

Tesis de Posgrado

Estudio de la leucemia linfoblástica aguda: Interferón, genes supresores de tumor y el receptor T

Sternik, Gabriel

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sternik, Gabriel. (1998). Estudio de la leucemia linfoblástica aguda: Interferón, genes supresores de tumor y el receptor T. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3099_Sternik.pdf

Cita tipo Chicago:

Sternik, Gabriel. "Estudio de la leucemia linfoblástica aguda: Interferón, genes supresores de tumor y el receptor T". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3099_Sternik.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

**Estudio de la Leucemia Linfoblástica Aguda:
Interferón, genes supresores de tumor y el receptor T.**

**Autor: Gabriel Sternik
Directora: Dra. Luisa Sen**

**Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan"
IIHEMA, Academia Nacional de Medicina**

Nº 3 099
3099

1998

AGRADECIMIENTOS

Una de las tareas más difíciles es la de agradecer el desarrollo de una tesis, la que no por ser ardua deja de ser agradable. Si bien en un principio el propósito de una tesis es meramente educativo, a lo largo de su desarrollo se van confundiendo las realidades y las ficciones, y esa mezcla de vivencias e influencias lleva a que al final de este proceso uno sea la sumatoria de todo ello.

Empezaré por aquellos que forman parte de un pasado que ya no está. Mis abuelos maternos quienes desde la farmacia de Villa Luro encendieron la llama de la ciencia en mi niñez. Mis abuelos paternos a través de quienes tomé conciencia de quienes somos y de dónde venimos. Rinti, primer tetrápodo que me acompañó en mi infancia y gracias a quien he aprendido querer a los animales. Continuando con los canes, los últimos quince años merecen un capítulo aparte para Natalie, quien compartió una época inolvidable y junto a ella sus hijas Punky y Mariel, que me acompañaron desde el inicio de mi facultad y se fueron una vez concluida esta última etapa doctoral.

Proseguiré con aquellos que forman parte de mi familia: debo agradecer a mis padres, quienes siempre han estado a mi lado, a mis hermanas, a mis tíos y tías y a mis primas. Y a Felisa, un miembro más de la familia.

No puedo dejar de mencionar a mis amigos de la infancia, por los años de correrías en Villa del Parque y alrededores, Robertito que aún nos está mirando, Pablito, Marcelo, Norbe y Guille, Carlos, Diego y Esteban. De esa misma época debo agradecer especialmente a Julio, quién más de una vez participó en la elaboración de las distintas versiones de cosas que no entendía. De la infancia más remota rescato a mi amigo del alma, Diego, quién desde la distancia y los reencuentros hizo fuerza para que finalmente siguiera en lo mío.

De mis épocas de estudiante rescato a mis amigos Gustavo, Alejandro, Javier, Martín, Pablo, Santi, María José, Sole y Dany, que han compartido jornadas enteras dedicadas desde lo más básico hasta lo más impensado. Por otro lado se suman Ali, Gaby, Fer, Gabriel y Fernando quienes también a su manera han sido partícipes de las mismas cosas.

Además de acompañarme en más de una travesía por lugares inhóspitos he de agradecer a Alfonso, por su impresionante colaboración; a mi "socio" y "colega" Fernando por su amor a la ciencia y a Dany, con quien conservo una de las amistades más profundas desde el inicio de nuestros estudios.

Por el camino de la vida he recogido otras amistades que merecen ser mencionadas: Ale, Esteban, Juan, Nora, Ale y Fabiana, gracias por los revival; y a Pablo por su desinteresada colaboración en el diseño de la carátula, la cual por supuesto, he modificado. Otra amistad que ha caído presa de mis presentaciones es la de Patricia Sanguinetti y su ductilidad en las preparación de las mismas (y del flan de claras).

A Sandra Demichelis, quien no sólo me ayudó en el diseño, sino que dedicó hasta último momento su esfuerzo y tiempo para la presentación de este trabajo. Quiero agradecer a su Amada tía y a sus padres, quienes siempre me recibieron como a un hijo.

Con el tiempo nuestra "amistad" creció y sigue creciendo: gracias Vero por contagiarme constantemente tu empuje, entusiasmo y ganas de superación personal y profesional.

A todos aquellos que seguramente olvidaré por estar tan cerca.

Uno también es parte de las influencias profesionales, las que más de una vez confluyen con las personales. ¿Qué sería de una tesis sin una orientación? Aquí la Dra Luisa Sen es la acreedora de los laureles, por brindarme la oportunidad de aprender a trabajar con dedicación y crecer profesional y personalmente bajo su dirección.

De los lugares donde realicé la tesis es casi imposible agradecer individualmente sin olvidar a alguien, por lo que generalizo mis agradecimientos. A todos los integrantes del laboratorio de Biología Celular y Retrovirus el Hospital de Pediatría, Gabriela, Federico y Andrea por su compañerismo y afecto recibido durante los años que hemos compartido. A Carmen Galvez por su asistencia técnica.

A todos mis compañeros del Hospital de Pediatría "Juan P Garrahan", por los buenos momentos compartidos durante mi estancia.

A todos mis compañeros de la Academia Nacional de Medicina, por el afecto recibido durante el tiempo compartido. Especialmente a todos aquellos que me aconsejaron y empujaron en la finalización de la tesis, por sus críticas lecturas y opiniones que facilitaron concluir con la misma.

Al CONICET por haberme otorgado las becas que me permitieron empezar el presente trabajo de tesis y por financiar económicamente parte del proyecto

A la Academia Nacional de Medicina, lugar donde se inició este trabajo y al Hospital de Pediatría "Juan P Garrahan", lugar donde se culminó este trabajo

ÍNDICE

	<i>página</i>
AGRADECIMIENTOS	i
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
1. <u>LEUCEMIA AGUDA</u>	7
Epidemiología de la leucemia	9
Leucemia Linfoblástica Aguda	12
Alteraciones citogenéticas más frecuentes en LLA	13
Leucemia Aguda bifenotípica	14
Desarrollo de las células linfoides	15
Generación de diversidad inmunológica	16
Leucemia Linfoblástica Aguda	16
Leucemia Mieloblástica Aguda	17
Marcadores citoplasmáticos	17
Marcadores celulares	18
Clasificación de las LLA infantiles	20
2. <u>ELEMENTOS GENÉTICOS QUE CONTROLAN EL CÁNCER:</u>	
<u>Genes Supresores de Tumor</u>	21
3. <u>EL SISTEMA INTERFERÓN</u>	23
Reseña histórica	23
Características generales	24
Evolución de los genes de interferón	26
Familia de los interferones de tipo I	28
Interferón α	30
Interferón β	31
Interferones de tipo II	32
Interferón γ	32

4. <i>p16</i>	34
Regulación del ciclo celular	34
Descubrimiento del gen <i>p16</i> (<i>CDKN2</i>)	34
El gen <i>p16</i> (<i>CDKN2</i>) en tumorigénesis	37
El gen <i>p16</i> (<i>CDKN2</i>) en la progresión del tumor	38
Mecanismos de la inactivación del gen <i>CDKN2</i>	39
Alteraciones del gen <i>p16</i> (<i>CDKN2</i>) en neoplasias hematológicas	39
5. <u>IMMUNOGLOBULINAS</u>	42
Clonalidad B o T	43
6. <u>EL RECEPTOR T</u>	45
Cadena gamma del Receptor T	45
Hipótesis de trabajo	50
Plan de Trabajo	51
CAPÍTULO 1	
A. Producción de Interferón	53
Introducción	53
Objetivos	53
Plan de trabajo	53
Materiales y Métodos	54
Pacientes y toma de muestras	54
Controles Normales	54
Obtención de células mononucleares	54
Estudios de poblaciones celulares	55
Antígenos evaluados más frecuentes en las LLA	55
Antígenos no clasificados por el Comité de Nomenclatura de Antígenos Leucocitarios (no en "clusters")	55
Valores normales	55
Inducción de la producción de interferón α	56
Medición de la concentración de IFN- α	56
Análisis estadístico	57

Estudio de la producción de interferón en CMT de pacientes con LLA	57
Estudio de la correlación entre las distintas variables independientes: edad, sexo, estimulación	57
Análisis de la función discriminante	58
Resultados	59
Producción de IFN- α por blastos de LLA	59
Posibles causas de la dispersión en LLA:	64
Producción en LMA:	64
Análisis de la función discriminante	67
Discusión	74
Conclusiones de la Sección A	74
B. Deleciones de los genes de Interferón y p16	76
Introducción	76
Objetivos	76
Plan de trabajo	77
Materiales y Métodos	78
Extracción de ADN	78
Digestión enzimática para Southern blot	79
Preparación de las muestras digeridas	79
Geles de agarosa	79
Minigeles	80
Geles convencionales	80
Transferencia del material en el gel a una membrana de nylon:	81
Preparación de las sondas radioactivas	81
Hibridización de las membranas	82
Autorradiografía	83
Transformación y preparación de bacterias competentes	83
Preparación de minipreps	84
Primers y probes de DNA	84
Resultados	85
Análisis de los genes de Interferón de tipo I	85
Interferón α	85
Interferón β	88

Análisis del gen <i>p16</i>	88
Análisis del gen <i>p16</i> y de los interferones de tipo I	91
Producción de IFN- α y deleciones del sistema IFN	96
Discusión	99
Conclusiones de la Sección B	101
C. Conclusiones del capítulo 1	102
CAPÍTULO 2	
A. Estudio de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas	103
Introducción	103
Objetivos	103
Plan de trabajo	103
Materiales y Métodos	105
Amplificación del ADN por reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para IgH:	105
Primers de DNA	105
Resultados	107
PCR para IgH	107
Discusión	110
Conclusiones de la Sección A	111
B. Estudio de los reordenamientos del Receptor T cadena γ	112
Introducción	112
Objetivo	112
Plan de trabajo	112
Materiales y Métodos	113
Primers y Sondas de DNA	113
Primers de oligonucleótidos para TCRG	113
Amplificación del ADN por reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para TCRG.	113

Desarrollo del método de PCR para TCRG	115
PCR Multiplex para TCRG	115
Geles de poliacrilamida	116
Coloración con nitrato de plata	116
Resultados	117
Detección de reordenamientos en el receptor T	117
Southern blot	117
PCR: Desarrollo del método de PCR	117
Reordenamientos del locus TCRG en LLA	120
Análisis de los reordenamientos de la cadena variable	120
Identificación de los reordenamientos del receptor T	122
Discusión	128
Conclusiones de la Sección B	128
C. Conclusiones del capítulo 2	130
DISCUSIÓN GENERAL	132
CONCLUSIONES GENERALES	138
BIBLIOGRAFIA	140

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
CAK	Kinasa activante de CDKs
CALLA	Antígeno común de las LLA
CD	Cluster de diferenciación
CDK	Kinasas dependientes de ciclinas
CDKI	Inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas
CDR3	Región determinante de complementaridad 3
CFU-L	Progenitor linfoide
CFU-S	Progenitor mieloide
CMT	Células mononucleares totales
CSF-1	Factor estimulante de colonias
CV	Coefficiente de variación
DCC	Deleted in colon carcinomas
DMSO	Dimetil sulfóxido
EBV	Virus de Epstein Barr
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGF	Epidermal grow factor
EH	Enfermedad de Hodgkin
ELISA	Inmunoensayo enzimático
EMR	Enfermedad mínima residual
ESM	Desvío standard muestral
FAB	French-American-British

FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FQ	Fibrosis quística
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
IFA	Interferón α
IFF	Interferón fibroblástico
IFI	Interferón inmune
IFL	Interferón leucocitario
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulinas
IgH	Cadena pesada de las inmunoglobulinas
IL	Interleukina
ILP	Interferón like protein
IRF	Interferón Regulatory Factor
IRF-1	Interferon Regulatory Factor 1
IRF-2	Interferon Regulatory Factor 2
ISGF-3	Interferon Stimulated Gene Factor 3
ISRE	Interferon Stimulated Response Element
LANL	Leucemia aguda no linfoide
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LNH	Linfoma no Hodgkin
LTA	Leucemia adulta T
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad

MIC	Inmunología y citogenética
MM	Mieloma múltiple
MTAP	Mmetil tioadenosina fosforilasa
MTS1	Multiple tumor suppressor 1
MTS2	Multiple tumor suppressor 2
NK	Natural Killer
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento plaquetario
PK	Proteinasa K
PM	Peso molecular
Rb	Retinoblastoma
RPM	Revoluciones por minuto
SBF	Suero fetal bovino
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SMD	Síndrome mielodisplásico
TAE	Tris-acetato-EDTA
TCR	Receptor T (T cell receptor)
TCRD	Receptor T delta
TCRG	Receptor T gamma
TdT	Deoxinucleotidil transferasa terminal
TE	Tris-EDTA
TGF	Factor transformante de crecimiento tumoral
TNF	Factor de necrosis tumoral

RESUMEN

En líneas celulares de origen leucémico se han encontrado deleciones en el brazo corto del cromosoma 9, donde se localizan los genes del interferón de tipo I, lo que en un principio hizo suponer que el interferón se comportaba como un gen supresor de tumor. Se propuso ver si la producción de interferón estaba alterada en las leucemias linfoblásticas agudas (LLA), y si esas alteraciones génicas estarían relacionadas con la capacidad de producción de interferón α por las células malignas al ser inducidas con virus Sendai. Se determinó la capacidad de las células leucémicas de 21 pacientes de LLA, de la línea celular establecida K 562 y de dadores normales de producir interferón α "in vitro" al ser inducidos con virus Sendai con un *priming* de interferón α . La producción de interferón α por los blastos leucémicos y células normales fue muy variable oscilando entre 633 a 8850 pg/ml/5x10⁶ células, no siendo estadísticamente significativo, tampoco se hallaron diferencias entre los subgrupos de LLA. En 4 de los 7 casos estudiados por Southern blot se pudo estudiar la producción de interferón α , presentando uno de ellos deleción de genes de interferón α . De las 21 leucemias en dos casos produjeron una cantidad de interferón α mínima. Esto sugiere que la malignidad en las LLA con baja producción de interferón α podría deberse a la pérdida de algún gen supresor de tumor.

Se investigó la frecuencia y asociación de alteraciones del *p16*, el interferón α y el interferón β en un total de 39 casos de LLA. De ellos, diez pacientes (25,6 %) presentaron anomalías de al menos uno de los tres genes estudiados. Se encontró en un porcentaje del 13% deleciones en los genes del interferón α y β , así como también en los recientemente identificados genes supresores de tumor *p15* y *p16* (23%) los cuales se encuentran próximos a los genes del interferón. Estos datos indican que en las LLA, representando un cuarto de las LLA totales estudiadas el gen *p16* está delecionado con mayor frecuencia que los genes de los interferones de tipo I. Además de *p16*, el 37,5% está asociado con deleciones del interferón, sugiriendo una asociación entre ambas. Estos datos sugieren que la ausencia de *p16*, inhibidor de las ciclinas, podría modificar el ciclo celular normal y favorecer la transformación blástica. Su asociación con la deleción de los genes de los interferones de tipo I podría constituir eventos de la leucemogénesis. El porcentaje de deleciones, a su vez dependió del fenotipo de la célula leucémica, siendo mayor

en los casos de LLA T que en aquellas precursoras B.

Para un mejor tratamiento de la enfermedad es necesario partir de un buen diagnóstico, para lo cual se buscó detectar clonalidad, de tipo B o T por medio de la identificación de fragmentos reordenados, ya sea de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (clonalidad B) o de la cadena γ y del receptor de los linfocitos T (clonalidad T). A su vez por medio de un mapeo de restricción se llegó a una correcta identificación del subtipo de reordenamiento V γ I en las LLA T. Esto cobra importancia, sobre todo para el seguimiento posterior de la enfermedad mínima residual, sin embargo no es suficiente para la determinación del linaje celular.

Palabras clave:

Interferón; leucemia linfoblástica aguda; Receptor T; genes supresores de tumor; cadena pesada de inmunoglobulinas; p16; ciclinas dependientes de kinasas, cromosoma 9, deleciones

ABSTRACT

Type I Interferon genes are located in the short arm of chromosome 9, where deletions have been found in cell lines originated from leukemia patients. This arised the idea of interferon acting as a tumor suppressor gene in acute lymphoblastic leukemia (ALL). Interferon production was measured in ALL and compared to normal healthy donors. No significative differences were found between groups. By Southern blot analysis α and β interferon gene deletions were found in 13% of ALL patients. The putative tumor-suppressor gene p16 was mapped to human chromosome 9p21, close to the interferon α cluster. The frequency and association of gene alterations of *p16*, interferon α and interferon β were investigated in a total of 39 Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) patients. Of them, ten patients (25.6%) presented abnormalities of at least one of the three genes studied. We also found *p15* and *p16* gene deletions in a higher frequency (23%). These findings supports the idea that the role of the interferon as tumor suppressor gene is more related to its location than its function.

To have a more accurate diagnosis of acute leukemias, we investigated B and T cell clonality by identifying PCR segments of rearranged immunoglobulin heavy chain genes and γ T cell receptor (TCR) genes, respectively. In order to identify the rearranged V γ I TCR gene to further detect minimal residual disease a restriction analysis was performed. Although we can detect clonality by PCR amplification of IgH and/or γ TCR gene rearrangement, in ALL, it can not be use for cell lineage identification.

Key words:

interferon; acute lymphoblastic leukemia; T cell receptor; heavy chain immunoglobulin gene; p16; cyclin dependent kinases; tumor suppressor genes

•
•

introducción general

•
•
•

tro

duc

ción

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. LEUCEMIA AGUDA

La leucemia es una alteración clonal de los tejidos formadores de la sangre, en especial la médula ósea, los nódulos linfáticos y el bazo; (en esta patología) los blastos invaden el sistema linfático y la médula ósea provocando falla medular. Estas células inmaduras no pueden llevar a cabo su función normal que es la de combatir las infecciones; además por compresión reducen la producción de glóbulos rojos normales (provocando anemia) y las plaquetas (que regulan la coagulación y la hemostasia).

A medida que la leucemia progresa, la función de la médula ósea se descontrola y, si la enfermedad no se detiene, las células anormales empiezan a ser dominantes, y son transportadas hacia el resto del organismo. Sin tratamiento se pueden observar infecciones, debido a la reducción de las células normales encargadas de combatir las mismas; anemia severa, debido a la carencia de glóbulos rojos que transportan oxígeno; y hematomas o hemorragias, debido a la falta de plaquetas.

Aunque las leucemias agudas son enfermedades poco frecuentes en la población general, representan colectivamente el 35% de las neoplasias infantiles; desde 1960 el pronóstico para niños con leucemias agudas ha evolucionado favorablemente; ciertas formas clínicas que antes eran fatales, actualmente son tratables prolongando la sobrevida libre de enfermedad. Hace unos treinta años no se disponía de un tratamiento efectivo para los pacientes con leucemia; actualmente el 78% de los niños que padecen la forma más común de la leucemia pediátrica, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) sobrevive más de 5 años después del diagnóstico. Si bien se considera a la leucemia una enfermedad infantil, esta también afecta a los adultos y la mitad de los casos de leucemia ocurre en mayores de 60 años. Sin embargo las leucemias agudas son mayoritariamente infantiles.

Aún hoy la etiopatogenia no se ha podido clarificar, pero se supone que varios agentes estarían

involucrados en la génesis de la misma.

Las leucemias se clasifican en agudas, crónicas y congénitas. Los términos "aguda" y "crónica" se referían originariamente a la duración relativa del curso natural de los tipos diferentes de leucemia previos al advenimiento de los distintos tratamientos. La leucemia crónica es más frecuente en adultos y progresa de manera más lenta, durante muchos años. Las "leucemias congénitas" describen aquellas enfermedades diagnosticadas durante las cuatro primeras semanas de vida. "Preleucemia" se refiere a condiciones iniciales caracterizadas por anemia, neutropenia y/o trombocitopenia con maduración de elementos hematopoyéticos que podrían evolucionar a una leucemia aguda.

Las leucemias también se clasifican morfológicamente de acuerdo a las líneas celulares involucradas. La clasificación divide a las leucemias agudas en linfoblásticas (LLA), que involucran a células del linaje linfoide B y T y mieloblásticas (LMA), que involucran a células del linaje mieloide. Hay formas raras de leucemia que afectan a otros tipos de células sanguíneas. por ejemplo la leucemia monocítica afecta a los monocitos y la eritroleucemia a los eritrocitos. Aproximadamente un 80% de las leucemias agudas en niños son linfoblásticas (LLA), 15% mieloides (LMA) y un 5% permanece difícil de caracterizar (indiferenciada).

La característica morfológica de los blastos es ser una célula relativamente indiferenciada con cromatina nuclear distribuída difusamente, uno o más nucleolos y citoplasma basófilo. Existen varios métodos de caracterizar a las células blásticas, incluyendo estudios de morfología, citoquímica, marcadores de superficie o citoplásmicos, cromosomas o rearrreglos de los genes de las inmunoglobulinas.

En la década de los '80 el workshop de la French-American-British (Franco-Americana-Británica) (FAB) estandarizó la clasificación morfológica y citoquímica de las leucemias agudas dividiéndolas en: LLA, incluye tres tipos (L1, L2 y L3) y LMA con 8 subgrupos (M0 a M7).

L1 es el tipo de LLA más común en niños. Los linfoblastos están caracterizados por una relación núcleo:citoplasma alta; su citoplasma está delimitado a un delgado perímetro celular. Los linfoblastos en la L2 son más grandes, a menudo conforman una población heterogénea, con una relación núcleo:citoplasma más baja (el citoplasma ocupa el 20% o más de la superficie de la

célula), nucleolo prominente y membrana nuclear irregular. El subtipo L3 se caracteriza por presentar células heterogéneas indistinguibles del linfoma de Burkitt; estos linfoblastos tienen un citoplasma basófilo, vacuolización citoplasmática, inmunoglobulinas en la superficie celular y se asocia con la translocación 8:14.

La clasificación de la leucemia aguda fue revisada en la última década. La necesidad de reproducibilidad en la clasificación de las leucemias agudas hizo necesaria la incorporación de técnicas que se hicieron indispensables para el estudio de estas enfermedades.

Además de la clasificación morfológica y citoquímica clásica (FAB), fue necesario agregar la propuesta por la Inmunología y la Citogenética (MIC). Como resultado de ello se incorporaron nuevos grupos de leucemias:

3 tipos de LLA con anomalías cromosómicas:

- i) t(9;22)
- ii) t(4;11)
- iii) t(1;19)

y 4 subtipos de LMA:

- i) con diferenciación mínima, o LMA-M0
- ii) con precursores basófilos, o M2 Baso
- iii) LMA (M4/M5) con t(8;16)
- iv) LMA con mielodisplasia

El concepto de promiscuidad entre linajes [1] o infidelidad [2] se introdujo a partir de los análisis del receptor T, las inmunoglobulinas y los estudios con anticuerpos monoclonales; de esta manera se reconoció una nueva categoría llamada bifenotípica [3] o de linaje mixto [4] caracterizada por el compromiso de más de un linaje.

