respecto de todas las regiones: Estados Unidos ($p=0,0051$), Europa ($0,0002$), Asia ($p=0,0085$) y América del Sur ($p=0,0242$). Este gen mostró una distribución comparable a la detectada en pacientes con LLC de Brasil (Pimentel et al, 2008) (8,1%) y China (Chen et al, 2008b) (10,8%). En cuanto a *IGHV3-21*, gen asociado a mala evolución clínica, independientemente del estatus mutacional de IGHV (Thorselius et al, 2006), la alta frecuencia observada en nuestra serie (10%) lo ubica en valores similares a los detectados en pacientes escandinavos (Tobin et al, 2004). Una alta representación de este gen fue también observada en la población mestiza de Venezuela, alcanzando el 22,2% del total de genes expresados (Marquez et al, 2012), sustentando la importancia del *background* genético en la ocurrencia de los distintos rearrreglos en poblaciones de diferente origen geográfico y/o étnico. Por su parte, el gen *IGHV3-7* presentó una frecuencia similar a la observada en pacientes iraníes (Hojjat-Farsangi et al, 2009) y uruguayos (Bianchi et al, 2010).

En concordancia con estudios previos (Hamblin et al, 1999; Potter et al, 2003; Messmer et al, 2004; Mauerer et al, 2005; Stamatopoulos et al, 2007; Bomben et al, 2009), el segmento *IGHV1-69* fue el mayormente expresado entre los pertenecientes a la familia *IGHV1*, exhibiendo en la mayoría de los casos una configuración germinal (perfil 100% NM). La mayor incidencia de uso de *IGHV1-69* ha sido reportada en pacientes con LLC de Ucrania (21,7%) (Bilous et al, 2010) y España (21,4%) (Crespo et al, 2003). Nuestros datos, al igual que los descriptos para Brasil (Pimentel et al, 2008) y Uruguay (Bianchi et al, 2010), son mayores que los observados en población asiática (Koiso et al, 2006; Chen et al, 2008b; Irons et al, 2009; Nakahashi et al, 2009) pero menores que en la mayoría de las series de Europa (Mauerer et al, 2005; Stamatopoulos et al, 2007; Bomben et al, 2009) y USA (Messmer et al, 2004; Mauerer et al, 2005). Varios estudios han

demostrado que los pacientes con LLC portadores de rearrreglos *IGHV1-69* presentan características específicas, como ser un uso sesgado de genes *IGHD* e *IGHJ* y una longitud media para la región HCDR3 significativamente más larga en comparación con casos de LLC con otros rearrreglos *IGHV* (Potter et al, 2003; Duke et al, 2003). En nuestra serie pudimos confirmar la asociación del segmento *IGHV1-69* con los genes *IGHD3-3*, *IGHD3-10*, *IGHD2-2* e *IGHJ6* (Potter et al, 2003; Duke et al, 2003; Mauerer et al, 2005).

El gen *IGHV3-23*, el más representado en nuestra población, está mayormente asociado a la LLC M (Duke et al, 2003; Stamatopoulos et al, 2007). Nuestra frecuencia de 11,06% resulta muy similar a la observada por Maloum et al (2000) (12,8%) y Hamblin et al (1999) (11,9%) en pacientes europeos, habiéndose reportado una baja proporción del mismo solamente en pacientes ucranianos (1,6%) (Abramenko et al, 2007). Asimismo, este gen no se ha encontrado presente en *clusters* de receptores de células B estereotipados y posee un perfil mutacional asociado a unión antigénica (Bomben et al, 2010). La expresión de *IGHV3-23* está altamente relacionada a un subgrupo de pacientes con características clínico-biológicas particulares y es considerado un marcador de mal pronóstico independientemente del estado mutacional (Bomben et al, 2010).

Con respecto a los receptores estereotipados, los mismos fueron observados en el 8,7% de nuestros casos. La detección de estos receptores sustenta la hipótesis de la presencia de estímulos antigénicos específicos o epitopes estructuralmente similares, en el desarrollo y la patogénesis de la LLC (Dühren-von Minden et al, 2012). Nuestra frecuencia fue menor que la observada en otros estudios (Messmer et al, 2004; Stamatopoulos et al, 2007; Murray et al, 2008; Bomben et al, 2009; Marquez et al, 2012), resultado posiblemente relacionado al tamaño de la serie evaluada. Recientemente se describieron asociaciones entre diferentes secuencias HCDR3 esterotipadas y evolución clínica. Entre ellas, los subsets #1 y #7 se encontraron preferentemente asociados a LLC NM, relacionada a mal pronóstico (Stomatopoulos et al, 2007; Bombem et al, 2009), en

tanto que el subset #4 con expresión de *IGHV4-34*, se encontró asociado a enfermedad con bajo nivel proliferativo y curso indolente (Marincevic et al, 2010; Maura et al, 2011). En cuanto a *IGHV3-21*, los pacientes correspondientes al subset #2 de receptores estereotipados provenientes de la región mediterránea presentaron peor pronóstico que aquellos con *IGHV3-21* no estereotipado (Rossi et al, 2013), sugiriendo la importancia del estudio de estereotipos en LLC para mejorar la estadificación del paciente tendiente a la aplicación de una medicina personalizada.

En referencia a los IGHD e IGHJ su relación con características clínicas y biológicas de la LLC ha sido mucho menos explorada, encontrándose asociación con un corto tiempo al inicio del primer tratamiento en pacientes con IGHD2 y D3 (Mauerer et al, 2005; Tschumper et al, 2008), siendo necesarios estudios en series más amplias para confirmar estos datos.

Por otra parte, sabemos que los telómeros cortos se encuentran asociados a inestabilidad genómica y que la disfunción telomérica causa eventos de ruptura-fusión que llevan a la reorganización del genoma de las células tumorales (Gisselsson et al, 2001). Diferentes reportes de la literatura (Roos et al, 2008; Sellman et al, 2011; Rampazzo et al, 2012; Mansouri et al, 2013) así como datos de nuestro laboratorio (Dos Santos et al, 2015) sustentan esta asociación en LLC. En este marco, resulta también de importancia el análisis de la relación entre la LT y el estatus mutacional de IGHV, reconocido factor pronóstico en la patología.

En concordancia con datos previos de la literatura (Ricca et al, 2007; Roos et al, 2008; Sellman et al, 2011; Rampazzo et al, 2012), nuestros resultados muestran acortamiento telomérico en los pacientes con LLC-NM, asociada a peor pronóstico aunque sin alcanzar diferencias significativas. Esta situación podría explicarse por la presencia en nuestra serie de una distribución similar de telómeros cortos y largos en pacientes M y NM. Este aspecto fue evaluado previamente por otros autores (Ricca et al, 2007; Sellman et al, 2011), quienes observaron que aquellos pacientes denominados discordantes (IGHV M con telómeros cortos o IGHV NM con telómeros largos)

mostraban un comportamiento clínico diferente de los casos no discordantes, sugiriendo la combinación de LT y el estatus mutacional de IGHV para mejorar la predicción clínica de los pacientes con LLC. En este aspecto, y sustentando datos previos (Ricca et al, 2007; Sellman et al, 2011; Rampazzo et al, 2012; Lin et al, 2014), el análisis de las características clínicas de nuestros pacientes en función del estatus mutacional, mostró mayor masa tumoral y menor SV en los casos con IGHV NM, con menor LT. Estos resultados respaldan el rol del acortamiento telomérico en el desarrollo y progresión de la LLC, resaltando la importancia de la disfunción de los extremos cromosómicos en el mantenimiento de la integridad del genoma. En este aspecto, Lin et al (2010) sugieren que la combinación de la dinámica telomérica junto con el recuento de glóbulos blancos podrían constituir marcadores de la cinética de renovación celular, pudiendo ser de utilidad para predecir la progresión clínica de la enfermedad. Simultáneamente, la observación de que la erosión telomérica puede preceder a la progresión tumoral (Lin et al, 2014), indicaría que la misma podría representar un evento temprano en la evolución de la enfermedad, al menos en un grupo de pacientes.

En cuanto a la relación entre la LT y las familias o genes IGHV, es muy escasa la información referida en la literatura. En nuestra serie observamos los telómeros más largos en los casos que expresaban *IGHV3-74* e *IGHV4-59*, en tanto que la mayor proporción de telómeros cortos se detectó en los pacientes con *IGHV3-21*, gen cuya expresión se encuentra asociada a mala evolución clínica. Nuestro hallazgo y el de un único reporte de la literatura (Grabowski et al, 2005) sustentan el pronóstico adverso de la expresión de este gen en LLC, no existiendo información respecto de los otros dos genes, pudiendo relacionarse su mayor LT con su asociación preferente a IGHV M. Diferentes autores sugieren que las células derivadas del centro germinal y que han sufrido HMS presentan telómeros más largos (Weng et al, 1997; Hultdin et al, 2001; Damle et al, 2004) y mayor capacidad replicativa que las células B con genes NM, por lo que la célula de origen de la enfermedad diferiría en su LT desde el comienzo de la misma. En este contexto, Damle et al (2004) encuentran asociación entre acortamiento telomérico y disminución del tiempo de duplicación linfocitario, asociado a mayor índice de proliferación y pronóstico adverso. Más recientemente, Sellman et al (2011) demuestran

que las LLC con lento desarrollo presentan telómeros largos, en tanto que aquellas más agresivas tienen telómeros más cortos, y sugieren que esos hallazgos no sólo reflejarían el posible origen de la célula B leucémica sino que también podrían indicar un mecanismo diferencial de mantenimiento de la célula tumoral. Sin duda, la continuación de estos estudios permitirá conocer más profundamente el comportamiento de la LLC así como el rol de la disfunción telomérica en la etiopatogenia de la enfermedad, siendo de importancia en el conocimiento de las características biológicas de la misma.

**6. Capítulo Tercero:
Expresión de genes reguladores
de la longitud telomérica**

6.1. Resultados

6.1.1. Expresión génica

6.1.1.1. Optimización de la q-PCR

En primera instancia se procedió a la optimización de las condiciones de PCR para poder llevar a cabo la cuantificación génica con una alta eficiencia, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad. Se utilizaron las condiciones sugeridas por el kit utilizado (SybrSelect Master Mix, Applied Biosystems®).

Eficiencia de la amplificación en la PCR cuantitativa

El fundamento teórico de esta técnica es la amplificación exponencial de un segmento de ADN definido, mediante el uso de *primers* que se hibridan de manera específica con cada una de las hebras complementarias de ADN. Si bien la estrategia de PCR es muy poderosa y relativamente simple, cuando es utilizada con fines cuantitativos es necesario medir la eficiencia de amplificación de los diferentes juegos de *primers* con el propósito de eliminar cualquier artefacto experimental en el resultado final. La eficiencia de una reacción de PCR se define como el porcentaje de conversión de ADN molde a producto por ciclo. El máximo valor que puede tener es 1, donde todas las moléculas de ADN existentes son duplicadas por amplificación en cada ciclo. Para una exacta cuantificación es necesario que las eficiencias de los estándares y de las muestras sean muy similares (por encima del 90%) dado que pequeñas variaciones en la eficiencia de amplificación conllevan a modificaciones considerables en los valores de concentración del producto. La eficiencia de la PCR dependerá, entre otros factores, de la calidad de los *primers*, de las condiciones de amplificación, del fragmento amplificado y de la pureza de la muestra de ARN.

El número de ciclos necesario para alcanzar un valor umbral de fluorescencia es una medida cuantitativa, fundamental en este ensayo, denominada *Crossing Point* (*Cp*) (Rasmussen, et al, 2001). La eficiencia de la reacción para cada gen se determinó empleando diluciones seriadas de la línea celular K562, por duplicado, y se representó el

C_p con respecto al logaritmo de la concentración. La misma se calculó a partir de la pendiente de la recta resultante de dicha representación:

$$\text{Eficiencia} = 10^{-1}/\text{pendiente}$$

Para cada uno de los genes, las diferencias de la eficiencia entre distintas curvas no deben ser superiores a $\pm 0,05$ ($\pm 2,5\%$).

Reproducibilidad de la PCR cuantitativa

La reproducibilidad es un parámetro clave a tener en cuenta en la PCR cuantitativa, ya que determina la mínima diferencia en la concentración inicial de la muestra que el ensayo puede discriminar. Todos los pasos realizados durante el análisis de PCR, desde la preparación de la muestra hasta la detección final de los productos, influyen en la reproducibilidad del ensayo. Asimismo, es importante al manipular volúmenes pequeños, la precisión, la eficiencia de la PCR y la exactitud en el manejo de las muestras.

El coeficiente de variación (CV) de los C_p s se utiliza habitualmente como un indicador de la reproducibilidad. El CV de un conjunto de datos se determina dividiendo la desviación estándar por la media aritmética de dichos valores. La variabilidad intra-ensayo se establece a partir de cinco estándares para cada gen, los cuales fueron cuantificados por duplicado. La máxima diferencia absoluta en los valores de C_p intra-ensayo fue inferior a 0,7 ciclos para cada duplicado de la muestra. La variabilidad inter-ensayo se calculó en las mismas muestras en tres días diferentes. En este caso las diferencias absolutas en el C_p para una misma muestra fueron inferiores a 1,5 ciclos.

Sensibilidad y especificidad de la PCR cuantitativa

Para determinar la mínima cantidad de ADNc que puede ser cuantificado mediante la PCR en tiempo real en cada uno de los genes de interés, se construyó una curva patrón para cada uno de ellos a partir de diluciones seriadas de estándares de concentración conocida. Todas las curvas mostraron coeficientes de correlación cercanos a 1, indicando

la existencia de una relación lineal precisa. En la Figura 40 se grafican a modo de ejemplo las curvas correspondientes a los genes β -Actina, *hTERT*, *NHP2* y *DKC1*.

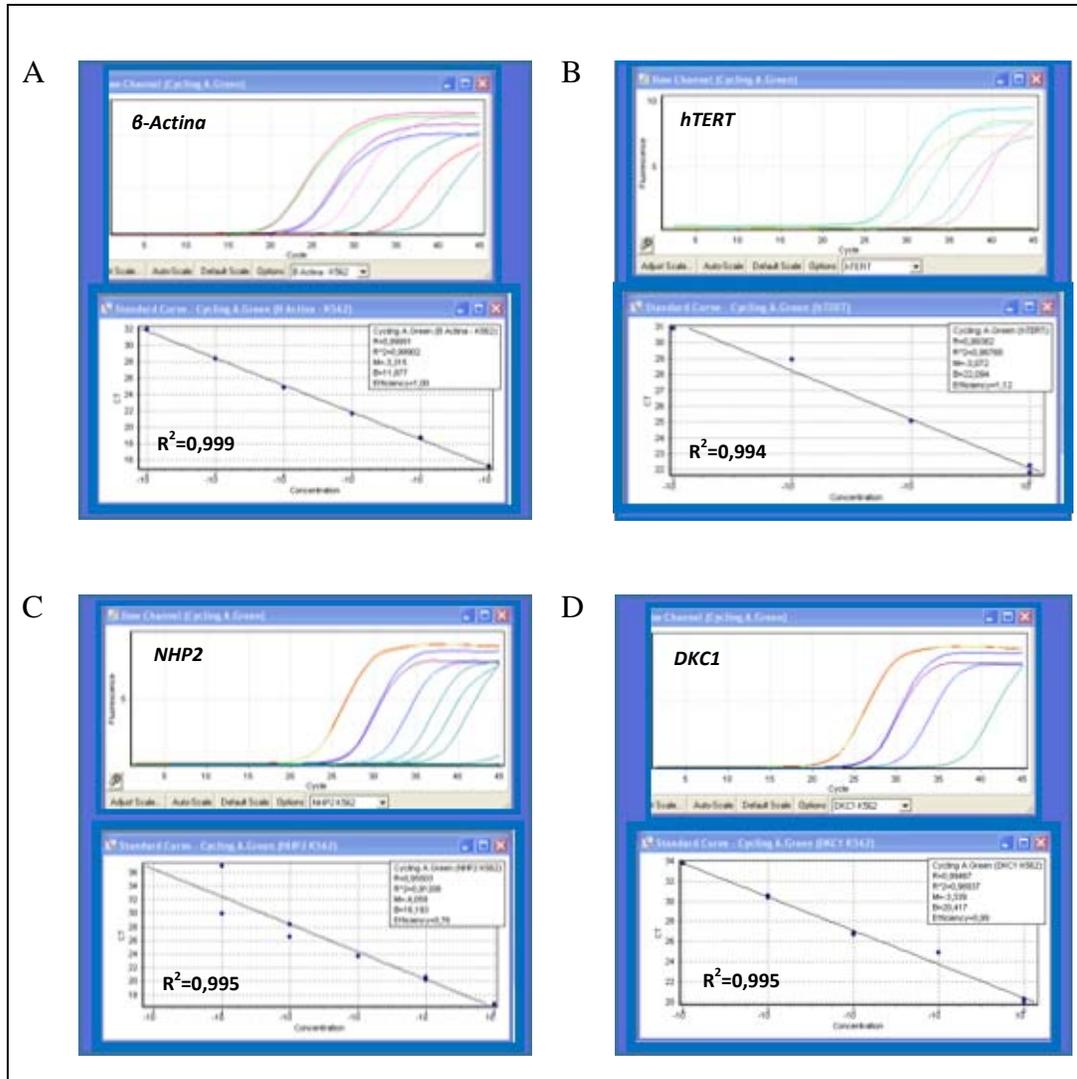


Figura 40. Curvas de calibración para cada gen. Se indica la eficiencia, el coeficiente de correlación (R^2) y la pendiente de la curva (M) para las curvas de los genes β -Actina, *hTERT*, *NHP2* y *DKC1*

Como se mencionó previamente, en este trabajo se empleó la metodología *SYBR Green*. Al tratarse de un intercalante del ADNdc, se va a detectar tanto el producto deseado como productos inespecíficos y dímeros de *primers*, por lo tanto es necesario comprobar la especificidad del producto amplificado luego de la reacción de PCR

mediante la realización de las curvas de *melting*. Este método se lleva a cabo por el mismo software Rotor GENE Q (Qiagen), posteriormente al ciclado, para evidenciar eventuales productos inespecíficos o dímeros de *primers* que pueden alterar la cuantificación. En este análisis la temperatura es aumentada lentamente desde 40°C a 95°C con monitoreo y medición continua de la fluorescencia, la cual será máxima a temperaturas bajas, cuando todo el ADN se encuentra como ADNdc. En tanto que, a temperaturas altas, el ADN se desnaturaliza liberando el fluoróforo y disminuyendo bruscamente la fluorescencia cercana al punto de *melting* del producto específico (Temperatura de *melting*, T_m). Los valores de fluorescencia se convierten en curvas de *melting* representando la derivada negativa de la fluorescencia respecto a la temperatura versus la temperatura ($-dF/dT$ vs. T). Los diferentes productos de PCR, que varían en longitud, secuencia y contenido de GC, tendrán T_m diferentes y específicos, y permitirán observar un único pico en la curva de *melting* cuando se logre la amplificación específica.

6.1.1.2. Análisis de los perfiles de expresión de genes asociados a telómeros

La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo en células mononucleares de SP de 60 pacientes con LLC (34 varones; edad media: 66,8 años; rango: 44-88 años) y de 14 individuos sanos (controles normales, CN). Se evaluaron cuatro genes del complejo RNP *GAR1*, *NHP2*, *NOP10* y *DKC1*, así como *hTR* y *hTERT*, correspondientes a las subunidades nucleotídica y catalítica, respectivamente, de la telomerasa, tomándose como referencia el gen de expresión constitutiva β -Actina.

El análisis de los perfiles de expresión génica evidenció aumento en la expresión de *hTERT*, *GAR1* y *NHP2*, y disminución de *hTR*, *DKC1* y *NOP10*, en los pacientes respecto de CN, alcanzándose diferencias significativas para *hTR* ($p=0,0436$) y *NOP10* ($p=0,0052$) (Figura 41)

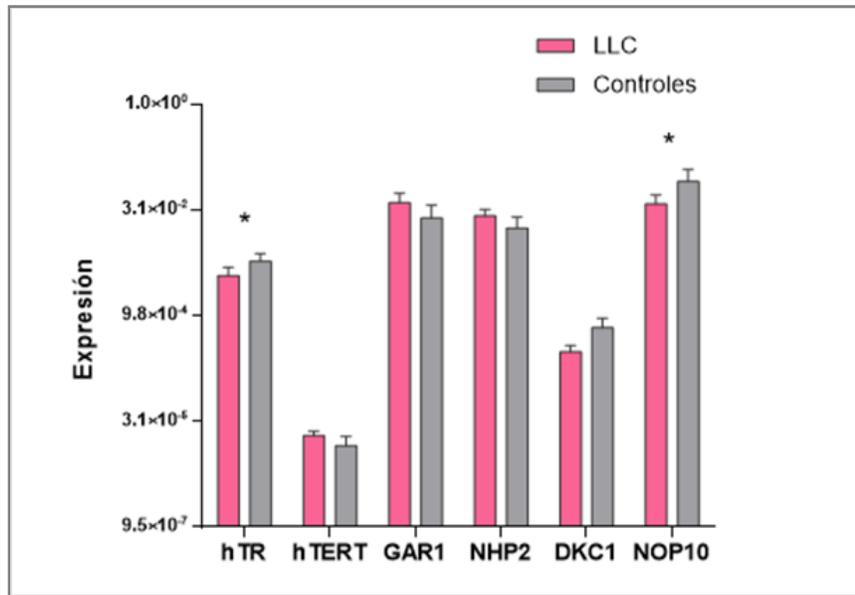


Figura 41. Perfiles de expresión de los genes *hTR*, *hTERT*, *GAR1*, *NHP2*, *DKC1* y *NOP10* en pacientes (LLC) y controles normales. *Diferencias significativas para *hTR* ($p=0,0436$) y *NOP10* ($p=0,0052$).

Se efectuó asimismo del análisis de correlación entre la expresión de los distintos genes observándose correlación positiva entre los niveles de transcritos de: *GAR1-NHP2*, *GAR1-NOP10*, y *NOP10-NHP2* ($p<0,0001$) (Figura 42), indicando una estrecha interacción entre los mismos.

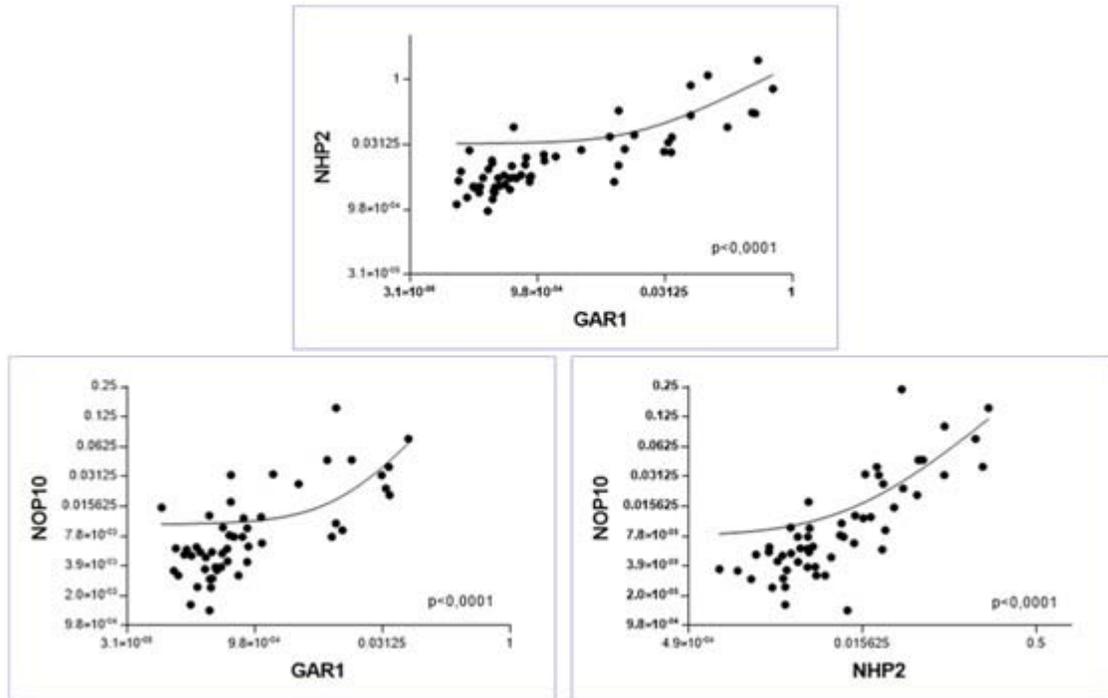


Figura 42. Correlación entre los perfiles de expresión de los genes *NHP2*, *GARI* y *NOP10*.

6.1.1.3. Asociación de los perfiles de expresión génica con la LT, las alteraciones genéticas y el estatus mutacional de *IGHV*

Uno de los puntos de interés fue evaluar el nivel de asociación entre los perfiles de expresión génica y la LT, tomando como referencia la división en telómero cortos y largos, previamente establecida (media: 6,8 kb). El mismo permitió observar que aquellos casos con telómeros cortos presentaban mayor expresión de *hTERT* ($p=0,0332$) y *DKC1* ($p=0,0227$), en tanto que *hTR*, *GARI*, *NHP2* y *NOP10*, tuvieron mayor proporción de telómeros largos en los pacientes, aunque las diferencias no alcanzaron a ser significativas (Figura 43).

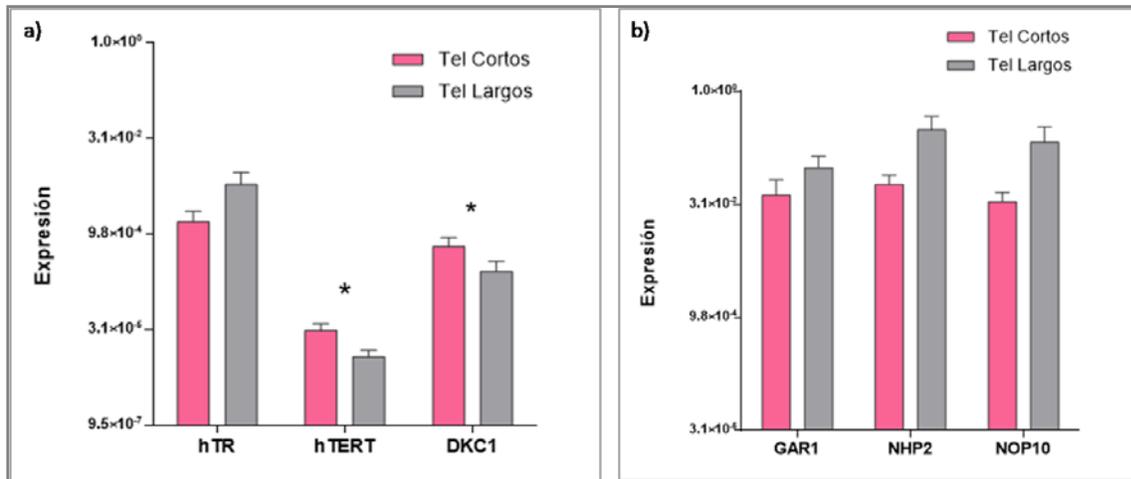


Figura 43. Expresión de los genes *hTR*, *hTERT*, *DKC1*, *GARI*, *NHP2* y *NOP10* en pacientes con LLC según sus longitudes teloméricas. Tel: telómeros. *Diferencias significativas para la expresión de *hTERT* ($p=0,0332$) y *DKC1* ($p=0,0227$).