Epidemiología de la leucemia

En los estudios epidemiológicos del cáncer se analizan las variables demográficas -características de la persona, lugar y tiempo- para identificar subgrupos poblacionales y el riesgo de malignidad

ya sea alto o bajo. Las variables más estudiadas son la edad, el sexo y la raza; otras de interés en epidemiología pediátrica incluyen el lugar de nacimiento, orden de nacimiento, la ocupación de los padres y su edad en el momento de la concepción, religión, etnia y nivel socioeconómico.

La frecuencia de leucemia en pacientes menores de 15 años de edad aumenta rápidamente después del nacimiento, llega a un pico antes de los 5 años de edad y declina posteriormente [5]. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la variedad de leucemia más frecuente en la niñez, que surgió en la década de 1920 en Inglaterra, alrededor de 1940 en EE.UU. y en la década de 1960, en Japón [6]. A diferencia de las LLA las leucemias agudas no linfoides (LANL) no muestran una edad determinada. La proporción LLA/LANL en niños hasta 15 años es de 4:1, aproximadamente la inversa que en adultos [7]. El tipo de LANL más frecuente es la leucemia mieloblástica aguda (LMA), seguida de mielomonocítica, promielocítica, monocítica y eritrocítica [7]. En cambio, la leucemia mieloide crónica (LMC) es menor al 5% entre las leucemias infantiles. La leucemia linfocítica crónica (LLC) ocurre raras veces en niños. También se observaron variaciones geográficas en las tasas de incidencia y en la distribución en cada subtipo. Aquellas personas con aberraciones cromosómicas constitutivas o adquiridas tienen un riesgo mayor de adquirir leucemia aguda [8].

Aproximadamente un tercio de los casos de neoplasias malignas infantiles corresponden a LLA; la incidencia de la LLA aumentó en los últimos 50 años, en parte debido a la certeza del diagnóstico y al estudio en profundidad de cada caso. En niños blancos (menores de 15 años de edad) la incidencia anual es de 29,4 casos por millón de habitantes, contra 13,7 en niños de color [9]; se postuló que las condiciones socioeconómicas e higiénicas que alteran los patrones de infección en la infancia aumentan el riesgo de LLA B CD10⁺ [10]. En los negros americanos y árabes las LLA B y T son las formas más frecuentes [6,10], mientras que en los turcos la LMA es más frecuente que la LLA [11]. Hasta la fecha no hay explicación para analizar estas diferencias. La incidencia de LLA en adultos (mayores de 15 años) es de 7 casos por millón de habitantes [12].

Según el inmunofenotipo, la LLA T afecta con más frecuencia a los escolares mayores [13], adolescentes y adultos, mientras que la preB generalmente afecta a niños menores de 7 años. En los adultos la incidencia de LLA decrece con la edad [12]; la LLA afecta más a los varones que

a las mujeres, excepto en los más pequeños.

La LLA está fuertemente asociada a ciertos desórdenes congénitos; los hijos de pacientes con leucemia tienen 4 veces más posibilidades de contraer leucemia que aquellos miembros de la población en general. Aproximadamente un quinto de los gemelos univitelinos de niños con LLA desarrollan la enfermedad dentro de los primeros 6 años de vida, generalmente a los pocos meses del diagnóstico primitivo de la enfermedad [8]. Además de los desórdenes génicos, la exposición a las radiaciones ionizantes aumentaría el riesgo de contraer la enfermedad.

Algunas infecciones también han sido ligadas a la patogénesis de la LLA. Por ejemplo, la malaria y la infección precoz por el virus de Epstein-Barr (EBV) podrían aumentar el riesgo de malignidades de tipo B [14]. La depresión inmunológica inducida por la malaria podría disminuir los mecanismos inmunes, mientras que el EBV podría transformar a las células B, (la infección por EBV genera líneas celulares linfoblastoides). Una de las consecuencias de esta infección sería el aumento de la viabilidad de las células B en condiciones desfavorables. Se ha demostrado que la proteína 1 del EBV regula positivamente la expresión del protooncogen *BCL-2*, protegiendo así a la célula de la apoptosis [15]. Entre otras infecciones ligadas a la leucemia se conoce que el retrovirus HTLV-1 tiene un rol causal en la leucemia T del adulto [16].

La leucemogénesis es probablemente un complejo de varias etapas; se ha confirmado que las translocaciones cromosómicas que yuxtaponen genes de los receptores T o de las inmunoglobulinas podrían ser importantes para controlar el desarrollo celular y la diferenciación [16]. Otras translocaciones crean proteínas de fusión que aumentan la actividad tirosina-quinasa o tienen la posibilidad de alterar la transcripción [16].

En adultos, la incidencia de LLA es menor que en niños [12]. Se ha postulado [10] que la incidencia elevada en niños reflejaría una proporción más elevada de células progenitoras linfoides en proliferación, que serían un blanco más amplio para los errores génicos. De hecho, los cambios en los receptores T y en las inmunoglobulinas son propensos a errores.

Por último, la transmisión vertical de la LLA no es muy común. De un estudio de 119 mujeres embarazadas con LLA los recién nacidos no estaban afectados [17].

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Es esencial utilizar una batería de anticuerpos monoclonales y análisis cromosómico para realizar un buen diagnóstico en LLA, salvo la LLA-L3 (Burkitt) con t(8;14) [18].

Los tipos conocidos de LLA son: LLA de linaje B y LLA de linaje T, dependiendo del marcador de membrana expresado.

Las LLA de linaje B se dividen en:

- LLA B temprana o nula (early B)
- LLA común
- LLA pre B (con cadena μ citoplasmática) y
- LLA B madura (Ig superficie)

Las LLA de linaje T se dividen en:

- LLA T pretímica
- LLA T tímica cortical y medular
- LLA T posttímica

De manera similar estas LLA se pueden subdividir en diferentes grupos teniendo en cuenta el cariotipo: hay publicaciones recientes que demuestran que el cariotipo hiperdiploide (mayor de 50 cromosomas) que se ven exclusivamente en el linaje B, más específicamente en LLA común, se asocia a un pronóstico favorable [19].

El mejor pronóstico es para los pacientes entre 3 y 7 años de edad con recuento de glóbulos blancos menor de 10.000 células/mm³ y cuyas células leucémicas expresan marcadores de membrana no-T no-B [20]. Los cromosomas en metafase de los pacientes con LLA presentan una morfología con bandas indistintas, haciendo su análisis dificultoso. Por esta razón es que hay menos estudios de los patrones cromosómicos en LLA que en Leucemia Aguda no Linfoide (LANL). Sin embargo, recientemente se produjeron grandes avances y ahora es posible correlacionar el cariotipo con otros factores pronósticos reconocidos.

Algunos laboratorios han publicado los resultados cariotípicos de sus pacientes y encontraron que de un 50% a un 70% de los pacientes presentaban un cariotipo anormal [21,22].

Alteraciones citogenéticas más frecuentes en LLA

La translocación 8;14: Una translocación recíproca que involucra al brazo largo del cromosoma 8 y 14 se ha detectado en una alta proporción de los linfomas de Burkitt; en LLA con marcadores de tipo B y en pacientes con células leucémicas de tipo L3 se observó una translocación aparentemente idéntica [t(8;14)(q24;q32)], indicando que el linfoma de Burkitt y la mayoría de las LLA B del tipo L3 son probablemente diferentes manifestaciones de la misma enfermedad. Aproximadamente, el 15% de los pacientes con LLA-B o Linfoma de Burkitt tienen una de las dos variantes: cada una involucra al cromosoma 8, con roturas en 8q24 y una de las bandas de la cadena liviana de las inmunoglobulinas, ya sea lambda en 2p12-13 o kappa en 22q11 [23].

La translocación 4;11: Es una translocación que involucra los brazos largos de los cromosomas 4 y 11 [t(4;11)(q21;q23)] observada en un pequeño porcentaje de pacientes con LLA, especialmente con leucemia congénita [23-26]. Los niños con la t(4;11) presentan un recuento leucocitario elevado, el que indica un mal pronóstico.

El cromosoma Philadelphia (Ph[']): El cromosoma Ph['], resultante de una translocación recíproca entre los cromosomas 22 y el 9, se observa en pacientes con LLA y con LMC. El cromosoma Ph['] es el reordenamiento más frecuente en LLA adulta. La supervivencia media de los niños Ph[']+ es de 14 meses; es así que identificando esta anomalía cromosómica se pueden detectar a los individuos no-T no-B con mal pronóstico.

La translocación 1;19: Esta anomalía es de ocurrencia frecuente entre los niños con células leucémicas de fenotipo pre-B [19,27,28]. Los pacientes con t(1;19) son de mayor edad (edad media: 11 años) que aquellos con fenotipo pre-B sin cariotipo t(1;19) (6 años) [26]; además el recuento de glóbulos blancos es de 12.000 en el primer grupo, mientras que llegan a 88.000 en el último grupo.

Reordenamientos estructurales en LLA-T: La LLA-T es la forma menos común de LLA en la que ha sido más difícil identificar las anomalías cromosómicas específicas. Algunos autores [29,30] han identificado roturas en el cromosoma 14q11, donde se ha localizado la cadena α del receptor T. Aparentemente este gen actúa de manera similar al de la cadena pesada de las inmunoglobulinas del locus Ig en las células B.

Deleciones del cromosoma 9p: Se han relacionado las deleciones del brazo corto del cromosoma 9 (9p-) con una forma rara de LLA asociada a marcadores T con un alto recuento leucocitario y una corta sobrevida [31,32].

LLA casi-haploide: La ocurrencia de LLA con células leucémicas con un número de cromosomas casi haploide es rara [33]. El número de cromosomas oscila entre 26 a 36 (mediana, 28). Podría ser un subgrupo único dentro de las LLA con un pronóstico más grave que los otros tipos de LLA no-T no-B.

Hiperdiploidía con 50 a 60 cromosomas: Las células leucémicas de algunos pacientes con LLA se caracterizan por la ganancia de muchos cromosomas y pocas anomalías estructurales. Los números cromosómicos generalmente varían entre 50 y 60. Aunque los cariotipos no son similares, se puede observar comúnmente la adición de ciertos cromosomas: +21, +6, +18, +14, +4 y +10 se observan en un porcentaje que varía entre el 45% y el 100% de los casos. En pacientes con casi haploidía se ven también los cromosomas 10, 18 y 21. El recuento de glóbulos blancos es bajo en estos casos (6.000 células/mm³). La sobrevida de estos pacientes es incluso más alta que en aquellos con cariotipo normal [21].

La evidencia presentada aquí demuestra claramente la especificidad de ciertos reordenamientos cromosómicos para subtipos particulares de leucemia o linfoma. Un reordenamiento particular provee una ventaja proliferativa solamente a un linaje particular y solamente a un estadio particular en la diferenciación de ese linaje [34].

Desde la descripción inicial del cromosoma Philadelphia hace 35 años, la investigación citogenética se ha trasladado desde un nivel celular a uno molecular. En algunos casos, algunas alteraciones fueron asociadas a determinados genes.

Leucemia Aguda bifenotípica

La coexpresión de antígenos mieloides y linfoides B o T en las mismas células, también llamada población blástica de linaje mixto, ha dado origen al término bifenotípico, característico de algunos casos infrecuentes de leucemia aguda (menor del 5% de todas las leucemias

agudas)[4,35,36].

El alto grado de correlación con ciertas anomalías cromosómicas como t(9;22) y 11q23, incluyendo t(4;11)[37], sugiere que la expresión bifenotípica es más común en leucemias que afectan a las células precursoras hemopoyéticas con potencial de diferenciación hacia varios linajes [38]; este fenómeno se denomina "switch fenotípico".

Las bases moleculares de la transformación leucémica en seres humanos son desconocidas. En general la enfermedad aparece a partir de una proliferación descontrolada de precursores hemopoyéticos inmaduros derivados en algunos casos de progenitores hemopoyéticos dañados que carecen de la capacidad de transferir programas de diferenciación a los precursores que generan.