En cuanto a la asociación con las alteraciones genéticas, evaluamos en primera instancia la expresión de estos genes en relación al número de anomalías cromosómicas detectadas por citogenética convencional, observando que aquellos pacientes con 2 o más alteraciones presentaban una mayor expresión de los genes *hTERT*, *GARI*, *NHP2*, y *DKC1*, y disminución de *hTR* y *NOP10*, alcanzándose diferencias significativas para *GARI* ($p=0,0142$) y *NHP2* ($p=0,0274$) (Figura 44), indicando asociación con inestabilidad genómica.

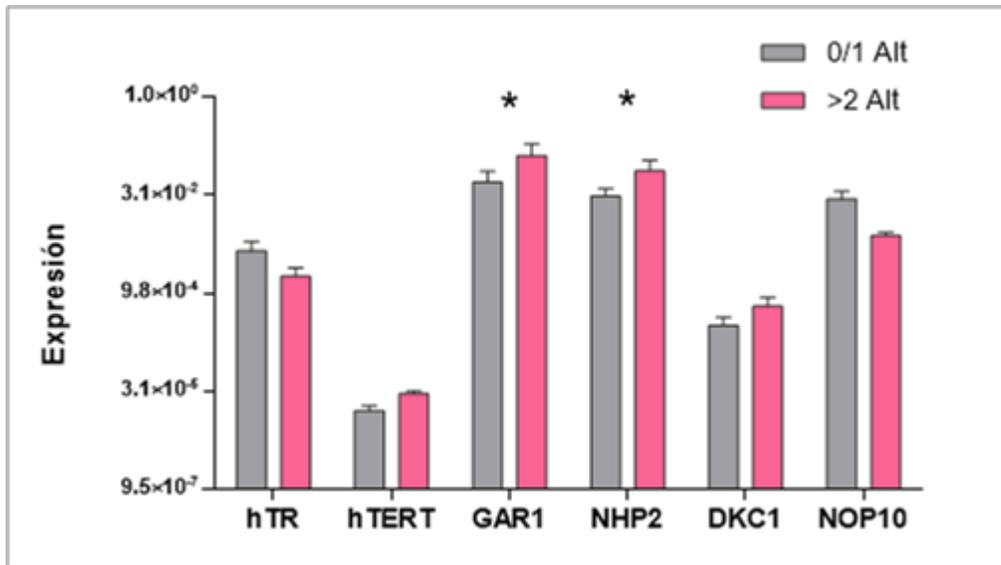


Figura 44. Análisis de la expresión de los genes *hTR*, *hTERT*, *GAR1*, *NHP2*, *DKC1* y *NOP10* según el número de alteraciones genéticas. Aumento significativo de la expresión de *GAR1* (0,0142) y *NHP2* (p=0,0274) en el grupo de peor pronóstico (>2 alteraciones).

Además, se analizaron los perfiles de expresión génica en relación al tipo de alteraciones genómicas evaluadas mediante FISH, no encontrándose diferencias significativas entre los pacientes que presentaban las características relacionadas a buen pronóstico (sin alteraciones o con del13q14 como única alteración) respecto de los que tenían anomalías relacionadas con mala evolución clínica (trisomía 12, del11q/17p) (Figura 45).

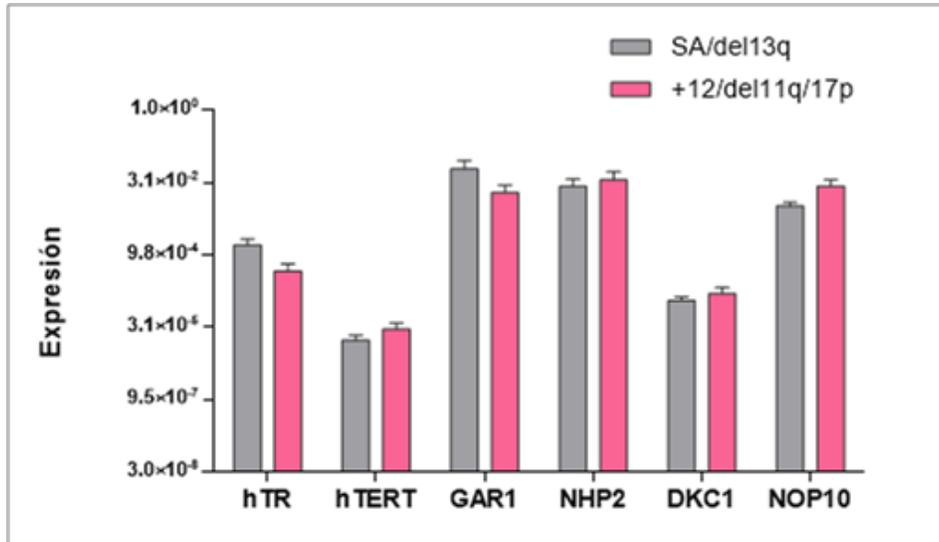


Figura 45. Análisis de la expresión de los genes *hTR*, *hTERT*, *GAR1*, *NHP2*, *DKC1* y *NOP10* según el tipo de anomalía genética de los pacientes. SA: sin alteraciones.

Consideramos también el análisis de la expresión de estos seis genes acorde al perfil mutacional de *IGHV*, observando una mayor expresión de *hTR*, *hTERT*, *GAR1* y *NOP10* en los pacientes con *IGHV*-NM, con tendencia a la significación para *hTERT* ($p=0,06$), y disminución de *DKC1*, respecto de los casos con *IGHV* M en tanto que los valores de expresión para *NHP2* fueron similares en ambos grupos (Figura 46).

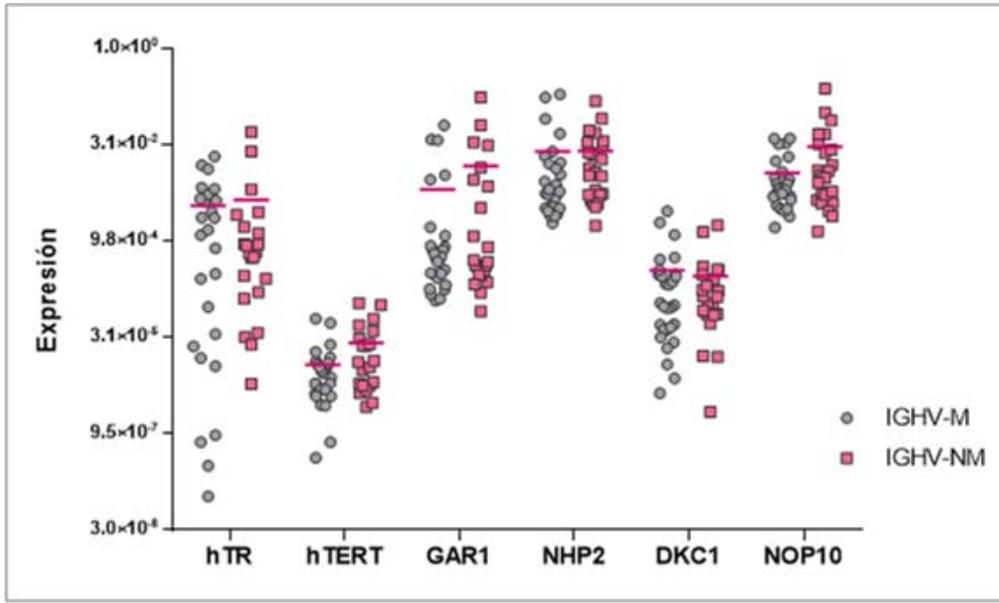


Figura 46. Expresión de *hTR*, *hTERT*, *GARI*, *NHP2*, *DKC1* y *NOP10* en pacientes con IGHV mutado (M) y no mutado (NM).

6.1.1.4. Correlación con los parámetros clínicos

A fin de evaluar el significado clínico de los resultados obtenidos, se analizaron las características clínico-biológicas de los pacientes en función de la expresión génica, abordando el análisis desde distintos aspectos. En primera instancia se evaluó la distribución de los niveles de expresión en función de edad, sexo, estadios RAI, recuento de glóbulos blancos, porcentaje de linfocitos, β_2 M, LDH y hemoglobina (Tabla 18), encontrándose diferencias en la distribución de estadios RAI para el gen *DKC1*, con mayores niveles de expresión en los estadios avanzados ($p=0,04$), en el recuento de glóbulos blancos para *hTR* ($p=0,0022$) y asociación con el aumento de la linfocitosis para *NHP2* ($p=0,0031$).

Tabla 18. Análisis de la expresión génica en función de los parámetros clínicos

Variable	Expresión de genes teloméricos (media)					
	<i>hTR</i>	<i>hTERT</i>	<i>GARI</i>	<i>NHP2</i>	<i>DKC1</i>	<i>NOP10</i>
Sexo						
F	6,50.10 ⁻⁰³	1,52.10 ⁻⁰⁵	4,60.10 ⁻⁰²	3,80.10 ⁻⁰²	1,30.10 ⁻⁰⁴	2,60.10 ⁻⁰²
M	2,00.10 ⁻⁰³	2,13.10 ⁻⁰⁵	4,60.10 ⁻⁰³	1,20.10 ⁻⁰²	1,60.10 ⁻⁰⁴	1,00.10 ⁻⁰²
Estadios Rai						
0	2,20.10 ⁻⁰³	1,73.10 ⁻⁰⁵	3,70.10 ⁻⁰³	3,80.10 ⁻⁰²	7,60.10 ⁻⁰⁵	1,30.10 ⁻⁰²
I/II	2,30.10 ⁻⁰³	1,24.10 ⁻⁰⁵	9,00.10 ⁻⁰³	6,00.10 ⁻⁰²	1,65.10 ⁻⁰⁴	6,00.10 ⁻⁰³
III/IV	1,70.10 ⁻⁰³	2,12.10 ⁻⁰⁵	1,20.10 ⁻⁰²	2,40.10 ⁻⁰²	2,88.10 ⁻⁰⁴ θ	2,40.10 ⁻⁰²
Recuento de glóbulos blancos (x10⁹/L)						
< 20	3,70.10 ⁻⁰⁴	7,00.10 ⁻⁰⁶	1,50.10 ⁻⁰³	1,70.10 ⁻⁰²	1,70.10 ⁻⁰⁴	1,30.10 ⁻⁰²
≥ 20	3,60.10 ⁻⁰³ *	7,00.10 ⁻⁰⁶	7,20.10 ⁻⁰³	1,00.10 ⁻⁰²	2,20.10 ⁻⁰⁴	1,50.10 ⁻⁰²
Linfocitos (%)						
< 60%	6,40.10 ⁻⁰⁴	2,04.10 ⁻⁰⁵	3,20.10 ⁻⁰⁴	2,50.10 ⁻⁰³	1,50.10 ⁻⁰⁴	5,20.10 ⁻⁰³
≥ 60%	3,50.10 ⁻⁰³	1,65.10 ⁻⁰⁵	4,80.10 ⁻⁰³	2,50.10 ⁻⁰² #	1,50.10 ⁻⁰⁴	2,20.10 ⁻⁰²
β₂ M (mg/ml)						
< 3	3,70.10 ⁻⁰³	1,51.10 ⁻⁰⁵	5,10.10 ⁻⁰²	3,50.10 ⁻⁰²	3,00.10 ⁻⁰⁴	7,00.10 ⁻⁰²
≥ 3	2,40.10 ⁻⁰³	1,58.10 ⁻⁰⁵	6,10.10 ⁻⁰²	7,00.10 ⁻⁰³	1,00.10 ⁻⁰⁴	1,00.10 ⁻⁰²
LDH (U/l)						
< 450	3,80.10 ⁻⁰³	1,56.10 ⁻⁰⁵	1,90.10 ⁻⁰²	2,70.10 ⁻⁰²	3,50.10 ⁻⁰⁴	2,50.10 ⁻⁰²
≥ 450	2,00.10 ⁻⁰³	1,97.10 ⁻⁰⁵	1,20.10 ⁻⁰¹	3,10.10 ⁻⁰²	1,70.10 ⁻⁰⁴	2,00.10 ⁻⁰²
Hemoglobina (g/dl)						
< 11	5,90.10 ⁻⁰³	1,94.10 ⁻⁰⁵	4,40.10 ⁻⁰²	1,20.10 ⁻⁰²	1,40.10 ⁻⁰⁴	1,40.10 ⁻⁰²
≥ 11	2,80.10 ⁻⁰³	1,65.10 ⁻⁰³	1,60.10 ⁻⁰²	2,50.10 ⁻⁰²	2,20.10 ⁻⁰⁴	4,80.10 ⁻⁰²

F: femenino; M: masculino; LDH: lactato deshidrogenasa; β₂ M: β₂ microglobulina. Diferencias significativas: *p=0,0022; θ respecto de Rai 0 (p=0,0012) y respecto de Rai I/II (p=0,0412). #: p=0,0031.

Posteriormente se efectuó la correlación entre los niveles de expresión de cada gen tomando como punto de corte la mediana de cada uno, estableciendo dos grupos: alta y baja expresión (AE y BE, respectivamente), y los diferentes parámetros clínicos (Figura 47), no encontrándose diferencias significativas entre los distintos factores pronóstico evaluados.

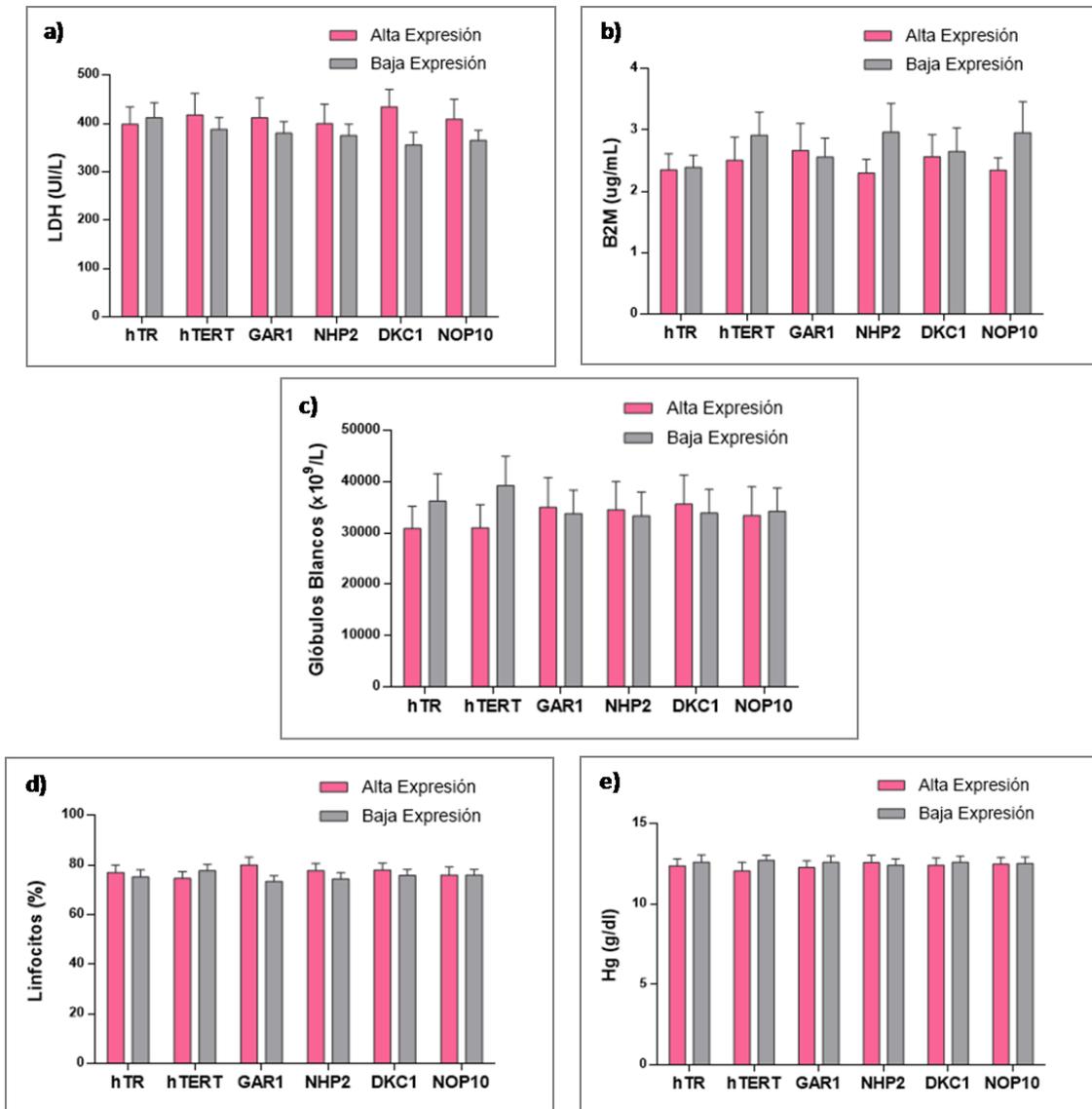


Figura 47. Parámetros clínicos analizados según el nivel de expresión génica. a) LDH; b) β_2M ; c) Recuento de glóbulos blancos; d) Porcentaje de linfocitos; e) Hemoglobina (Hg).

La única excepción la constituyó el análisis de los estadios Rai, que permitió observar niveles mayores de expresión de *DKC1* y *NHP2* en los pacientes con estadios avanzados, con diferencias significativas para *NHP2* en los estadios I/II respecto de los demás grupos ($p=0,0352$). En lo que respecta a *DKC1*, observamos que todos los pacientes en estadios Rai III/IV presentaban alta expresión de este gen (Figura 48a y b).

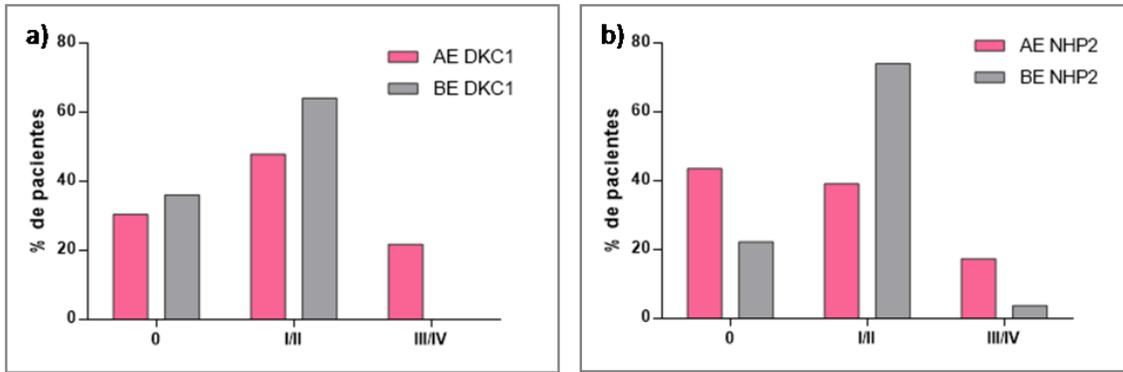


Figura 48. Distribución de los estadios Rai para la expresión los genes *DKC1* (a) y *NHP2* (b) con diferencias significativas ($p=0,0352$) para este último caso.

Finalmente analizamos la evolución clínica, encontrando que los pacientes con AE de *hTERT* (23 meses) y *GAR1* (31 meses) presentaban corta SLT respecto de aquellos con BE que no alcanzaban la media de SV (Figura 49).

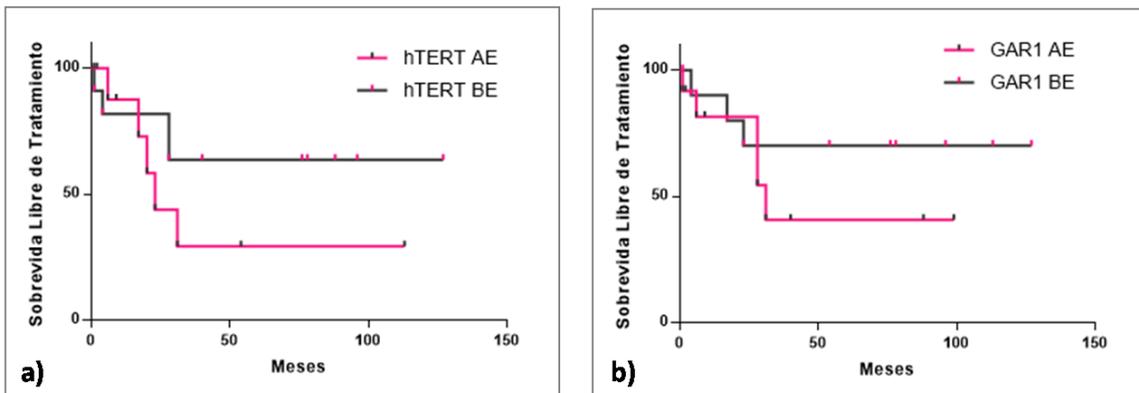


Figura 49. Análisis de SLT de los grupos con AE y BE para los genes *hTERT* (a) y *GAR1* (b).

6.2. Discusión

En el presente capítulo se efectuó el análisis de diferentes genes reguladores de la LT en pacientes con LLC. Como fue expresado precedentemente, los telómeros se encuentran asociados a diferentes proteínas que resultan esenciales en el mantenimiento de la integridad telomérica, preservando a la célula de la inestabilidad genómica (Blasco 2007; Palm and de Lange, 2008). Entre ellas en este trabajo se evaluaron los cuatro genes del complejo RNP H/ACA *GARI*, *NHP2*, *NOP10* y *DKC1*, así como *hTR* y *hTERT*, correspondientes a las subunidades nucleotídica y catalítica de la telomerasa. Cabe destacar que el presente trabajo representa la primera evaluación de los genes *GARI*, *NHP2*, *NOP10* y *hTR* en pacientes con esta patología.

El análisis de nuestros datos muestra desregulación en la expresión de los genes evaluados en los pacientes con LLC respecto de los controles, con aumento en la expresión de *hTERT*, *GARI* y *NHP2*, y disminución de los niveles de transcritos de *hTR*, *DKC1* y *NOP10*. Simultáneamente se encontró correlación positiva entre *NOP10*, *GARI* y *NHP2*, indicando la interacción existente entre los mismos. Al presente la literatura muestra un único trabajo (Poncet et al, 2008) que analiza la expresión de *DKC1* en LLC, encontrando también disminución en su expresión. Estos resultados resultan interesantes dado que, por el contrario, estudios en diferentes tumores sólidos han observado aumento de su expresión asociado a pronóstico adverso (Montanaro et al, 2008; Sieron et al, 2009; von Stedingk et al, 2013), en tanto que tumores indolentes o de crecimiento lento expresan bajos niveles de *DKC1* (Alawi and Lee, 2007; Gu et al, 2008; Alawi and Lin, 2011; Lin et al, 2014). En cuanto a *hTERT*, este gen ha sido más ampliamente evaluado en LLC con resultados contradictorios. Poncet et al (2008) observaron disminución de su expresión, en tanto que otros autores (Terrin et al, 2007; Rampazzo et al, 2012; Hoxha et al, 2014) encontraron aumento de sus niveles de transcritos, asociado a enfermedad progresiva, indicando su importante rol en la tumorigénesis.

Por otra parte, nos interesó analizar si existía asociación entre el nivel de expresión de estos genes con la LT y los factores pronóstico de la patología. Con respecto a *hTERT*,

nuestros datos muestran una mayor expresión en los pacientes con telómeros cortos, alteraciones genéticas de mal pronóstico, número de anomalías e IGHV-NM, apoyando su asociación con progresión de la enfermedad. Estos resultados son concordantes con reportes de la literatura (Damle et al, 2004; Terrin et al, 2007; Sellman et al, 2011; Rampazzo et al, 2012; Hoxha et al, 2014), sustentando la importancia de la actividad de telomerasa en la supervivencia de las células leucémicas. Hoxha et al (2014) detectan aumento de la expresión de este gen en estadios iniciales de la LLC, indicando que su desregulación es un evento temprano en el desarrollo de la patología. En concordancia con estos datos, nuestros pacientes con alta expresión de *hTERT* mostraron más corta SLT, afirmando la relación entre telómeros disfuncionales y progresión en LLC.

En cuanto a los restantes genes, pudimos evidenciar un aumento significativo de la expresión de *DKC1* asociado a la presencia de telómeros más cortos y en pacientes con LLC en estadios avanzados. Sabemos que la proteína DKC1 es requerida para la correcta actividad de la telomerasa, que actúa uniéndose directamente al complejo enzimático, participando en la estabilización de hTR (Alawi and Lin, 2011). Experimentos *in vitro* han demostrado que la pérdida de la función de esta proteína afecta la actividad de la telomerasa mediante la reducción de los niveles de hTR, conduciendo a un acortamiento de los telómeros (Mitchell et al, 1999b; Montanaro et al, 2008), capaces de generar fusiones cromosómicas, que llevan a rearrreglos asociados al desarrollo tumoral (Blasco et al, 2005; Artandi et al, 2006). Mutaciones en este gen determinan el desarrollo de la diskeratosis congénita, enfermedad caracterizada por diferentes anomalías que incluyen alteraciones de la piel, falla medular, aumento de predisposición al desarrollo neoplásico e importante acortamiento telomérico, asociado a inestabilidad genómica (Mason et al, 2011) Dicho acortamiento telomérico estaría relacionado con la dificultad de estabilizar a la telomerasa, permitiendo la proliferación de con telómeros disfuncionales (Wong et al, 2006; Mason et al, 2011). Las mutaciones de *DKC1* parecen afectar la expresión y función de los H/ACA snoRNA y son consistentes con el rol de *DKC1* en la modulación de los mismos (Gu et al, 2008; Alawi and Lin, 2011). En cáncer de próstata, la inhibición de *DKC1* mediante siRNA (*small interfering RNA*) afecta la proliferación celular y da lugar a la disminución del tamaño y el desprendimiento espontáneo de las células,

compatible con un defecto en la biosíntesis de proteínas (Sieron et al, 2009). Asimismo, diferentes estudios muestran un aumento de la expresión de *DKC1* asociada a marcadores de proliferación como Ki67 y MYC (Sieron et al, 2009; Liu et al, 2012), hallazgo que sustentaría su incremento en nuestros pacientes con LLC progresiva. En cuanto a neoplasias linfoides, un estudio de nuestro grupo detectó aumento de *DKC1* asociado a telómeros cortos en pacientes con mieloma múltiple, apoyando la participación de este gen en el mantenimiento de la actividad de telomerasa y su posible rol en la tumorigénesis (Panero et al, 2015).