Los progenitores son células indiferenciadas capaces de renovarse; que presentan un proceso de maduración en donde se comprometen a una diferenciación específica. Este progenitor pluripotencial es capaz de madurar en un progenitor mielóide (CFU-S), de células eritroides, megacariocitos, eosinófilos y fagocitos, y en un progenitor linfóide (CFU-L) que da origen al progenitor de los linfocitos T y B que pueblan la médula ósea, los nodos linfoides, las placas de Peyer y el bazo. La leucemia puede surgir durante la maduración de los progenitores en los distintos estadios (desde los estados más primitivos hasta los más maduros).

Los blastos leucémicos, ya sea *in vivo* o *in vitro*, demuestran generalmente carecer de funcionalidad. Algunas líneas celulares de origen mielóide pueden madurar bajo ciertas condiciones ambientales. Sin embargo, la inducción de la diferenciación en células leucémicas no ha sido demostrada claramente hasta el momento.

En cocultivos de células normales de médula ósea y células leucémicas mieloides se ha comprobado la supresión del crecimiento del progenitor normal [39].

Desarrollo de las células linfoides

Los linfocitos derivan de las células madres (*Stem cells*) pluripotenciales de la médula ósea y que da origen a las células eritroides, megacariocíticas y mieloides. Cuando las células progenitoras

entran en los órganos primarios de diferenciación se produce el compromiso hacia el linaje B o T. A un nivel celular la proliferación y diferenciación de los progenitores linfoides es dirigida por el microambiente provisto por dichos órganos. En la médula ósea, este medio ambiente, generalmente llamado estroma incluye células adventicias, reticulares y endoteliales, fibroblastos, macrófagos, adipocitos y una matriz extracelular. Las células del estroma producen una variedad de citoquinas necesarias para la diferenciación y proliferación de las células B-linfoides. En el timo, una red de células epiteliales altamente especializadas, células dendríticas y macrófagos es esencial para una expansión clonal de las células T y su selección.

Generación de diversidad inmunológica

El repertorio tan diverso de las especificidades antigénicas de las inmunoglobulinas y de los receptores T se genera a partir de reordenamientos sucesivos de genes que codifican para estas proteínas [40,41]. Esta diversidad es aumentada por la adición al azar de nucleótidos en las regiones de unión de los loci Ig en las células B o de los genes TCR en las células T [39,40].

Cuando estos reordenamientos son producidos (ie: cuyo resultado final es una proteína componente de inmunoglobulinas o receptor T) éstos promueven una mayor diversidad a través de la asociación al azar de los segmentos diferentes de cadenas pesadas y livianas en las inmunoglobulinas y cadenas distintas en los receptores de las células T.

En la ontogenia B y T normal se ha postulado una secuencia ordenada de reordenamientos génicos. Estos reordenamientos también sirven como marcadores clonales de leucemia, al extremo que algunos patrones de reordenamientos han sido incorporados a los esquemas de clasificación de las leucemias [42,43].

La heterogeneidad en la diferenciación de las células leucémicas se puede observar estudiando los antígenos de superficie celulares leucémicos.

Leucemia Linfoblástica Aguda

La LLA T ocupa aproximadamente el 15% al 20% de los casos de la leucemia; los linfoblastos

T tienen sitios antigénicos característicos reconocibles por anticuerpos monoclonales. La LLA T se caracteriza por una tasa hombre:mujer de 4:1, una edad promedio de diagnóstico a los 12 años, un recuento de glóbulos blancos mayor a 100.000 células/mm³ junto a un hematocrito normal y una incidencia alta de masa mediastinal [20]; salvo un 5% a un 10% que no responde a los patrones conocidos de clasificación, el resto pertenece al linaje B; éstas expresan el antígeno Ia y otros antígenos de la superficie de células B inmaduras y también presentan reordenamientos de las cadenas livianas de las inmunoglobulinas entre el 15% y el 20% de estas células contienen inmunoglobulinas intracitoplasmáticas y a veces se las refiere como "pre B".

La mayoría de las leucemias B inmaduras expresan un antígeno común de las LLA (CALLA). Este antígeno se expresa en otras subpoblaciones celulares en la médula ósea y en otras células malignas.

Las leucemias B maduras, caracterizadas por inmunoglobulinas de superficie son raras en niños (1% a 2%) y son clínicamente caracterizadas por su morfología (FAB-L3). Algunos casos raros expresan marcadores B y T.

Leucemia Mieloblástica Aguda

Los anticuerpos monoclonales que caracterizan a las LLA no reaccionan en las LMA. Las células de las LMA tienden a expresar los antígenos característicos en patrones característicos de las células mieloides normales inmaduras [44]. Esto sugiere que su origen sería a partir de un progenitor mielóide. En algunos casos existen células que comparten características mielóide y linfóide (leucemias bifenotípicas).

Marcadores citoplasmáticos

Leucemia Linfoblástica Aguda

Enzimas características en las LLA:

La deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), es una enzima útil para diferenciar LLA de LMA a pesar que el 5% de las LMA pueden ser TdT positivas [45]; la hexaminidasa, fosfatasa alcalina

y tres enzimas de la vía de las purinas: purina nucleosido fosforilasa, 5'-nucleotidasa y adenosina deaminasa, son consideradas como enzimas características de las LLA; estas características son útiles clínicamente; la TdT está presente en el 90% de las LLA [46].

Las células leucémicas de la mayoría de los niños con LLA sin tratamiento expresan el receptor de los glucocorticoides [47]. En general las leucemias no T tienen mayor afinidad por los glucocorticoides que las T; este hallazgo es sumamente útil para determinar las subclases.

Marcadores celulares

Además de las proteínas codificadas por los genes Ig y TCR las células linfoides expresan una serie de antígenos relacionados con su linaje durante el proceso de maduración (ordenados en "cluster de diferenciación" o CD). Hasta el momento se han identificado más de 89 grupos y subgrupos de CD [37].

Linaje B

Los antígenos CD19 y CD22 citoplásmico aparecen en forma temprana durante la ontogenia B y se expresan virtualmente en todos los casos de LLA de linaje B. El resto se puede exponer secuencialmente como CD24 → CD10 → CD20 → CD22 → Ig citoplasmática → CD21 → Ig de superficie → CD23. Según la jerarquía de los reordenamientos de los genes de las Ig en la ontogenia B, el reordenamiento de la cadena pesada precede al de las livianas. Estudiando las expresiones antigénicas y los reordenamientos de las Ig en la LLA B se han propuesto varios modelos para el desarrollo de las leucemias B.

Linaje T

El descubrimiento de los genes del receptor T y de una gran variedad de anticuerpos monoclonales para los antígenos asociados las células T, ha estimulado un notorio desarrollo en el estudio de la ontogenia de los linfocitos T. De manera similar a los genes de las inmunoglobulinas, los genes del receptor T se reordenan durante la diferenciación para permitir la diversidad de su receptor. Se han identificado dos tipos de moléculas diferentes de receptores

las que consisten en heterodímeros de cadenas polipeptídicas glicosiladas ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$).

Tradicionalmente, las células T han sido clasificadas de acuerdo a cambios en la expresión de los antígenos de diferenciación de superficie. Reinherz *et al* [48,49] propusieron un esquema de tres etapas de maduración tímica, que ha sido la base de la clasificación de las LLA T.

Esta clasificación se basa en la expresión de CD2 y de CD3.

Primera etapa temprana (I): CD7, CD2 y CD5, con ausencia de expresión de los antígenos CD1, CD4, CD8 y CD3.

Segunda etapa intermedia (II): CD7, CD2, CD5 y CD1, con expresión variable de CD4 y CD8 y débil de CD3.

Tercera etapa madura (III): las células expresan CD3, CD5, CD7 y CD2, CD4 y CD8 también están presentes en la mayoría de los casos, siendo característico de este estadio la expresión de CD4 o de CD5 (no su coexpresión).

Marcadores independientes de linaje

Algunos antígenos CD no están relacionados a un linaje celular específico y se miden rutinariamente en la célula leucémica.

CD10: fue el primer antígeno usado para subclasificar las LLA; también se lo ha llamado antígeno común de las LLA (CALLA). Su presencia en las células leucémicas sirve como marcador de LLA común.

CD34: se expresa selectivamente en progenitores mieloides o linfoides.

CD45: se encuentra en todas las células hematopoiéticas excepto eritrocitos y plaquetas. En algunos casos de LLA y algunas líneas celulares leucémicas su expresión está ausente.

CD38 y CD71: son glicoproteínas de membrana que aparecen en estadios tempranos de maduración tímica. CD38 se expresa en un 20% de las células de médula ósea normal, linfocitos T periféricos activados por mitógenos y plasmocitos, blastos de leucemias mieloides y linfoides

agudas, pero se halla ausente en los linfocitos T en reposo (*resting*). CD71 generalmente se expresa más fuertemente en células que están proliferando o están transformadas que en las *resting* debido a su rol en la toma de hierro; se lo detecta en las células que se dividen.

Clasificación de las LLA infantiles

En general se basa en un patrón celular de reactividad con un panel de anticuerpos monoclonales asociados a linaje. Por este método la LLA puede ser ampliamente clasificada.

Linaje T: cCD3⁺, CD7⁺ más CD5⁺ o CD2⁺, o ambos.

Linaje B: CD19⁺, CD22⁺

A su vez se subdividen en 3 subtipos:

B:	expresión de slg cadenas pesadas y livianas
pre-B:	clg ⁺
early pre-B:	clg ⁻ , slg ⁻ .

Recientemente se reconoció otro subtipo llamado pre-B transicional (cIg⁺, slgμ⁺ y slg κ, λ) [50].

2. ELEMENTOS GENÉTICOS QUE CONTROLAN EL CÁNCER: Genes Supresores de Tumor

Como hemos visto, las oncoproteínas pueden inducir la transformación maligna de las células, activando vías que regulan la proliferación celular en respuesta a mitógenos; estas vías no contienen solamente reguladores del crecimiento celular y diferenciación; en efecto, una gama de genes y sus derivados pueden suprimir el crecimiento celular [51].

Los tejidos pueden usar dos estrategias para limitar la proliferación celular: la primera depende del racionamiento de la señales mitógenas que estimulan el crecimiento celular normal. Por ejemplo, el PDGF y el FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) están muy controlados en los tejidos normales. La segunda estrategia está basada en reguladores que activamente suprimen la proliferación. Estos genes, llamados genes supresores, genes supresores de tumor, o anti-oncogenes, son tan importantes como los proto-oncogenes; cuando uno de estos genes es inactivado, la célula no puede restringir su proliferación y finalmente desarrolla un crecimiento excesivo.

En la década del '60, fusionando células normales con células tumorales se encontró que algunas veces se perdía la capacidad tumorigénica de las últimas [52], por lo tanto, debía existir algún factor proveniente de las células normales con actividad supresora de tumor; esta actividad estaría vinculada a un componente de la célula normal, ya sea sus proteínas, su estructura funcional o bien, sus genes. Como la capacidad no-tumorigénica se mantenía por varias generaciones celulares, se infirió que los genes deberían estar implicados en el proceso. Respondiendo a su estructura funcional restaurada, la célula tumoral revierte a su fenotipo normal. Cuando pierde ese factor limitante del crecimiento esa célula revierte nuevamente a maligna.

Utilizando técnicas de bandeado cromosómico se encontró una aberración cromosómica en niños con retinoblastoma (un tumor de células embrionarias que se desarrolla en la retina), consistente en la falta de la banda q14 del cromosoma 13. Posteriormente se correlacionó la ausencia del gen Rb con la formación del tumor [53]; para que progrese la enfermedad es necesario que no haya ninguna de las dos copias del gen Rb. A veces, en casos de hemicingosis, durante el desarrollo

del ojo y su retina la copia normal del Rb se inactiva y se produce el crecimiento excesivo; se estima que el 95% en niños hemiciotas para Rb desarrollan tumores de retina.