En cuanto a hTR, es un gen ampliamente expresado en células humanas (Kim et al, 1994; Wright et al, 1996). Nuestros pacientes con LLC mostraron disminución de su expresión, así como mayores niveles de transcritos en los casos con telómeros largos, sin anomalías o con una única alteración, y en aquellos con anomalías asociadas a buen pronóstico en la patología. Sus mutaciones se encuentran también asociadas a disqueratosis congénita (Vulliamy et al, 2006) y en menor proporción a síndromes de falla medular y mielodisplasia (Field et al, 2006; Bessler et al, 2008; Ueda et al, 2014), ambas patologías relacionadas a telómeros cortos y desarrollo neoplásico.

En lo que respecta a los restantes genes, se observó una significativa correlación entre los niveles de expresión de *GAR1*, *NHP2* y *NOP10*, indicando una estrecha interacción entre los mismos, asociada a su rol en el complejo RNP. Por su parte, mayores niveles de expresión de *GAR1* y *NHP2* se encontraron asociados al número de alteraciones genéticas, y *NHP2* presentó mayor expresión en relación al aumento de la linfocitosis. En cuanto a *NOP10*, mostró disminución significativa de los niveles de transcritos respecto de controles y mayor expresión en pacientes con telómeros largos y en aquellos sin alteraciones o con una sola anomalía citogenética. Como sabemos, las proteínas del complejo RNP H/ACA contribuyen al ensamblaje y estabilización de la telomerasa, así como al procesamiento post-transcripcional del RNA ribosómico y del espliceosoma (Lin et al, 2015). *DKC1*, *NHP2* y *NOP10* forman un *core* que se une directamente al complejo RNP H/ACA, siendo interdependientes para mantener la estabilidad del complejo y de la unión al RNA (Grozdanov et al, 2009); la pérdida de

función de alguna de ellas reduce la estabilidad de hTR y disminuye la actividad de la telomerasa. GARI se une solamente a DKC1 y es necesaria para el buen funcionamiento del complejo; su ausencia no afecta a la estabilidad y los niveles de hTR (Darzacq et al, 2006; Vulliamy et al, 2008). Después de la unión de GARI, el complejo H/ACA maduro se mueve desde el núcleo al nucléolo y los cuerpos de Cajal, lugares en los que cumpliría sus primeras funciones, considerándose que el mismo podría regular numerosos procesos biológicos (Meier et al, 2006; Jady et al, 2012). Estudios en neuroblastoma (von Stedingk et al, 2013) encuentran asociación entre mayor expresión de *DKC1*, *GARI* y *NHP2* con estadios avanzados y peor pronóstico de la enfermedad, siendo predictores de la SV de los pacientes. Los autores muestran una correlación positiva con la sobreexpresión de la telomerasa, afirmando su actividad conjunta para mantener la LT, previniendo la generación de eventos genómicos perjudiciales, capaces de conducir a la crisis e inicio de la muerte celular programada. La literatura presenta escasa información sobre el comportamiento de las proteínas asociadas a H/ACA box en enfermedades hematológicas. Un trabajo de nuestro grupo empleando *microarrays* muestra un aumento en la expresión de *DKC1*, *NOP10*, *GARI* y *NHP2* en mieloma múltiple y líneas celulares de mieloma (Díaz de la Guardia et al, 2012), en tanto que un estudio más reciente sobre líneas celulares (Lin et al, 2015) encuentra una expresión diferencial en células normales y transformadas, así como en respuesta a distintos agentes genotóxicos y, particularmente al daño al ADN, sugiriendo que esta sobreexpresión podría ser responsables, al menos en parte, de la supervivencia y la proliferación de las células tumorales, factores de importancia en la progresión tumoral.

Como sabemos, el complejo RNP está conformado por las proteínas *DKC1*, *NOP10*, *GARI* y *NHP2* y RNAs no codificantes (ncRNAs), particularmente snoRNA y scaRNAs. Evidencias experimentales han mostrado que la disfunción de estos ncRNAs se encuentra asociada al origen de las neoplasias humanas (Williams et al, 2012; McMahon et al, 2015). Al presente existe muy poca información al respecto en neoplasias hematológicas, con datos en mieloma múltiple, patología en la que se observó asociación con los diferentes grupos de riesgo molecular (López Corral et al, 2012; Chu et al, 2012; Ronchetti et al, 2012). La literatura exhibe un solo reporte que evalúa el rol de estos

ncRNAs en LLC mediante *microarrays* (Ronchetti et al, 2013), que detecta una disminución de la expresión del SNORA70F en los pacientes con pronóstico adverso, y postula la presencia de dos grupos con diferentes niveles de expresión de SNORA74A y SNORO116-18 con distinta evolución clínica, sugiriendo que la desregulación de ciertos ncRNAs podría ser de relevancia en el pronóstico de la patología, así como una nueva fuente de blancos moleculares.

Concluyendo, nuestro estudio permite sustentar hallazgos previos en la expresión de *hTERT* y revela nueva información sobre *hTR* y los genes que codifican para las proteínas del complejo RNP, evaluando por primera vez, a nuestro conocimiento, sus niveles de expresión y su relación con la longitud telomérica, alteraciones genéticas, perfil mutacional de IGHV y parámetros clínicos en pacientes con LLC, sugiriendo su participación en la disfunción telomérica presente en la la patología.

7. Conclusiones

7. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta lo precedentemente expresado, los estudios efectuados en el presente trabajo permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

- ✓ Los pacientes con LLC presentaron una reducción significativa del tamaño telomérico respecto de controles, confirmando la presencia de disfunción telomérica en esta patología.
- ✓ El análisis de la LT en función de las alteraciones de riesgo genético mostró telómeros significativamente más cortos en los casos con anomalías de mal pronóstico respecto de aquellas asociadas a buena evolución clínica, así como en relación con el número de alteraciones, sustentando su asociación con complejidad genómica.
- ✓ La correlación con los parámetros clínicos evidenció una SLT significativamente más corta en aquellos casos con alteraciones genómicas de alto riesgo, asociadas a telómeros cortos, respecto de aquellos correspondientes al grupo de buen pronóstico, relacionados a telómeros más largos, indicando la importancia del acortamiento telomérico en el desarrollo de la inestabilidad genómica en esta patología.
- ✓ El análisis de las familias IGHV en nuestra serie permitió observar una representación IGHV3>IGHV4>IGHV1, análoga a la descrita para Uruguay, reflejando similitudes en el *background* genético y/o la influencia de factores ambientales.
- ✓ En cuanto a la distribución de genes, *IGHV3-7*, *IGHV3-21* e *IGHV4-59* se encontraron más representados, en tanto que *IGHV1-69* se observó sub-representado, respecto de otras regiones geográficas.

- ✓ Los pacientes con IGHV-NM mostraron acortamiento significativo de sus telómeros, en tanto que aquellos con expresión de *IGHV3-21*, rearreglo asociado a mal pronóstico, presentaron la mayor proporción de telómeros cortos.
- ✓ La correlación con las características clínicas evidenció mayor masa tumoral y menor SV en los casos con IGHV-NM, respaldando el rol del acortamiento telomérico en el desarrollo y progresión de la LLC.
- ✓ El análisis de expresión génica mostró una desregulación global de los niveles de transcripto de los genes *GARI*, *NHP2*, *NOP10*, *DKC1*, *hTR* y *hTERT*, en los pacientes con LLC respecto de controles. *GARI*, *NHP2* y *NOP10* presentaron correlación positiva, indicando la interacción existente entre los mismos, asociada a su rol en el complejo ribonucleoproteico.
- ✓ El gen *hTERT* evidenció mayor expresión en los pacientes con telómeros cortos, alteraciones genéticas de mal pronóstico, número de anomalías e IGHV-NM, sustentando su asociación con progresión de la enfermedad y la importancia de la actividad de telomerasa en la supervivencia de las células leucémicas.
- ✓ *DKC1* mostró aumento significativo de su expresión asociado a la presencia de telómeros más cortos y estadios avanzados, evidenciando su estrecha relación con la actividad de la telomerasa.
- ✓ En cuanto a *hTR*, gen ampliamente expresado en células humanas, nuestros pacientes mostraron disminución de su expresión respecto de controles, así como mayores niveles de transcripto en los casos con telómeros largos, sin anomalías o con una única alteración, características asociadas a buen pronóstico en la patología.
- ✓ *GARI* y *NHP2* presentaron niveles aumentados de transcripto en los pacientes con mayor número de alteraciones genéticas, y *NHP2* presentó sobre-expresión en relación al aumento de la linfocitosis. En cuanto a *NOP10*, presentó disminución

significativa de los niveles de transcritto respecto de controles y mayor expresión en pacientes con telómeros largos y en aquellos sin alteraciones o con una sola anomalía citogenética.

- ✓ Nuestro estudio resulta concordante con hallazgos previos en la expresión de *hTERT* y brinda nueva información sobre *hTR* y los genes que codifican para las proteínas del complejo RNP, siendo a nuestro conocimiento, el primer análisis de los mismos en LLC, sustentando su participación en la disfunción telomérica presente en esta entidad.

- ✓ Finalmente, consideramos que el presente trabajo constituye un aporte a la caracterización biológica de la LLC así como a la comprensión de los mecanismos patogénicos involucrados en su desarrollo.

7. Bibliografía

8. Bibliografía

- Abramenko I, Bilous N, Kryachok I, et al. IGHV3-21 gene expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia in Ukraine. *Exp Oncol* 2007; 29: 226-30.
- Agarwal S, Daley GQ. AID for reprogramming. *Cell Res* 2010; 20: 253-5.
- Agathangelidis A, Stavroula N and Stamatopoulos K. B Cell Receptor and Antigens in CLL. In: *Advances in Chronic Lymphocytic Leukemia, Advances in Experimental Medicine and Biology*. S. Malek (ed.) 2013; pp 1-24.
- Agathangelidis, A. Vardi, P. Baliakas, K. Stamatopoulos, Stereotyped Bcell receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2014; 2252-61.
- Alawi F, Lee MN. DKC1 is a direct and conserved transcriptional target of c-MYC. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007,3;362:893-8.
- Alawi F, Lin P. Dyskerin is required for tumor cell growth through mechanisms that are independent of its role in telomerase and only partially related to its function in precursor rRNA processing. *Mol Carcinog* 2011; 50: 334-45.
- Alexandrescu DT, Wiernik PH. The Influence of Parental Age and Gender on Anticipation in Familial B-Cell Malignancies. *Med Oncol* 2007; 24: 55–62.
- Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nature Rev Genet*. 2012 13:693–704.
- Artandi SE. Telomeres, Telomerase, and Human Disease. *NEJM* 2006; 355:1195-7.
- Auchter M, Medves S, Chambeau L, et al. Mechanisms of telomere maintenance dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia through CpG island methylation, *Blood* 120,2012;120:3489 (Abstract).
- Audrito V, Serra S, Brusa D, et al. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2015; 125: 111-23.
- Auer RL, Dighiero G, Goldin LR, et al. Trinucleotide repeat dynamic mutation identifying susceptibility in familial and sporadic chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 136: 73-9
- Augereau A, T'kint de Roodenbeke C, Simonet T, et al. Telomeric damage in early stage of chronic lymphocytic leukemia correlates with shelterin dysregulation. *Bood* 2011, 118: 1316-1322
- Autexier C, Pruzan R, Funk WD, Greider CW. Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *EMBO J* 1996; 15:5928-35.

- Avena S, Via M, Ziv E, et al. Heterogeneity in genetic admixture across different regions of Argentina. *PLoS One* 2012; 7: e34695.
- Azzalin CM, Lingner J. Telomeres: the silence is broken. *Cell Cycle*. 2008;7:1161-5.
- Bechter OE1, Eisterer W, Dlaska M, et al. CpG island methylation of the hTERT promoter is associated with lower telomerase activity in B-cell lymphocytic leukemia. *Exp Hematol*. 2002;30:26-33.
- Berkova A, Zemanova Z, Trneny M, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia studied by interphase fluorescence in-situ hybridization. *Neoplasma* 2009; 56: 455-8.
- Bessler M., Mason P, Link D, et al. Inherited bone marrow failure syndromes. In: Orkin, S.; Nathan, D.; Ginsburg, D.; Look, A.; Fisher, D.; Lux, S., editors. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood*. Philadelphia: Saunders; 2008. p. 307-395.
- Bezares RF, Slavutsky I, Gabus R, et al. Leucemia Linfocítica Crónica, en: "Manual de oncohematología. Las neoplasias linfoides", Norma Tartas, Marta Zerga, Julio Sánchez Ávalos, eds, 2009; pp. 27-48.
- Bianchi S, Moreno P, Landoni AI, et al. Immunoglobulin heavy chain V-D-J gene rearrangement and mutational status in Uruguayan patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2010; 51: 2070-8.
- Biéche I, Nogués C, Paradis V, et al. Quantitation of hTERT Gene Expression in Sporadic Breast Tumors with a Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay. *Clin Cancer Res* 2000, 6, 452-459
- Bilous N, Bomben R, Dal Bo M, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukemia with stereotyped B-cell receptors in a Ukrainian cohort. *Leuk Lymph*. 2010;51:822-38.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.
- Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 1978; 120: 33-53
- Blackburn EH. Telomerase and Cancer: Kirk A. Landon AACR prize for basic cancer research lecture. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 477-82.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; 91:25-34.

- Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005;6: 611-622
- Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol.* 2007;3:640-9.
- Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, et al. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996; 184: 1101-9.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.
- Bomben R, Dal Bo M, Capello D, et al. Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *Blood.* 2007,1;109:2989-98.
- Bomben R, Dal Bo M, Capello D, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *Br J Haematol.* 2009;144:492-506.
- Bomben R, Dal-Bo M, Benedetti D, et al. Expression of mutated IGHV3-23 genes in chronic lymphocytic leukemia identifies a disease subset with peculiar clinical and biological features. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 620-8.
- Boonstra JG, van Lom K, Langerak AW, et al. CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70: 136-41.
- Braggio E, Kay NE, VanWier S, et al. Longitudinal genome-wide analysis of patients with chronic lymphocytic leukemia reveals complex evolution of clonal architecture at disease progression and at the time of relapse. *Leukemia.* 2012; 26: 1698-1701.
- Brown J, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 1997; 277: 831-4.
- Brown, J. Inherited predisposition to chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Hematol* 2008; 1: 51-61.
- Brown J, Hanna M, Tesar B, Pochet N, et al. Germline copy number variation associated with Mendelian inheritance of CLL in two families. *Leukemia* 2012; 26: 1710-3.
- Brown J. Inherited susceptibility to chronic lymphocytic leukemia: evidence and prospects for the future. *Ther Adv Hematol* 2013; 4: 298–308.
- Brugat T1, Nguyen-Khac F, Grelier A, Merle-Béral H, Delic J. Telomere dysfunction-induced foci arise with the onset of telomeric deletions and complex chromosomal

- aberrations in resistant chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2010; 116: 239-49.
- Brunori M, Gilson E. Telomere and cancer: what's more at the end? *Med Sci* 2005; 21: 37-42.
- Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, et al. Fibroblastlikesynoviocytes support B-cell pseudoemperipolexis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM-1)-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2001; 107: 305-15.
- Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009a; 114: 3367-75.
- Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009b; 113: 3050-8.
- Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 96-103.
- Burger JA. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol* 2012; 24: 643-9.
- Bürkle A, Niedermeier M, Schmitt-Gräff A, et al. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 110: 3316-25.
- Cairney CJ, Keith WN. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie* 2008; 90:13-23.
- Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 380-8.
- Caligaris-Cappio F, Bertilaccio MT, Scielzo C. How the microenvironment wires the natural history of chronic lymphocytic leukemia, *Sem Cancer Biol* 2014; 24: 43-8.
- Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy S, Levy R. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region repertoire. *Mol Immunol* 1992; 29: 193-203.
- Caporaso N, Marti GE, Goldin L. Perspectives on familial chronic lymphocytic leukemia: genes and the environment. *Semin Hematol* 2004; 41: 201-6.
- Cavazzini F, Rizzotto L, Sofritti O, et al. Clonal evolution including 14q32/IGH translocations in chronic lymphocytic leukemia: analysis of clinicobiologic correlations in 105 patients. *Leuk Lymph* 2012; 53: 83-8.

- Cayuela ML, Flores JM, Blasco MA. The telomerase RNA component Terc is required for the tumour-promoting effects of Tert overexpression. *EMBO Rep* 2005; 6: 268-74.
- Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet.* 2010;11:319-30.
- Chadeau-Hyam M, Vermeulen RC, Hebels DG, et al. Prediagnostic transcriptomic markers of chronic lymphocytic leukemia reveal perturbations 10 years before diagnosis. *Ann Oncol* 2014; 25: 1065-72.
- Chang JT, Chen YL, Yang HT, Chen CY, Cheng AJ. Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *Eur J Biochem* 2002; 269: 3442-50.
- Chang YH, Park J, Kim HC, et al. Korean patients with chronic lymphocytic leukemia show the similar types of chromosomal aberrations as those in Europe and North America. *Leuk Res* 2006; 30: 695-9.
- 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: 4609-14.
- Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 105: 2036-41.
- Chen L, Huynh L, Apgar J, et al. ZAP-70 enhances IgM signaling independent of its kinase activity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008a; 111: 2685-92.
- Chen L, Zhang Y, Zheng W, et al. Distinctive IgVH gene segments usage and mutation status in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2008b; 32: 1491-8.
- Chena C, Cerretini R, Noriega MF, et al. Cytogenetic, FISH, and molecular studies in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia with karyotypic evolution. *Eur J Haematol* 2002; 69: 309-14.
- Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002; 116: 142-50.
- Chillemi A, Zaccarello G, Quarona V, et al. CD38 and bone marrow microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014; 19: 152-62.
- Chiodi I, Belgiovine C, Zongaro S, et al. Super-telomeres in transformed human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833: 1885-93.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352: 804-15.

- Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 2011; 117: 1781-91.
- Chu L, Su MY, Maggi LB Jr, et al. Multiple myeloma-associated chromosomal translocation activates orphan snoRNA ACA11 to suppress oxidative stress. *J Clin Invest* 2012, 122:2793–2806.
- Clifford R, Schuh A. State-of-the-Art management of patients suffering from chronic lymphocytic leukemia. *Oncology* 2012; 6: 165-78.
- Codd V, Mangino M, van der Harst P, et al. Common variants near TERC are associated with mean telomere length. *Nat Genet* 2010; 42: 197-9.
- Coelho V, Krysov S, Steele A, et al. Identification in CLL of circulating intracлонаl subgroups with varying B-cell receptor expression and function. *Blood* 2013; 122: 2664-72.
- Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 2007; 315: 1850-3.
- Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 2002; 21:564-79.
- Collins K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 484–494.
- Cottliar A, Pedrazzini E, Corrado C, Engelberger MI, Narbaitz M, Slavutsky I. Telomere shortening in patients with plasma cell disorders. *Eur J Haematol* 2003; 71:334-40.
- Cottliar AS, Panero J, Pedrazzini E, Noriega MF, Narbaitz M, Rodríguez A, Slavutsky I. Analysis of telomere length in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2009; 83:433-8.
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11: 1921-9.
- Court R, Chapman L, Fairall L, Rhodes D. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *EMBO J* 2005; 6:39-45.
- 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: 1764-75.
- Crowther-Swanepoel D, Houlston RS. Genetic variation and risk of chronic lymphocytic leukaemia. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 363-9.

- Cusanelli E, Chartrand P. Telomeric repeat-containing RNATERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. *Front Genet.* 2015;6:143.
- Dal-Bo M, Bertoni F, Forconi F, et al. Intrinsic and extrinsic factors influencing the clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia: prognostic markers with pathogenetic relevance. *J Transl Med* 2009; 7: 76-90.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1840-7.
- Damle RN, Batliwalla 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: 375-82.
- Damle RN, Calissano C, Chiorazzi N. Chronic lymphocytic leukemia: a disease of activated monoclonal B cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23: 33-45.
- Darzacq X, Kittur N, Roy S, Shav-Tal Y, Singer RH, Meier UT. Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *J Cell Biol.* 2006; 173:207-218
- Davids MS, Brown JR. Targeting the B cell receptor pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2012; 53: 1-23.
- Davids MS, Burger JA. Cell Trafficking in chronic lymphocytic leukemia. *Open J Hematol.* 2012; 3 (S1). pii: -3.
- de Lange T. T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 323-9.
- de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; 19: 2100-10.
- de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 2009; 326:948-52.
- Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007; 110: 4012-21.
- Denchi EL. Give me a break: how telomeres suppress the DNA damage response. *DNA Repair* 2009; 8:1118-26.
- Deng Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumor suppression: the senescence connection. *Nature* 2008; 8: 450-8.
- Dessain SK, Yu H, Reddel RR, et al. Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res.* 2000;60:537-41.
- Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2008; 40: 1204-10.

- Díaz de la Guardia R, Catalina P, Panero J, et al. Expression profile of telomere-associated genes in multiple myeloma. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 3009-21.
- Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detects chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgV_H status, and CD38 expression. *Blood* 2006; 108: 3152-60.
- Dighiero G. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia* 2003; 17: 2385-91.
- Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Lancet* 2008; 371: 1017-29.
- Doheny JG, Mottus R, Grigliatti TA. Telomeric position effect--a third silencing mechanism in eukaryotes. *PLoS One* 2008; 3: e3864.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-16.
- Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, et al. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 2007; 139: 809-19.
- Dos Santos P, Panero J, Palau Nagore V, Stanganelli C, Bezares RF, Slavutsky I. Telomere shortening associated with increased genomic complexity in chronic lymphocytic leukemia. *Tumour Biol.* 2015;36:8317-24.
- Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* 2012; 489: 309-12.
- Duke VM, Gandini D, Sherrington PD, et al. VH gene usage differs in germline and mutated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2003; 88: 1259-71.
- Dupont J, Bezares R, Bistmas A, et al. Síndromes linfoproliferativos crónicos. En: *Guías de Diagnóstico y Tratamiento, Sociedad Argentina de Hematología, 2015, Tomo II, pp 465-501.*
- Etcheverry GJ. Where chromosomes end. Nobel Prize of Physiology or Medicine 2009. *Medicina.* 2009;69:681-4.
- Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011; 208: 1389-401.
- Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102: 1515-25.

- Farr C, Fantes J, Goodfellow P, Cooke H. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88: 7006–10.
- Ferri CA, Bianchini M, Bengiό RM, et al. Clinical activity of ponatinib in one patient with chronic myeloid leukemia in chronic phase with e19a2 transcript and T315I mutation. *Eur J Haematol* 2015; 94: 270-2.
- Field JJ, Mason PJ, An P, et al. Low frequency of telomerase RNA mutations among children with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2006; 28:450–453
- Filip AA, Cisel B, Koczkodaj D, et al. Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages? *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50: 263-70.
- Filipowicz W, Pogacić V. Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 319-27.
- Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, et al. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol.* 2007; 165: 14-21.
- Foà R, Del Giudice I, Guarini A, Rossi D, Gaidano G. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013; 98: 675-85.
- Fournier S, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Role for low affinity receptor for IgE (CD23) in normal and leukemic B-cell proliferation. *Blood* 1994; 84: 1881–1886.
- Fournier S, Yang LP, Delespesse G, et al. The two CD23 isoforms display differential regulation in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1995; 89:373–379.
- García-Muñoz R, Galiacho VR, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann Hematol* 2012; 91: 981-96.
- García-Muñoz R, Llorente L. Chronic lymphocytic leukaemia: could immunological tolerance mechanisms be the origin of lymphoid neoplasms? *Immunology* 2014; 142: 536-50
- Ghia P, Stroala 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: 1403-13.
- Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005; 105: 1678-85.

- Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med* 2008; 264: 549-62.
- Ghiolo S, Soler J, Greenway S, et al. Brazilian population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 111-6.
- 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: 1008-16.
- Gilson E, Géli V. How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:825-38.
- Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, et al. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol* 1998; 51: 364-9.
- Gisselsson D, Jonson T, Petersén A, et al. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12683-8.
- Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, et al. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* 2007; 109: 2032-9.
- Goldin LR, Slager SL. Familial CLL: genes and environment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 339-45.
- Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, et al. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2009; 94: 647-53.
- González-Suárez E, Samper E, Ramírez A, et al. Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J.* 2001, 1;20:2619-30.
- Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, et al. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005; 105: 4807-12.
- Grozdanov PN, Roy S, Kittur N, Meier UT. SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs. *RNA*, 2009;15:1188-97.
- Gu BW, Bessler M, Mason PJ. A pathogenic dyskerin mutation impairs proliferation and activates a DNA damage response independent of telomere length in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:10173-10178.
- Guilleret I, Yan P, Grange F, et al. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer.* 2002;101:335-41.

- Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, et al. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011; 96: 1161-9.
- Hadzidimitriou A, Darzentas N, Murray F, et al. Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 113: 403-11. 166868.
- Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood*. 2011;118:3088-95.
- Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007;21:2442-51.
- Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93: 1732-7.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446-56.
- Hallek M. CME Information: Chronic lymphocytic leukemia: 2015. Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2015; 90: 446-60.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1848-54.
- 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: 1023-9.
- Hamblin TJ, Davis ZA, Oscier DG. Determination of how many immunoglobulin variable region heavy chain mutations are allowable in unmutated chronic lymphocytic leukaemia - long-term follow up of patients with different percentages of mutations. *Br J Haematol* 2008; 140: 320-3.
- Hänsel R, Löhr F, Foldynová-Trantírková S, et al. The parallel G-quadruplex structure of vertebrate telomeric repeat sequences is not the preferred folding topology under physiological conditions. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(13):5768-75.

- Hao LY, Armanios M, Strong MA, Karim B, Feldser DM, Huso D, et al. Short telomeres, even in the presence of telomerase, limit tissue renewal capacity. *Cell*. 2005;123:1121-31
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965;37:614-36.
- Heaphy CM, Subhawong AP, Hong SM, et al. Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *Am J Pathol*. 2011;179:1608-15.
- Heinig K, Gatjen M, Grau M, et al. Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation, *Cancer Discovery* 2014; 4: 1448-65.
- Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 5; 2001 107:67-77.
- Hojjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Sharifian RA, et al. Analysis of the immunoglobulin heavy chain variable region gene expression in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2007; 48: 109-16.
- Hojjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Razavi SM, et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage and mutational status of the leukemic B cells in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Sci* 2009; 100: 2346-53.
- Horn S1, Figl A, Rachakonda PS, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013, 22;339:959-61.
- Houlston RS, Sellick G, Yuille M, et al. Causation of chronic lymphocytic leukemia--insights from familial disease. *Leuk Res* 2003; 27: 871-6.
- Houlston RS, Catovsky D. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2008; 3: 221-5.
- Hoxha M, Fabris S, Agnelli L, et al. Relevance of telomere/telomerase system impairment in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chrom Cancer* 2014; 53: 612-21.
- Huang FW, Hodis E, Xu MJ, et al. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013;339:957-9.
- Huemer M, Rebhandl S, Zaborsky N, et al. AID induces intraclonal diversity and genomic damage in CD86(+) chronic lymphocytic leukemia cells. *Eur J Immunol*. 2014; 44: 3747-57.

- Hultdin M, Grönlund E, Norrback KF, et al. Replication timing of human telomeric DNA and other repetitive sequences analyzed by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Exp Cell Res*. 2001;271:223-9.
- Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98: 181-6.
- Ibrahim S, Jilani I, O'Brien S, et al. Clinical relevance of the expression of the CD31 ligand for CD38 in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2003; 97: 1914-9.
- Ikematsu W, Ikematsu H, Okamura S, et al. Surface phenotype and Ig heavy-chain gene usage in chronic B cell leukemias: expression of myelomonocytic surface markers in CD5-chronic B cell leukemia. *Blood* 1994; 83: 2602-10.
- Irons RD, Le A, Bao L, et al. Characterization of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) in Shanghai, China: molecular and cytogenetic characteristics, IgV gene restriction and hypermutation patterns. *Leuk Res* 2009; 33: 1599-1603.
- Jacob NK, Kirk KE, Price CM. Generation of telomeric G strand overhangs involves both G and C strand cleavage. *Mol Cell* 2003; 11: 1021-32.
- Jady BE, Ketele A, Kiss T. Human intron-encoded Alu RNAs are processed and packaged into Wdr79-associated nucleoplasmic box H/ACA RNPs. *Genes Dev*. 2012; 26:1897–1910
- Janssens A, Van Roy N, Poppe B, et al. High-risk clonal evolution in chronic B-lymphocytic leukemia: single-center interphase fluorescence in situ hybridization study and review of the literature. *Eur J Haematol* 2012; 89: 72-80.
- Jebaraj BMC, Kienle D, Lechel A, et al. Telomere length in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2013;121:1184-7.
- Jethwa A, Hüllelein J, Stolz T, et al. Targeted resequencing for analysis of clonal composition of recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2013; 163: 496-500.
- Jiao Y, Shi C, Edil BH, et al. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*. 2011;331:1199-203.
- Jones CH, Pepper C, Baird DM. Telomere dysfunction and its role in haematological cancer. *Br J Haematol*. 2012;156:573-87.
- Kang HS1, Jung HM, Jun DY, Huh TL, Kim YH. Expression of the human homologue of the small nucleolar RNA-binding protein NHP2 gene during monocytic differentiation of U937 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1575: 31-9.

- 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: 1165-71.
- Kienle DL, Korz C, Hosch B, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol.* 2005;23:3780-92.
- Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2011; 20: 246-59.
- Kikushige Y, Miyamoto T. Pre-malignant lymphoid cells arise from hematopoietic stem/progenitor cells in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol* 2015 [Epub ahead of print]
- Killela PJ1, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:6021-6.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994;266:2011-5.
- Kiss T, Fayet E, Jády BE, Richard P, Weber M. Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006; 71: 407-17.
- Kiss T, Fayet-Lebaron E, Jády BE. Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol Cell* 2010; 37: 597-606.
- Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1999; 106: 995-1004.
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, 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: 1625-38.
- Knauf WU, Ehlers B, Mohr B, et al. Prognostic impact of the serum levels of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1997; 89: 4241-2.
- Köchling M, Ewelt C, Fürtjes G, et al. hTERT promoter methylation in pituitary adenomas. *Brain Tumor Pathol.* 2015 Sep 21. [Epub ahead of print]
- Koiso H, Yamane A, Mitsui T, et al. Distinctive immunoglobulin VH gene usage in Japanese patients with CLL. *Leuk Res* 2006; 30: 272-6.

- Kriston C, Bödör C, Szenthe K, et al. Low CD23 expression correlates with high CD38 expression and the presence of trisomy 12 in CLL. *Hematol Oncol* 2015. doi: 10.1002/hon.2244.
- Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 969-75.
- Kuraoka M, Holl TM, Liao D, et al. Activation-induced cytidine deaminase mediates central tolerance in B cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 2011; 108: 11560-5.
- Lafarge S, Hou S, Paulsc SD, et al. Differential expression and function of CD27 in chronic lymphocytic leukemia cells expressing ZAP-70. *Leuk Res* 2015; 39:773-8.
- Landau DA, Wu CJ. Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. *Genome Med* 2013; 5: 47.
- Lanham S, Hamblin T, Oscier D, et al. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101: 1087-93.
- Lefranc M-P. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp Clin Immunogenet* 2001; 18: 100-16.
- Lei M, Podell ER, Cech TR. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:1223-9.
- Lin P, Mobasher ME, Hakakian Y, et al. Differential requirements for H/ACA ribonucleoprotein components in cell proliferation and response to DNA damage. *Histochem Cell Biol.* 2015;144:543-58.
- Lin TT, Letsolo BT, Jones RE, et al. Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis. *Blood* 2010; 116: 1899-907.
- Lin TT, Norris K, Heppel NH, et al. Telomere dysfunction accurately predicts clinical outcome in chronic lymphocytic leukaemia, even in patients with early stage disease. *Br J Haematol* 2014; 167: 214-23.
- Liu B, Zhang J, Huang C, Liu H. Dyskerin overexpression in human hepatocellular carcinoma is associated with advanced clinical stage and poor patient prognosis. *PLoS One.* 2012;7: e43147
- Longo P G, Laurenti L, Gobessi S, et al. The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease. *Leukemia* 2007; 21: 110-20.

- Lopez-Corral L, Mateos MV, Corchete LA, Sarasquete ME, la RJ D, De AF, Lahuerta JJ, Garcia-Sanz R, San Miguel JF, Gutierrez NC: Genomic analysis of high risk smoldering multiple myeloma. *Haematologica* 2012, 97:1439–43.
- Ly H. Telomere dynamics in induced pluripotent stem cells: Potentials for human disease modeling. *World J Stem Cells*. 2011;3:89-95.
- Maffei R, Bulgarelli J, Fiorcari S, et al. Endothelin-1 Promotes Survival and Chemoresistance in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells through ETA Receptor, *Plos One* 2014; 9: e98818.
- Magnac C, Porcher R, Davi F, et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 2003; 17: 133-7.
- Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, FerrariniM, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood* 2011; 118: 3470-8.
- Maloum K, Davi F, Merle-Béral H, et al. Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; 96: 377-9.
- Mansouri L, Grabowski P, Degerman S, et al. Short telomere length is associated with NOTCH1/SF3B1/TP53 aberrations and poor outcome in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol* 2013; 88: 647-51.
- Marcos-Gragera R, Allemani C, Tereanu C, et al. HAEMACARE Working Group. Survival of European patients diagnosed with lymphoid neoplasms in 2000-2002: results of the HAEMACARE project. *Haematologica* 2011; 96: 720-8.
- Marincevic M, Cahill N, Gunnarsson R, et al. High-density screening reveals a different spectrum of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia patients with 'stereotyped' IGHV3-21 and IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica* 2010; 95: 1519-25.
- Marquez ME, Deglesne PA, Lopez JL, et al. Unexpectedly high frequency of European parentage in Venezuelan patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2012; 53: 235-241.
- Mason PJ, Bessler M. The genetics of dyskeratosis congenita. *Cancer Genet*. 2011;204: 635-645.
- Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 209-20.
- Matos DM, Falcão RP. Monoclonal B-cell lymphocytosis: a brief review for general clinicians. *Sao Paulo Med J* 2011; 129: 171-5.
- Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, et al. The complex nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 1998; 188: 2151-62.

- Mauerer K, Zahrieh D, Gorgun G, et al. Immunoglobulin gene segment usage, location and immunogenicity in mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2005; 129: 499-510.
- Maura F, Cutrona G, Fabris S, et al. Relevance of stereotyped B-cell receptors in the context of the molecular, cytogenetic and clinical features of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One* 2011; 6: e24313.
- Mauro FR, Giammartini E, Gentile M, et al. Clinical features and outcome of familial chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 1117-20.
- Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 742-51.
- McCarthy H, Wierda WG, Barron LL, et al. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101: 4903-8.
- McClanahan F, Hanna B, Miller S, et al. PD-L1 Checkpoint Blockade Prevents Immune Dysfunction and Leukemia Development in a Mouse Model of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2015;126:203-11.
- McClintock B. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics*. 1941;26:234-82.
- McMahon M, Contreras A, Ruggero D. Small RNAs with big implications: new insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2015; 6: 173-89.
- Meier UT. The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma*. 2005; 114:1-14.
- Meier UT. How a single protein complex accommodates many different H/ACA RNAs. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31:311–315
- Mengual Gómez DL, Armando RG, Farina HG, Gómez DE. Telomerase and telomere: their structure and dynamics in health and disease. *Medicina* 2014; 74: 69-76.
- Messmer B T, Messmer D, Allen S L, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 755-64.
- Messmer D, Telusma G, Wasil T, Messmer BT, Allen S, Rai KR, Chiorazzi N. Dendritic cells from chronic lymphocytic leukemia patients are normal regardless of Ig V gene mutation status. *Mol Med* 2004; 10: 96-103.
- Meyers G, Ng YS, Bannock JM, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for B-cell tolerance in humans. *Proc Nat Acad Sc USA* 2011; 108: 11554-9.

- Mitchell JR, Cheng J, Collins K. A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol.* 1999a;19:567-76.
- Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999b; 402: 551-5.
- Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987; 60: 2712-6.
- Molica S, Reverter JC, Alberti A, Montserrat E. Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance. *Eur J Haematol* 1990; 44: 277-81.
- Montanaro L, Calienni M, Ceccarelli C, et al. Relationship between dyskerin expression and telomerase activity in human breast cancer. *Cell Oncol* 2008; 30: 483-90.
- Montillo M, Hamblin T, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005; 90: 391-9.
- Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Viñolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; 62: 567-75.
- 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: 378-82.
- Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2008; 22: 211-9.
- Moro I, Foren L, Guillermo C, et al. Primer registro nacional de leucemias. XI Congreso Uruguayo de Hematología, 2009.
- Motta M, Rassenti L, Shelvin BJ, et al. Increased expression of CD152 (CTLA-4) by normal T lymphocytes in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1788-93.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:6622-6.
- Muller HJ. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net-Woods Hole*, 1938, 13, pp. 181-98
- Müller-Hermelink HK, Monserrat E, Catovsky D, et al. Chronic Lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In: WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. SH Swerdlow, E Campo, NL Harris, ES

- Jaffe, SA Pileri, H Stein, J Thiele, JW Vardiman; eds. Lyon, IARC; 2008: pp 180-2.
- Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008; 111: 1524-33.
- Murray F, Insel PA. Targeting cAMP in chronic lymphocytic leukemia: a pathway-dependent approach for the treatment of leukemia and lymphoma. *Expert Opin Ther Targets* 2013; 17: 937-49.
- Nabetani A, Ishikawa F. Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *J Biochem* 2011; 149:5-14.
- Nabhan C, Raca G, Wang YL. Predicting Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Contemporary Era. *JAMA Oncol* 2015; 1: 965-74.
- Nakahashi H, Tsukamoto N, Hashimoto Y, et al. Characterization of immunoglobulin heavy and light chain expression in chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Cancer Sci* 2009; 100: 671-7.
- Nardini E, Neri F, Vicenzi E, et al. Thymic function and immunoglobulin mutation genotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Int J Cancer* 2003; 107: 958-61.
- Niida H, Matsumoto T, Satoh H, et al. Severe growth defect in mouse cells lacking the telomerase RNA component. *Nat Genet* 1998; 19:203-6.
- Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurse like cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* 2005; 106: 1012-20.
- Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, et al. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia* 2005; 19: 1018-24.
- O'Callaghan N, Dhillon V, Thomas P, Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *Biotechniques* 2008; 44: 807-9.
- O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 171-81.
- Okuda K, Bardeguéz A, Gardner JP, et al. Telomere length in the newborn. *Pediatr Res.* 2002; 52: 377-81.

- Oppezzo P, Vuillier F, Vasconcelos Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood* 2003; 101: 4029-32.
- 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: 650-7.
- Ortiz-Maldonado V, García-Morillo M, Delgado J. The biology behind PI3K inhibition in chronic lymphocytic leukaemia. *Ther Adv Hematol* 2015; 6: 25-36.
- O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11: 171-181.
- Ouillette P, Collins R, Shakhan S, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118: 3051-61.
- Palacios F, Abreu C, Prieto D, et al. Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia* 2015; 29: 115-25.
- Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 2008;42:301-34.
- Panero J, Stanganelli C, Arbelbide J, et al. Expression profile of shelterin components in plasma cell disorders. Clinical significance of POT1 overexpression. *Blood Cells Mol Dis* 2014; 52: 134-9.
- Panero J, O'Callaghan NJ, Fenech M, Slavutsky I. Absolute qPCR for measuring telomere length in bone marrow samples of plasma cell disorders. *Mol Biotechnol* 2015; 57: 155-9.
- Pasqualucci L1, Neri A, Baldini L, et al. BCL-6 mutations are associated with immunoglobulin variable heavy chain mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 2000;15;60:5644-8.
- Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 124: 49-62.
- Pimentel BJ, Stefanoff CG, Santos Moreira A, et al. Use of VH, D and JH immunoglobulin gene segments in Brazilian patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Genet Mol Biol* 2008; 31: 643-8.
- Poncet D, Belleville A, t'kint de Roodenbeke C, et al. Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111: 2388-91.
- Popescu NC, Zimonjic DB. Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93: 10-21.