Otro ejemplo claro ocurre en el cáncer de colon, donde falta una parte del brazo largo del cromosoma 18; se encontraron deleciones de este gen denominado DCC (deleted in colon carcinomas) en más de un 70 % de los tumores de colon analizados [54].

Muchos de los genes supresores de tumor se comportan de manera parecida al Rb: ambas copias deben estar inactivadas para que la célula crezca descontrolada. Por ejemplo la falta del gen WT-1 puede inducir el tumor de Wilms, mientras que la ausencia de NF-1 determina el desarrollo de neurofibromatosis [55].

Un gen supresor parcialmente relacionado con este modelo es el p53, cuya proteína es un tetrámero, si una de sus unidades está alterada, la proteína entera es defectiva desde que el tetrámero necesita que las cuatro subunidades sean funcionales; mientras que en otros genes se necesita una copia activa (1/2); si la copia es defectuosa las posibilidades de que la proteína sea activa se reducen a 15/16 [56].

3. EL SISTEMA INTERFERÓN

Reseña histórica

Los interferones fueron identificados en la década del 50 como productos de células infectadas por virus que interferían con la replicación viral; el interferón leucocitario es producido predominantemente por los linfocitos B. El interferón inmune (interferón γ) es producido por linfocitos estimulados por mitógenos o antígenos. Usando sondas radioactivas a partir de clones de interferón Owerbach *et al* (1981) localizaron el cDNA purificado de 8 genes de interferón leucocitario y uno de interferón de fibroblastos en el cromosoma 9 [57].

Shows *et al* (1982) encontraron que los genes del interferón α y del β se localizan en el 9p [58]. Hay cerca de 10 genes ligados para interferón α . Lawn *et al* (1981) secuenciaron 2 genes ligados cercanos para el interferón leucocitario [59]. Están a 12 kb de distancia y no poseen secuencias intervinientes. Se conocieron otros 2 IFAs a 5 kb de distancia.

Isaacs *et al* (1981) estudiaron 30 niños con insuficiencias respiratorias recurrentes y encontraron 4 con producción deficiente de interferón leucocitario en linfocitos estimulados por virus *in vitro* y en secreciones nasofaríngeas como respuesta a la infección de rinovirus *in vivo* [60]. También se describieron deficiencias en la producción de interferón inmune asociado a la ausencia de actividad NK en infecciones persistentes del virus de Epstein Barr [61]. El trabajo de Isaacs *et al* (1981) fue el primero relacionado a algún defecto en la producción de interferón α [60].

Por hibridización *in situ*, Trent *et al* (1982) localizaron los genes IFL (leucocitario) y IFF (fibroblástico) en 9p21-pter y IFI (inmune) en 12q24.1 [62]. A partir de estudios de pacientes con LMA y t(9;11)(p22;q23) Díaz *et al* (1986) concluyeron que el interferón α se localiza en la región 9p21-p13 [63]. En 1985 Ohlsson *et al* (1981) elevaron el número de genes IFL de 15 a 30, pero determinan que el número de secuencias diferentes identificadas podría estar basado en el polimorfismo [64]. Para una mejor definición de los reordenamientos y deleciones en la región de los genes del interferón en las neoplasias, Fountain *et al* (1982) realizaron electroforesis en campos pulsados e hibridización *in situ* de marcadores en la zona [65]. En 1992 Olopade *et al* definieron a la región del cluster de los genes del interferón como 9p22 [66]; éste

comprende cerca de 26 genes de interferón α , ω y un β , así como también el gen de la MTAP (metil tioadenosina fosforilasa). El IFN β_1 está presente en una sola copia, mientras los interferones α y ω están presentes en copias funcionales múltiples y pseudogenes, los cuales están intercalados. También encontró que el IFNA1 está en el extremo centromérico del cluster, mientras que el IFNB1 en el entorno telomérico.

Diaz *et al* (1994) realizaron el mapeo de 26 genes de interferón [67]. El gen más distal en el 9p es IFNB y el más proximal es el pseudogen IFNWP19. La dirección de transcripción de los 20 interferones más distales es hacia el telómero mientras que para los más proximales es hacia el centrómero. Varias regiones del cluster muestran evidencia de eventos de duplicación; este mismo grupo tabuló la nomenclatura de los interferones humanos. El gen IFN α_2 fue localizado en el cluster de los genes del interferón en 9p22 por Olopade *et al* (1992) [66].

El interferón ω se encuentra intercalado entre los genes del interferón α en el 9p21. En las LLAs y en los gliomas se encontró una región de deleciones en el brazo corto del cromosoma 9. Comparando las deleciones microscópicas con las pérdidas a nivel molecular se pudo determinar el orden de estos genes. Finalmente se dedujo la siguiente secuencia en 9p: pter--IFNB1--(IFNW1, IFNA21)-- IFNWP15--IFNA4--IFNW9--IFNA7--IFNA10--IFNWP18- -IFNAP16--IFNA17-- IFNA14--(IFNA22, IFNA5, IFNAP20, IFNA6, IFNA13, IFNA2)--(IFNA8, IFNW2, IFNWP19, IFNA1)-- MTAP-- cen.

Estos genes están organizados en tándem con sus extremos 3' hacia el telómero. Así, se ha realizado el mapeo de al menos 2 genes interferón ω funcionales IFNW1 y IFNW2 y varios pseudogenes, como por ejemplo el IFNWP15, fueron localizados.

Características generales

Los interferones (IFNs) son proteínas presentes en muchos vertebrados y en todos los mamíferos [68]. Se han aislado, identificado y clonado un gran número de secuencias de ADN de varias especies, además de los interferones humanos; estos últimos poseen un espectro amplio de actividades biológicas [69], siendo las principales la antiviral y la antitumoral. Por su naturaleza son moléculas regulatorias con un rol muy importante en procesos de crecimiento, diferenciación

y desarrollo celular.

Antigénicamente podemos diferenciar tres tipos de interferón: α , β y γ . Otro interferón, el ω fue recientemente identificado [70]. El interferón α_2 y el β_1 poseen un epítipo en común [71], lo que indicaría que la distinción antigénica no es absoluta entre estos dos subtipos.

Además de sus actividades antivirales tienen otras propiedades y se los utiliza clínicamente como agentes antivirales y anticancerígenos. Comparten algunas de sus actividades con las citoquinas IL-1, TNF y IL-6. Clínicamente se han testeado extensivamente en una variedad de desórdenes y son efectivos en ciertas malignidades y enfermedades virales.

Hay varias clases de moléculas de interferón distintas, las cuales fueron originalmente clasificadas de acuerdo a su fuente celular como inmune (IFN- γ), leucocitario (IFN- α), fibroblástico (IFN- β), IFN- ω (llamado en principio IFN- α II), e interferón trofoblasto.

Aunque existe evidencia de una pequeña síntesis constitutiva los interferones son proteínas inducibles [72]. Las bacterias, parásitos y algunos microorganismos y el ARN de doble cadena, entre otras moléculas inducen la síntesis de los IFNs α y β en una variedad de células que incluyen fibroblastos, macrófagos, linfocitos B y T, células endoteliales y epiteliales. También algunas citoquinas como el CSF-1 (factor estimulante de colonias) y el PDGF (factor de crecimiento plaquetario) pueden inducir síntesis de interferón. A estos interferones se los denomina de tipo I, en contraste con el γ que es de tipo II. A los interferones α se los denomina leucocitarios y al β fibroblástico, debido a las células donde se los encontró originariamente.

El promotor para IFN- α contiene varios elementos reguladores positivos y negativos, uno de los cuales responde a virus, ARNdc y también a otros estímulos. El otro resaltador de la transcripción (*enhancer*) une al inductor IRF-1 [73]. Este sitio también une el factor inhibidor por feedback IRF-2 [74], que responde a la estimulación por interferón α o β .

Los interferones de tipo I comparten un mismo receptor codificado por un gen del cromosoma 21; estos interferones salen de sus células productoras y se unen a receptores autócrinos y parácrinos. El interferón γ se une a un receptor diferente, formado por dos subunidades codificadas por los cromosomas 6 y 21. Existe cierta competencia entre los interferones β y γ

[69] por el receptor del interferón γ . Los interferones se unen a sus receptores donde una tirosina quinasa asociada al receptor es requerida para la transducción de señales activando una cascada de fosforilaciones y desfosforilaciones alternativas que involucran la inducción de varios genes.

La actividad inmunomodulatoria está presente en los tres tipos de interferón, aunque en el interferón γ su participación en la respuesta inmune es mayor. Como respuesta a la inducción por antígenos y mitógenos los linfocitos T producen este interferón. *In vivo*, en tejidos normales humanos se pueden detectar niveles basales de mRNA para interferón α .

En los seres humanos el cluster de los genes de interferón α se encuentra en el brazo corto del cromosoma 9 en la banda p21, próximos al interferón β que se halla en la banda p22. Ninguno de estos genes posee intrones.

En un principio se había llamado interferón β_2 a un gen ubicado en el cromosoma 7 [75], que posee 4 intrones y no presenta homología con el interferón β_1 , salvo algunos epitopes. Actualmente se lo denomina interleuquina 6 [76].

El gen del interferón γ se halla en el brazo largo del cromosoma 12 en la banda q24.1 [62]. Posee tres intrones y casi no presenta homología con los otros interferones conocidos.

Evolución de los genes de interferón

En muchos vertebrados y en todos los mamíferos el interferón está presente, no así en invertebrados. Para la mayoría de los mamíferos el interferón α presenta una complejidad genética similar. Para el interferón β se halló una copia única en todos los casos menos en dos miembros de la familia Bovidae: *Bos taurus* (vaca) y *Antilope cervicapra* (antílope). Aquí la complejidad de la familia IFNB es similar a la IFNA humana. Wilson *et al* postularon una duplicación génica posterior a la radiación de los mamíferos y anterior a la divergencia entre vaca y antílope. Este mismo grupo también postuló que las familias de los genes de interferón tienden a estabilizarse en tamaño y organización a lo largo de la evolución [68].

Taniguchi *et al* postularon que los genes del interferón derivarían de un gen ancestral existente antes del surgimiento de los vertebrados, hace unos 500-1.000 millones de años y como

consecuencia de ello estarían presentes en todos ellos [77]. Observaron la gran homología existente en las regiones codificadoras de los genes del interferón α y el gen interferón β en humanos, a nivel del ADN y proteico y sugirieron una duplicación a partir del gen ancestral dando origen a los genes α y β de los interferones. Posteriormente, el interferón α se duplicó dando origen a la familia de genes del interferón α ; esta hipótesis se ve favorecida por el hecho de que estos genes no poseen intrones y se encuentran en tándem, concepto que se contradice al no encontrarse interferones en todos los vertebrados, ya que las primeras clases de vertebrados aparecidas evolutivamente, los peces y los anfibios, no poseen interferón α .

La comparación en una especie dada de las homologías entre los genes parálogos (genes originados a partir de un gen ancestral por duplicación) permite establecer una filogenia génica [78]. De esta manera el interferón α y el β surgidos a partir de un gen ancestral duplicado fueron originariamente genes parálogos. Al duplicarse repetidamente entre sí, el gen α dio origen a la familia de los interferones α [77].

Cuando se comparan genes de diferentes especies el análisis se complica al ser difícil distinguir entre secuencias ortólogas (de un gen ancestral común a ambas especies) y parálogas (a partir de un gen ancestral por duplicación). La tasa evolutiva v ($v=Ka/(2t)$, siendo Ka el índice de diferencias entre dos secuencias de ADN codificantes; y t el tiempo de divergencia entre esas dos secuencias) fue calculada por Miyata y colaboradores [79]. Para los genes del interferón α fue similar a la de los genes de las inmunoglobulinas, es decir una evolución rápida. Este mismo grupo propone la existencia de un reloj molecular para los genes del interferón basado en una relación lineal entre el tiempo de divergencia de dos secuencias provenientes de una ancestral y la acumulación de mutaciones en ambas secuencias y calcularon el origen de la familia de genes del interferón α humano a partir de un ancestro único hace 40 millones de años. Sin embargo, la radiación de los mamíferos ocurrió hace unos 85 millones de años.

Otra hipótesis se refiere a una evolución concertada para esta familia [68,80]. Como consecuencia de una acumulación de mutaciones y recombinaciones los genes de esta familia tenderían a homogeneizarse exhibiendo secuencias en común, aumentando el grado de homología entre estas secuencias. Este tipo de evolución fue también propuesto para explicar otras familias multigénicas [81,82].

Por su parte, el gen del interferón γ casi no presenta homología con los de tipo I, aunque analizando la estructura secundaria de la proteína se halló cierta homología [83,84] en el extremo carboxiterminal. También se postuló un origen común para los tres interferones explicando la separación del gen del interferón γ con posterioridad a la divergencia entre α y β con una translocación al cromosoma 12 y su inserción en medio de otra proteína. A pesar de esos estudios, la homología es muy limitada y también podría ser el resultado de una evolución convergente.

Como conclusión se puede decir que la identidad de secuencias es una condición necesaria pero no suficiente para determinar un origen común.

Familia de los interferones de tipo I

De los 8 a 10 genes de interferón α originariamente descritos por Nagata [85] actualmente se conocen cerca de 26 genes de interferón en la misma familia. Según la homología se los agrupa en dos familias: I y II. Estos genes se expresan coordinadamente como respuesta a una infección viral. La determinación exacta del número de genes y grupos de ligamiento en la familia de los interferones α humanos aún no se ha completado y actualmente sigue realizándose.

Los genes de la familia α I poseen un 85% de homología nucleotídica y un 77-94% aminoacídica entre ellos. Cuando se los compara con el interferón β la homología nucleotídica disminuye a un 48% y la proteica a un 29%; la homología de los genes II respecto del interferón β presenta porcentajes similares.

El mecanismo antiviral del interferón involucra la activación por ARNdc de 3 enzimas latentes: 1) 2' 5' oligo(A) sintetasa cataliza la producción de un oligonucleótido que activa una segunda enzima latente (2) RNAsa L, que cliva ARNsc; 3) una proteína quinasa es inducida que fosforila dIF2, suprimiendo la síntesis proteica. El interferón también protege contra una variedad de agentes no virales que incluye bacterias intracelulares y extracelulares, rickettsia, parásitos, hongos, etc.

La división celular es suprimida por el interferón y la diferenciación puede ser inducida en

células normales y tumores [86]. El interferón puede controlar la actividad mitogénica de un número de factores de crecimiento como el CSF-1, PDGF, EGF, IL-2 y IL-4. Por otra parte inhiben la expresión de varios proto-oncogenes como por ejemplo la inducción de C-MYC y C-FOS por el PDGF y en líneas celulares transformadas, la expresión del SRC y HA-RAS.

En macrófagos, el interferón γ es el activador más potente, pero los interferones α y β también poseen acciones en estas células; promueven la diferenciación de los macrófagos y los induce a aumentar su tamaño, adherirse, expandirse y formar pseudópodos. Además aumentan la síntesis de enzimas microbicidas como las hidrolasas lisosomales, esterasas y proteasas. Finalmente inducen la expresión del receptor F_c del macrófago porque aumenta la fagocitosis de los inmunocomplejos y aumenta la capacidad para lisar bacterias, parásitos y células tumorales recubiertas por anticuerpos.

La actividad presentadora de antígeno es aumentada por los interferones α y β . Aún hoy no se sabe si se debe a un aumento o no de la expresión de las moléculas MHC II [87-89], ya que este aumento puede ser un efecto indirecto de la expresión de TNF, IL-1 o alguna otra señal coestimuladora de los macrófagos.

En los linfocitos los interferones α y β promueven y aumentan la actividad citotóxica. Las células blanco para esta actividad también son más sensibles a sus alcances después de estar expuestas a los interferones α y β gracias a una sobre-regulación de los MHC I.

También aumenta la proliferación de las células B y la secreción de inmunoglobulinas; además del aumento en la producción de estas últimas, los interferones α y β antagonizan el switch a IgE inducido por IL-4. También exacerban reacciones alérgicas, probablemente porque aumenta la liberación de histamina de basófilos gatillada por anticuerpos anti IgE y además aumentan la actividad NK en los granulocitos.

El interferón es importante en la defensa del huésped, ya que en humanos se producen a partir de una infección viral [90]. En varios estadios inmunodeficientes se asocia una producción reducida de interferón a infecciones por Herpes Zoster, Hepatitis B crónica y HIV [91] y a inmunosupresión en pacientes transplantados de médula ósea [92].

Interferón α

El interferón α se une a su receptor con actividad tirosina quinasa. La subunidad Tyk2 ejerce su actividad sobre una segunda tirosina quinasa Jak1, que fosforila a STAT91; una vez fosforilada se transloca al núcleo y es un componente de un factor de transcripción llamado ISGF3. Un camino similar que lleva a ISGF3 es inducible por interferón γ , pero induciendo a Jak1 y a Jak2 en vez de Tyk2 [93]. El factor de transcripción ISGF3 induce muchos genes [94].

Al realizarse el clonado en *E. coli* de varios cADN y ADN genómicos se confirmó la existencia de varias especies de interferón α humanos. También se purificaron por HPLC varias especies naturales de interferón α , las cuales pueden ser sintetizadas por una misma célula, como se observó en cultivos de células leucémicas [95].

La homología dentro de los interferones α es de un 90% a nivel nucleotídico y mayor de un 80% a nivel aminoacídico. Dado que algunas proteínas purificadas presentan pequeñas variaciones en el extremo carboxiterminal como la falta de algunos aminoácidos, un mismo cADN puede corresponder a más de un polipéptido. Este criterio fue posteriormente utilizado para elegir la sonda de cADN apropiada para identificar los interferones de tipo α en los experimentos de Southern blot. Casi todos los interferones poseen 166 residuos que corresponden a la proteína madura y un péptido señal de 23 residuos aminoacídicos.

Se ha estudiado la expresión diferencial de los genes de interferón humanos [96] en distintos tipos celulares y con inductores diferentes. Según el tipo celular variaba la expresión de los mARN de interferón α y β . El interferón β fue la especie predominante en fibroblastos y células HeLa; mientras que los leucocitos de sangre periférica y los linfoblastos poseían ambos tipos de transcriptos.

Los niveles de los diferentes mARN de interferón α parecían no variar mucho según el inductor, pero sí según el tipo celular, por ejemplo la proporción de mARN IFN α_1 /IFN α_2 inducidos por virus Sendai era de 1,7 en leucocitos y de 0,4 en células linfoblastoideas.

Se demostró que el tipo celular es el que determina qué genes de interferón α se expresan. Se observó que los monocitos y los linfocitos producían una mezcla de subtipos de interferón α al

ser inducidos de igual manera, así los monocitos producían un interferón α de PM 26.000 similar al interferón α_8 y los linfocitos interferón α_1 e interferón α_2 [97]. Se concluyó más tarde que la regulación génica de los distintos subtipos de interferón es diferente en los miembros de la familia dependiendo del tipo de inductor y de otros parámetros que reflejarían la severidad de la infección viral. Estos subtipos variarían en la potencia de su actividad biológica [98].

También se detectó síntesis constitutiva de los distintos interferones α en varios órganos [99]. Antes de la infección viral el número de mRNA de interferón α era muy pequeño. Otros autores hallaron interferón α y β en placenta en 29 de 37 muestras analizadas, lo que descartaría que fueran producto de alguna infección viral [100], aunque probablemente intervienen en la tolerancia inmune durante el embarazo.

Un grupo de investigadores descubrió un interferón α ácido lábil (característica no compartida por el resto de los interferones α) en suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico [101], en células mononucleares totales de enfermos de HIV [102]. Otros investigadores descubrieron moléculas con las características del interferón, pero que no eran neutralizadas por los anticuerpos contra los mismos [103] y las llamaron IFN like protein (ILP).

Interferón β

Los leucocitos infectados por virus producen interferón α y β , en cambio los fibroblastos producen frente al mismo estímulo principalmente interferón β , en tanto que producen una pequeña cantidad de interferón α [95].

Al inducir fibroblastos con ARN bicatenario sólo se sintetiza interferón β . Un 90% corresponde al interferón β_1 , mientras que el otro 10% a otras formas, una de las cuales se llamó en un principio interferón β_2 [104] y ahora se denomina interleuquina 6 [76]. Esta molécula es producida por una gran variedad de células: fibroblastos, monocitos, macrófagos, células endoteliales, algunas líneas de células T y por varias líneas de células tumorales; su presencia es muy importante en la respuesta de la fase aguda al ser liberada por los tejidos dañados estimulando diversas acciones inmunológicas. Su gen se encuentra en el cromosoma 7p21 y

posee 4 intrones y 3 secuencias TATA Box, lo que aclararía sus múltiples mecanismos de regulación [76].

Otros autores describieron otros interferones de tipo β : IFN β 3, 4 y 5 ubicados en los cromosomas 2 [105,106] y 5 [95]; poseen actividad antiviral y presentan homología nucleotídica y conformacional; si embargo, se cree que su intervención primordial es a otro nivel fisiológico, como por ejemplo, la diferenciación celular.

Interferones de tipo II

Interferón γ

El gen del interferón γ se halla en el cromosoma 12 [62,107]; es un gen de copia única y a diferencia de los interferones de tipo I (α y β) posee tres intrones. Estos cuatro exones codifican un polipéptido de 166 aminoácidos. La proteína madura que se secreta al medio extracelular está formada por 146 aminoácidos, mientras que los 20 primeros del extremo aminoterminal forman un péptido señal de anclaje a la membrana [108]. A pesar de que los interferones de tipo I también poseen péptidos señales, la homología entre ambas clases es muy poca. Sin embargo De Grado *et al* (1982) plantean una semejanza entre los tres tipos de interferones teniendo en cuenta las estructuras secundarias y terciarias [83].

Se observó cierta homología entre las clases α y γ en la zona del clivaje del péptido señal con 5 aminoácidos en común así como una zona más distante hacia el extremo carboxilo, de 4 aminoácidos en común. Sin embargo hay otras zonas donde no hay homología, como por ejemplo las regiones promotoras de los de tipo I y los de tipo II, probablemente porque son activados por inductores diferentes [108].

Hay varias proteínas interferón γ de pesos moleculares de 15,5 kD, 20 kD y 25 kD debidas a los diversos grados de glicosilación de la misma especie proteica de interferón γ [68,109]. En condiciones fisiológicas se encuentra como dímero de PM de 40 kD a 60 kD; la unidad funcional sería un tetrámero, a diferencia del monómero para interferón α y del dímero para el interferón β [110].