- Popp C, Dean W, Feng S, et al. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 2010; 463, 1101-5.
- Potter KN, Orchard J, Critchley E, et al. Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire. *Blood* 2003; 101: 3082-4.
- Pritsch O, Magnac C, Dumas G, et al. V gene usage by seven hybrids derived from CD5+ B-cell chronic lymphocytic leukemia and displaying autoantibody activity. *Blood* 1993; 82: 3103-12.
- Pritsch O, Troussard X, Magnac C, et al. VH gene usage by family members affected with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 107: 616–24.
- Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; 475: 101-5.
- Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 44: 47-52.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-34.
- Rai KR, Sawitsky A. A review of the prognostic role of cytogenetic, phenotypic, morphologic, and immune function characteristics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells* 1987;12:327-38.
- Raices M, Verdun RE, Compton SA, Haggblom CI, Griffith JD, Dillin A, Karlseder J. C. elegans telomeres contain G-strand and C-strand overhangs that are bound by distinct proteins. *Cell* 2008; 132:745-57.
- Rampazzo E, Bonaldi L, Trentin L, Visco C, Keppel S, Giunco S, et al. Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *Haematologica*. 2012; 97: 56-63.
- Ramsay AG., Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood* 2012; 120: 1412-21.
- Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In Meuer S, Wittwer C, and Nakagawara K (eds): *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg, 2001:21–34.
- Rawstron AC, Hillmen P. Assessing minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2008; 3: 47-53.

- Reinart N, Nguyen PH, Boucas J, et al. Delayed development of chronic lymphocytic leukemia in the absence of macrophage migration inhibitory factor. *Blood* 2013; 121: 812–21.
- Reiners KS, Topolar D, Henke A, et al. Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity, *Blood* 2013; 121: 3658-65.
- Renaud S1, Loukinov D, Abdullaev Z, et al. Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:1245-56.
- Ricca I, Rocci A, Drandi D, et al. Telomere length identifies two different prognostic subgroups among VH-unmutated B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia* 2007; 21:697-705.
- Richard K, Pierce SK, Song W. The agonists of TLR4 and 9 are sufficient to activate memory B cells to differentiate into plasma cells in vitro but not in vivo. *J Immunol* 2008; 181: 1746-52.
- Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood* 2012; 119: 2310-3.
- Rigolin GM, Del Giudice I, Formigaro L, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer.* 2015. doi: 10.1002/gcc.22293.
- Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis.* 2000;21:461-7.
- Robles-Espinoza CD, Velasco-Herrera M del C, Hayward NK, Adams DJ. Telomere-regulating genes and the telomere interactome in familial cancers. *Mol Cancer Res.* 2015;13:211-22.
- Ronchetti D, Todoerti K, Tuana G, Agnelli L, Mosca L, Lionetti M, Fabris S, Colapietro P, Miozzo M, Ferrarini M, Tassone P, Neri A: The expression pattern of small nucleolar and small cajal body-specific RNAs characterizes distinct molecular subtypes of multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2012, 2:e96.
- Ronchetti D1, Mosca L, Cutrona G, et al. Small nucleolar RNAs as new biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *BMC Med Genomics* 2013; 3: 6:27.

- Roos G, Kröber A, Grabowski P, et al. Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111: 2246-52.
- 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: 1639-47.
- Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol.* 2008; 142: 202-15.
- Rossi D, Lobetti Bondoni C, Genuardi E, Monitillo L, Drandi D, Cerri M, et al. Telomere length is an independent predictor of survival, treatment requirement and Richter's syndrome transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2009; 23: 1062-72.
- Rossi D1, Rasi S, Spina V, Brusca A, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; 121: 1403-12.
- Rudd CE. Cell cycle 'check points' T cell anergy. *Nat Immunol* 2006; 7: 1130-2.
- Ruiz-Argüelles GJ, Velázquez BM, Apreza-Molina MG, et al. Chronic lymphocytic leukemia is infrequent in Mexican mestizos. *Int J Hematol* 1999; 69: 253-5.
- Santos FP, O'Brien S. Small lymphocytic lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: are they the same disease? *Cancer J* 2012; 18: 396-403.
- Sarthy J, Bae NS, Scrafford J, Baumann P. Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres. *EMBO J* 2009; 28:3390-9.
- Sawyer JR, Miller JP, Ellison DA. Clonal telomeric fusions and chromosome instability in a subcutaneous sacrococcygeal myxopapillary ependimoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 100: 169-75.
- Scielzo C, Apollonio B, Scarfo L, et al. The functional in vitro response to CD40 ligation reflects a different clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2011; 25: 1760-7.
- Seiler T, Döhner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33: 186-94.
- Seldin MF, Tian C, Shigeta R, et al. Argentine population genetic structure: Large variance in Amerindian contribution. *Am J Phys Anthropol* 2007; 132: 455-62.
- Sellick GS, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33: 195-201.

- Sellman L, de Beer D, Bartels M, et al. Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol* 2011; 93: 74-82.
- Sfeir A, de Lange T. Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science* 2012; 336: 593-7.
- Sfeir A, Kabir S, van Overbeek M, Celli GB, de Lange T. Loss of Rap1 induces telomere recombination in the absence of NHEJ or a DNA damage signal. *Science* 2010; 327: 1657-61.
- Shanafelt TD, Witzing TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4634-41.
- Shay JW, Werbin H, Wright WE. Telomeres and telomerase in human leukemias. *Leukemia* 1996; 10:1255-61.
- Shenoy PJ, Malik N, Sinha R, et al. Racial differences in the presentation and outcomes of chronic lymphocytic leukemia and variants in the United States. *Clin Lymph Myeloma Leuk* 2011; 11: 498-506.
- Shvidel L, Bairey O, Tadmor T, et al. Absolute lymphocyte count with extreme hyperleukocytosis does not have a prognostic impact in chronic lymphocytic leukemia. *Anticancer Res* 2015; 35: 2861-6.
- Sieron P, Hader C, Hatina J, et al. DKC1 overexpression associated with prostate cancer progression. *Br J Cancer* 2009; 101: 1410-6.
- Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, et al. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood* 2011; 117: 1911-6.
- Smith A, Howell D, Patmore R, et al. Incidence of haematological malignancy by subtype: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 2011; 105: 1684-92.
- Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separates by gel electrophoresis. *K Mol Biol* 1975; 98: 503-17.
- Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007; 109: 259-70.
- Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; 103: 4389-95.
- Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: Cancer to Human Aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006; 22: 531-57.

- Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H. Chronic lymphocytic leukemia. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V_H gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002; 16: 993-1007.
- Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated V_H, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 2007; 92: 1242-5.
- Strati P, Shanafelt TD. Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. *Blood* 2015; 126: 454-62.
- Sutton LA, Ljungström V, Mansouri L, et al. Targeted next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: a high-throughput yet tailored approach will facilitate implementation in a clinical setting. *Haematologica*. 2015; 100: 370-6.
- Tarafdar A, Michie AM. Protein kinase C in cellular transformation: a valid target for therapy? *Biochem Soc Trans* 2014; 42: 1556-62.
- te Raa GD, van Oers MH, Kater AP. HOVON CLL working party. Monoclonal B-cell lymphocytosis: recommendations from the Dutch Working Group on CLL for daily practice. *Neth J Med* 2012; 70: 236-41.
- ten Hacken E, Burger JA. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2015 doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.07.009.
- Terrin L, Dolcetti R, Corradini I, et al. hTERT inhibits the Epstein-Barr virus lytic cycle and promotes the proliferation of primary B lymphocytes: implications for EBV-driven lymphomagenesis. *Int J Cancer* 2007; 121: 576-87.
- Theimer CA, Feigon J. Structure and function of telomerase RNA. *Curr Opin Struct Biol* 2006; 16:307-18.
- Thornton B, Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ*. 2011;39:145-54.
- Thornton PD, Fernandez C, Giustolisi GM, et al. CD38 expression as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J* 2004; 5: 145-51.
- Thorsélius M, Kröber 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: 2889-94.
- Tjønnfjord GE, Jønsson V, Ly BE, Johannesen TB. Familial occurrence of chronic lymphocytic leukaemia in Norway. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2012; 132: 2060-3.

- Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, et al. Subsets with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; 104: 2879-85.
- Travella A1, Ripollés L, Aventin A, et al. Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Cytogenetic and FISH analysis. *Hematol Oncol* 2013; 31: 79-87.
- Tschumper RC1, Geyer SM, Campbell ME, et al. Immunoglobulin diversity gene usage predicts unfavorable outcome in a subset of chronic lymphocytic leukemia patients. *J Clin Invest*. 2008;118:306-15.
- 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: 1030-7.
- Ueda Y1, Calado RT, Norberg A, et al. A mutation in the H/ACA box of telomerase RNA component gene (TERC) in a young patient with myelodysplastic syndrome. *BMC Med Genet*. 2014,19;15:68.
- Vaisitti T, Aydin S, Rossi D, et al. CD38 increases CXCL12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2010; 24: 958-69.
- Van Den Neste E, Robin V, Francart J, et al. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia* 2007; 21: 1715-22.
- van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann 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: 2257-317.
- van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 1997; 385:740-3.
- Van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998; 92: 401-13.
- Veinteicher AS, Meng Z, Mason PJ, Veenstra TD and Artandi SE: Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme activity. *Cell* 2008,132: 945-957.
- Verdun R and Karlseder J. Review Article Replication and protection of telomeres. *Nature* 2007, 447, 924-931
- Viswanatha D, Dyer Montgomery, K, Foucar K. Mature B-Cell Neoplasms: Chronic Lymphocytic Leukemia-Small Lymphocytic Lymphoma, B-Cell Prolymphocytic Leukemia and Lymphoplasmacytic lymphoma. Part III, section 1, Mature B-Cell

- Neoplasm 14. in Hematopathology, Jaffe E, Harris N, Vardiman J, Campo E, Arber D. 2011, pp. 221-246.
- von Stedingk K, Koster J, Piqueras M, et al. snoRNPs regulate telomerase activity in neuroblastoma and are associated with poor prognosis. *Transl Oncol* 2013; 6: 447-57.
- Vulliamy TJ, Marrone A, Knight SW, et al. Mutations in dyskeratosis congenita: their impact on telomere length and the diversity of clinical presentation. *Blood*. 2006; 107:2680–2685.
- Vulliamy T, Beswick R, Kirwan M, Marrone A, Digweed M, Walne A, Dokal I. Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008.105:8073–8078
- Walsh KM, Wiencke JK1, Lachance DH1, et al. Telomere maintenance and the etiology of adult glioma. *Neuro Oncol*. 2015;17:1445-52.
- Walsh SH, Rosenquist R. Immunoglobulin gene analysis of mature B-cell malignancies: reconsideration of cellular origin and potential antigen involvement in pathogenesis. *Med Oncol* 2005; 22: 327-41.
- Wang Y-H, Fan L, Wang L, et al. Expression levels of Lyn, Syk, PLC γ 2 and ERK in patients with chronic lymphocytic leukemia, and higher levels of Lyn are associated with a shorter treatment-free survival. *Leuk Lymph* 2013; 54: 1165-70.
- Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 267-85.
- Weinberg JB, Volkheimer AD, Chen Y, et al. Clinical and molecular predictors of disease severity and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2007; 82: 1063-70.
- Weller S, Reynaud CA, Weill JC. Splenic marginal zone B cells in humans: where do they mutate their Ig receptor? *Eur J Immunol* 2005; 35: 2789-92.
- Weng NP1, Granger L, Hodes RJ. Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 30;94:10827-32.
- Widhopf GF, Rassenti LZ, Toy TL, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood* 2004; 104: 2499-504.
- Wild J, Schmiedel BJ, Maurer A, et al. Neutralization of (NK-cell-derived) B-cell activating factor by Belimumab restores sensitivity of chronic lymphoid leukemia cells to direct and Rituximab-induced NK lysis. *Leukemia* 2015 [Epub ahead of print]

- Williams GT, Farzaneh F: Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer? *Nat Rev Cancer* 2012, 12:84–88
- Wilson WR, Herbert KE, Mistry Y, et al. Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J* 2008; 29: 2689-94.
- Wong JM, Collins K. Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita. *Genes Dev.* 2006;20: 2848-2858
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, et al. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 1996; 18:173–179.
- Wu KD, Orme LM, Shaughnessy J Jr, Jacobson J, Barlogie B, Moore MA. Telomerase and telomere length in multiple myeloma: correlations with disease heterogeneity, cytogenetic status, and overall survival. *Blood* 2003; 101:4982-9.
- Wyatt HD, West SC, Beattie TL. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:5609-22.
- Ye JZ, Hockemeyer D, Krutchinsky AN, Loayza D, Hooper SM, Chait BT, de Lange T. POT1-interacting protein PIP1: A telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* 2004; 18:1649-54.
- Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, et al. Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* 2006; 312: 902-6.
- Ysebaert L, Fournie JJ. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2011; 52: 1404-6.
- Yuille MR, Matutes E, Marossy A, et al. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol* 2000; 109: 794-9.
- Zenz T, Martens D, Kuppers R, et al. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 37-50.
- Zhang S, Kipps TJ. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Ann Rev Pathol* 2014; 9:103-18.
- Zhang X, Li B, de Jonge N, et al. The DNA methylation inhibitor induces telomere dysfunction and apoptosis of leukemia cells that is attenuated by telomerase over-expression. *Oncotarget.* 2015;6:4888-900.
- Zhao Y, Sfeir AJ, Zou Y, et al. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell.* 2009;138:463-75.
- Zhong F, Savage SA, Shkreli M, et al. Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. *Genes Dev* 2011;25: 11-16.

Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry* 2010; 75: 1563-83.