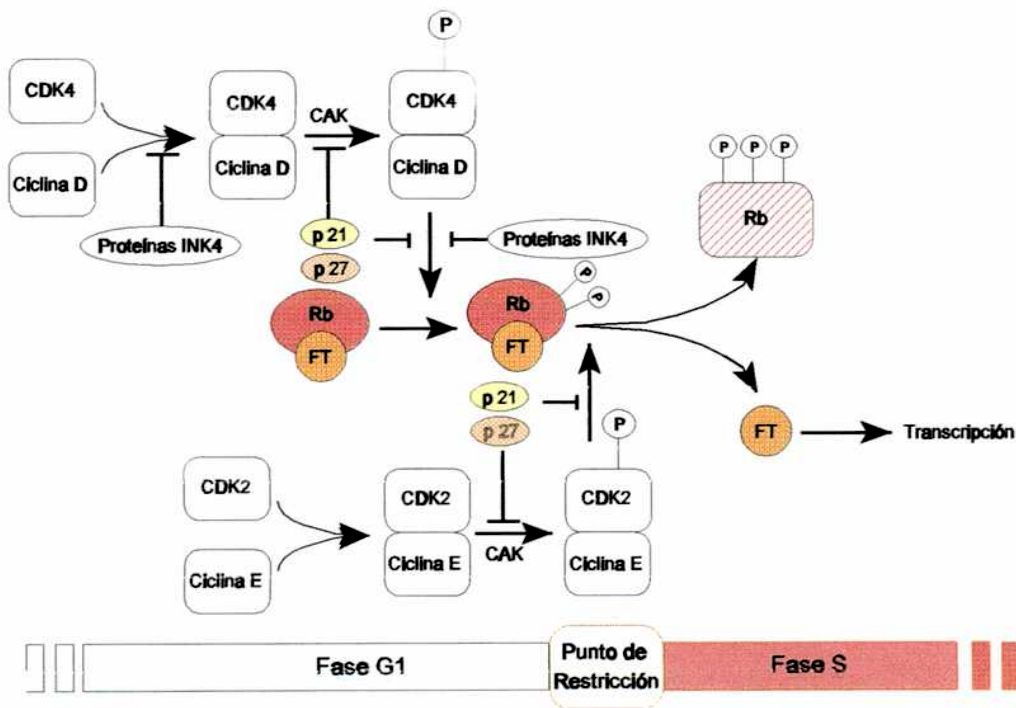
4. p16

Regulación del ciclo celular

Las células pueden diferenciarse, programar su muerte, o llevar a cabo la división celular en respuesta a demandas internas y externas. Si la célula prolifera, lo hace a través del ciclo celular, que consiste en las fases G1, S, G2 y M. Las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) forman complejos con las ciclinas, y regulan el ciclo celular por medio de sus actividades serina/treonina kinasas [111]. En animales se han descubierto hasta el momento siete CDKs (CDK1 a CDK7) y ocho ciclinas (ciclina A a ciclina H). Las CDKs necesitan ser activadas o inactivadas de determinada manera en ciertos puntos temporales específicos durante el ciclo celular para ordenar la división celular. La decisión sobre la entrada de la célula al ciclo celular se toma en la fase G1, las células inevitablemente atraviesan un ciclo celular si pasan el sitio de restricción al final de la fase G1. La transición G1/S requiere de la actividad de los complejos ciclinas D/CDK4 y ciclinas E/CDK2. Durante el arresto del ciclo celular, la proteína retinoblastoma (Rb) se inactiva a una forma defosforilada, y se combina con factores de transcripción como el E2F. Estos complejos ciclinas/CDK fosforilan la proteína Rb y la activan. Subsecuentemente esta libera factores de transcripción que inducen el progreso del ciclo celular de la fase G1 a la fase S (Figura 1).

Recientemente se identificaron proteínas inhibitorias para los complejos ciclina/CDK. Estas proteínas (inhibidores de las kinasas dependientes de ciclinas; CDKI) se dividen en dos familias basadas en las diferencias de sus estructuras primarias y sus modos de acción probables. Una es la familia que inhibe universalmente a las CDKs, incluyendo p21 [113], p27 [114] y p57[115], y la otra es la familia INK4, que incluye a p16^{INK4A} [116], p15^{INK4B} [117], p18^{INK4C} [118] y p19^{INK4D} [119]. La familia INK4 inhibe las actividades de los complejos ciclina D/CDK4 y ciclina D/CDK6 combinándose con CDK4 o CDK6 [120], p21 y p27 inhiben la actividad de CDK formando complejos ternarios, mientras que la familia INK4 forman complejos binarios [121].

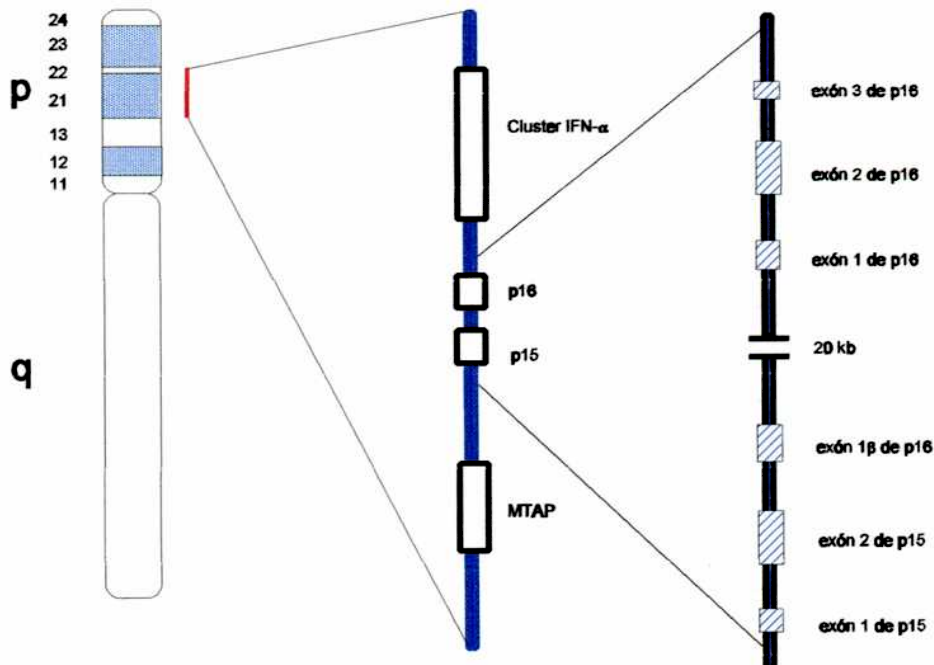
Figura 1. Regulación del ciclo celular en la transición G1/S. El complejo ciclina D/CDK4 y el complejo ciclina E/CDK2 necesitan que CAK (kinasa activante de CDK) los active por fosforilación para ser catalíticamente activos. Ambas clases de complejos fosforilan secuencialmente a la proteína Rb, y promueven la liberación de factores de transcripción (FT) de la proteína Rb. Estos factores liberados activan genes necesarios para la progresión a la fase S, que se inicia [112].



Descubrimiento del gen *p16* (*CDKN2*)

Se han reportado anomalías genéticas, moleculares y citogenéticas en el cromosoma 9p21 de varios tipos de enfermedades malignas. Como la mayoría de las líneas celulares con deleciones en el cromosoma 9p21-22 o carecían de actividad de la metiltransferasa (MTAP) o presentaban deleciones del cluster de los genes del interferón- α (*IFN- α*), se realizaron investigaciones intensivas. Como resultado de ellas se identificó en la región consenso de la deleción un gen denominado *multiple tumor suppressor 1* (*MTS1*), que resultó idéntico al gen *CDKN2* que codifica para la proteína p16. (Figura 2) [122,123] Al mismo tiempo se identificó en la vecindad del gen *CDKN2* otro gen que comparte una gran parte de su secuencia con el exón 2. Este gen denominado *multiple tumor suppressor 2* (*MTS2*) codifica para la proteína p15^{INK4B} [117].

Figura 2. Mapa de la región 9p21-22. El gen *CDKN2* se localiza telomérico al gen *MTAP*, y es centromérico al cluster del *IFN- α* en el cromosoma 9p21. El gen *MTS2* se halla a 20kb del gen *CDKN2* del lado centromérico. El exón 1 β del gen *CDKN2* se localiza próximo al gen *MTS2*.



El gen *CDKN2* posee 3 exones, con regiones codificantes de 150bp, 307bp, y 11bp, respectivamente, que se traducen en un polipéptido de 156 aminoácidos, la proteína p16. p16 es un miembro de la familia INK4, y contiene 4 dominios con repeticiones de ankirina. Se expresa diferencialmente en células diploides derivadas de distintos tejidos. Incluso su expresión varía durante el ciclo celular, con un pico en la fase S, sugiriendo que p16 se requiere solamente para la inhibición de CDK4 durante la transición G1-S [124].

Posteriormente se aisló un nuevo transcrito de p16 [125,126]. Este cDNA de p16 posee un exón 1 diferente (llamado exón 1 β), y se localiza *downstream* del exón 2 del gen *MTS2* y aproximadamente 20kb *upstream* del exón 1 del gen *CDKN2*. El arresto del ciclo celular puede ser inducido por ambas formas de transcritos. Estas dos formas poseen características diferentes, e incluso su expresión varía según los tejidos. Se supone que juegan un rol importante en la regulación del ciclo celular, y podrían incluso estar involucrados en la tumorigénesis.

El gen p16 (*CDKN2*) en tumorigénesis

Como los CDKs frenan la progresión del ciclo celular, problemas en estas proteínas podrían permitir un crecimiento celular ilimitado. Se ha sugerido que los genes CDKs actúan como genes supresores de tumor. El gen *CDKN2* ha sido analizado originalmente en líneas celulares; y se encontraron deleciones homocigotas en la mayoría de ellas [122,123]. Luego de estos estudios en líneas celulares se siguió con muestras primarias de tumores, y se encontró que muchas de ellas tenían alteraciones en los genes de *CDKN2* [127]. Simultáneamente se realizaron estudios desde el punto de vista funcional: en aquellas células tumorales que carecen de *CDKN2* endógeno, el agregado de *CDKN2* wild-type induce el arresto del ciclo celular y modifica el fenotipo transformado [128]. Estos resultados sugieren que el gen *CDKN2* es un gen supresor de tumor. Los otros CDKs, p18 [129,130], p21 [131] y p27 [132] también han sido estudiados intensamente; sin embargo, las alteraciones son raras en estos genes. Entre todos los CDKs, sólo se ha comprobado que p15 y p16 están involucrados en la tumorigénesis.

Como se mencionó anteriormente, p16 está fuertemente asociado con CDK4, la ciclina D, y la proteína Rb en el ciclo celular.[111] La inactivación del gen *CDKN2* está restringida a un subset de tumores que expresan el Rb wild-type [132], mientras que las alteraciones del gen *CDKN2*

y la amplificación del gen *CDK4*, o el gen *ciclina D*, ocurren concomitantemente o alternativamente [133]. Los componentes *upstream* de Rb, como p16, CDK4, y la ciclina D, podrían actuar juntos durante los estadios de la tumorigénesis.

En los cánceres hereditarios, el gen responsable generalmente lleva un cambio mutacional en la línea germinal, que facilita el desarrollo del cáncer [134]. En melanomas familiares, se han detectado mutaciones del gen *CDKN2* además de las mutaciones somáticas [135]. Recientemente también se asociaron a melanomas mutaciones puntuales del dominio de unión del gen CDK4 a p16 [136]. Estos datos confirman que p16 juega un rol importante en la tumorigénesis del melanoma familiar, y que también podría estar involucrado en la tumorigénesis de otros tipos de tumores.

El gen *p16 (CDKN2)* en la progresión del tumor

Las disrupciones frecuentes del gen *CDKN2* en líneas celulares sugieren que la inactivación del gen *CDKN2* favorece el crecimiento de los tumores malignos, y promueve la progresión de la enfermedad. Se han encontrado alteraciones del gen *CDKN2* en estadios avanzados de melanoma [137], cáncer de pulmón [129], y glioblastoma [138], sugiriendo la participación de estas alteraciones del gen *CDKN2* en la progresión de estas neoplasias.

--

p15 es inducido por señales extracelulares inhibitorias del crecimiento, como el factor transformante del crecimiento β (TGF- β) [117]. p15 y p16 pueden ser inducidas individualmente por señales distintas, sugiriendo que la disrupción de ambos CDKIs también genera ventajas adicionales en el crecimiento. Dado que las deleciones homocigotas del gen *CDKN2* generalmente incluye al gen *MTS2*, el significado de la inactivación de *MTS2* necesita ser aclarado. Se demostró el rol supresor de tumor de p15 por análisis de transfecciones [139], y también se demostró que la inactivación del gen *MTS2* por separado (sin la del gen *CDKN2*) se correlaciona con la progresión del melanoma [140]. Sin embargo, Heyman duda de la importancia de p15, ya que las deleciones exclusivas del gen *MTS2* incluyen el exón 1 β del gen *CDKN2* [141].

Mecanismos de la inactivación del gen *CDKN2*

La inactivación de los genes supresores de tumor ocurre principalmente por dos mecanismos [142]. Uno es la inactivación por alteraciones en las propiedades de sus productos génicos (cambios cualitativos) y el otro es por disminución o pérdida de sus productos génicos (cambios cuantitativos). Los cambios cualitativos pueden ser inducidos por mutaciones o por reordenamientos génicos en la región codificante, mientras que la *downregulation* causada por otros genes o por deleciones pueden dar lugar a cambios cuantitativos. Los genes supresores de tumor están frecuentemente involucrados en los cánceres humanos, por ejemplo los genes *Rb* y *p53* se encuentran inactivados principalmente por mutaciones [134].

Sin embargo, el gen *CDKN2* se inactiva por una variedad de mecanismos. En la mayoría de los tumores primarios se halla inactivado por cambios cuantitativos, generalmente inducidos por deleciones, como por ejemplo en cáncer de vejiga [143] y glioblastoma [127]. También se encontraron recientemente cambios epigenéticos como la metilación de la región del promotor [144], independientemente de la presencia de deleciones y mutaciones puntuales.

Los cambios cualitativos en el gen *CDKN2* también pueden estar participando en la tumorigénesis de ciertos tumores. En general son mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o mutaciones sin sentido que resultan en una proteína truncada [122,145].

De esta manera, el gen *CDKN2* puede inactivarse por varios mecanismos. Sin embargo, no está claro porqué estos mecanismos de inactivación varían entre los distintos tumores.

Alteraciones del gen *p16 (CDKN2)* en neoplasias hematológicas

En la **Tabla 1** se muestra un resumen de las alteraciones del gen *CDKN2* en neoplasias hematológicas.

Tabla 1: Alteraciones del gen *p16* (*CDKN2*) en neoplasias hematológicas

Enfermedad		% Deleciones homocigotas	% Mutaciones
LLA	Tipo T	20-80	rara
	Tipo B	15-30	rara
LNH		5-10	rara
LTA		20-30	rara
LMA		rara	0
SMD		0	0
LMC	Fase crónica	0	0
	crisis blástica mieloide	0	0
	crisis blástica linfoide	15-50	0
LLC		rara	rara
MM		0	0
EH		0	0

Abreviaciones: LLA: leucemia linfoblástica aguda, LNH: linfoma no Hodgkin, LTA: leucemia adulta T, LMA: leucemia mieloide aguda, SMD: síndrome mielodisplásico, LMC: leucemia mieloide crónica, LLC: leucemia linfoblástica crónica, MM: mieloma múltiple, EH: enfermedad de Hodgkin.

En LLA se han encontrado anomalías genéticas en el cromosoma 9p21-22 [146], lugar donde se halla el gen *CDKN2*. En líneas celulares derivadas de pacientes con LLA se lo ha encontrado inactivado por deleciones [147]. Frecuentemente se lo asocia con el fenotipo T [129,148]. El gen *CDKN2* es más importante que el gen *MTS2* en la leucemogénesis en pacientes con LLA [133,149]. Las deleciones del gen *CDKN2* se han correlacionado con un alto número de glóbulos blancos [129,150], masa mediastinal [128], masa de células leucémicas [150] y edad avanzada [129]. Sin embargo hasta el momento no se han encontrado diferencias entre las tasas de supervivencia entre aquellas con p16 wild-type y aquellas con p16 inactivado [129,148].

En Linfomas no Hodgkin se encontraron alteraciones del gen *CDKN2* en menor porcentaje. La transformación del linfoma folicular al de alto grado se ha asociado a mutaciones adicionales de oncogenes y genes supresores de tumor, como el gen *p53* [151]. Sin embargo aún no se ha

establecido la relación entre inactivación del gen *CDKN2* y la progresión tumoral. En linfomas de Burkitt no se han encontrado deleciones del gen *CDKN2* hasta el momento [152].

En Leucemia T Adulta (LTA), especialmente en los casos agudos el gen *CDKN2* puede estar frecuentemente inactivado [153] y podría estar involucrado en los estadios finales de la leucemogénesis de la LTA.

El gen *CDKN2* también ha sido investigado en otras neoplasias hematológicas. Aunque se halla inactivado en líneas celulares de origen mieloide, las alteraciones del gen *CDKN2* son muy raras en muestras de LMA y LMC. La inactivación del gen *CDKN2* puede estar asociada con la transformación blástica, pero restringida a la crisis blástica [154].

En LLC las alteraciones del gen *CDKN2* son menos frecuentes que en LNH. Se han reportado algunas mutaciones puntuales en un porcentaje muy bajo, cerca del 5% [155,156]. En la enfermedad de Hodgkin y en mielomas múltiples no se han encontrado alteraciones [150,158].

Las alteraciones del gen *CDKN2* contribuyen a la tumorigénesis de ciertas neoplasias hematológicas, y se caracterizan por: (1) Son anormalidades distintivas de las neoplasias linfoides. (2) El mecanismo principal de inactivación del gen *CDKN2* es la deleción homocigota. (3) Las inactivaciones del gen *CDKN2* ocurren en algunos casos sin una deleción detectable del 9p. (4) El gen *CDKN2* puede estar involucrado en la progresión de algunas neoplasias linfoides.

5. INMUNOGLOBULINAS

Croce *et al.* (1979) estudiando híbridos de células somáticas entre células de mieloma murino y linfocitos de sangre periférica humanos observaron la correlación entre la presencia o ausencia del cromosoma 14 y la formación de las cadenas pesadas humanas mu, gamma y alpha [159]. Smith *et al.* (1981) confirmaron la asignación de la familia de genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas al cromosoma 14 [160].

Los loci de las inmunoglobulinas se encuentran en tres cromosomas distintos, llevando los loci de las cadenas pesada, la liviana kappa y la liviana lambda. Se creía que cada región contenía uno o más loci para la región constante y un número mayor para la región variable de cada cadena de las inmunoglobulinas en particular. Davis *et al.* (1980) demostraron que la cadena pesada de las inmunoglobulinas contiene tres segmentos génicos, V(H), J(H) y C(H), análogos a los 3 segmentos de los genes de la cadena liviana y que al menos 2 eventos recombinatorios ocurren durante la diferenciación de la célula B productora de anticuerpos [161]. En seres humanos, la familia de genes de las inmunoglobulinas posee, comenzando por el extremo 5', 250 o más genes variable, 5 genes J (4 son activos), al menos 10 genes D (por diversidad) y los genes para las regiones constantes mu, delta, gamma, epsilon y alpha de las cadenas pesadas de IgM, D, G, E y A, respectivamente. De acuerdo al dogma vigente en 1981, un gen de una cadena pesada H completa está formado por como mínimo 2 tipos de recombinaciones: (1) la recombinación entre un segmento variable V(H) dado, un segmento de unión J(H) y un segmento de diversidad D que forman una región génica V y (2) un cambio (switch) de clase a un gen C(H) particular comenzando con mu y haciendo un posterior cambio (*shifting*) con cualquiera de los otros genes. Klein (1981) encontró que los tumores derivados de células B (mieloma murino y linfoma de Burkitt y leucemia linfoblástica aguda de células B) poseen patrones anómalos de síntesis de inmunoglobulinas que correlacionan con el tipo de aberración cromosómica [162]. Lenoir *et al.* (1982), quienes trabajaron con un número mayor de variantes de translocaciones de linfomas de Burkitt, realizaron observaciones similares [163].

Para cada una de las cadenas de las inmunoglobulinas (pesada, lambda y kappa), se encuentran separadamente los 'genes' para las regiones constante, variable, J y D. Se los puede considerar

a cada uno de los tres como un supergen y al ADN que codifica para los segmentos C, V, J y D como exones de ese supergen. Los genes de las inmunoglobulinas se hallan en una región cromosómica con una alta frecuencia de roturas asociadas a reordenamientos cromosómicos, que ocurren espontáneamente en cultivos de linfocitos normales y en ciertas neoplasias.

Hofker *et al.* (1989) determinaron el mapa físico completo de la región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas por medio de la electroforesis en campos pulsados [164]. Los genes de esta región se encuentran en un segmento de 300 kb. En ambos, ratón y humano el orden es 5' --IGHM--IGHD--IGHG--IGHE--IGHA--3'.

El '*locus*' de la región constante de la cadena pesada presenta una organización en niveles múltiples de homología interna, sugiriendo una historia evolutiva compleja con eventos de duplicación repetidos. La inestabilidad génica de la región es subrayada por las observaciones de deleciones y duplicaciones originadas probablemente por eventos de crossover desiguales. Bottaro *et al.* (1989), determinaron el siguiente mapa por electroforesis en campos pulsados de esas deleciones: --mu-5 kb-delta--gamma-3--26 kb--gamma-1--19 kb--psi-epsilon--13 kb--alpha-1--?60 kb--psi-gamma--?40 kb--gamma-2--18 kb--gamma-4--23 kb--epsilon--10 kb--alpha-2-- [165].

Clonalidad B o T

Los linfocitos B y T normales pueden expresar un repertorio virtualmente ilimitado de anticuerpos y especificidades del receptor de las células T. Esta diversidad es posible debido a variaciones en el armado de las inmunoglobulinas y del receptor de las células T [166-175].

Los genes discontinuos que codifican para regiones variables de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas sobrellevan reordenamientos somáticos del ADN durante la diferenciación de las células madres pluripotenciales (stem cells) en linfocitos B [166,167]. En los genes de las cadenas alfa, beta, gamma y delta del receptor de las células T (TCR) ocurren reordenamientos similares durante los estadios tempranos de la diferenciación de los linfocitos T [168-170]. Dado el gran número de reordenamientos posibles, la estructura de los genes de las inmunoglobulinas o del TCR es virtualmente única para cada linfocito B o T.

Los análisis del ADN por Southern blot de neoplasias linfoides humanas mostraron que las células tumorales de neoplasias individuales contienen generalmente un patrón genético único de reordenamientos de las inmunoglobulinas o del TCR, con variaciones en la estructura de estos reordenamientos de tumor en tumor [176-179]. Estos análisis confirmaron el origen monoclonal de estos tumores y demostraron que el análisis por Southern blot puede detectar proliferaciones de linfocitos que comprenden hasta un 1% al 5% del total de células en la muestra. Como la estructura de los genes reordenados varía en cada célula, el ADN de proliferaciones policlonales de linfocitos no contiene reordenamientos específicos detectables [177,178].

Una ventaja de los ensayos de reordenamientos génicos es que se puede establecer la monoclonalidad de desórdenes linfoproliferativos en ausencia de marcadores fenotípicos celulares, como por ejemplo la expresión de las cadenas livianas kappa y lambda. Estos ensayos han sido utilizados para establecer el origen celular B de ciertos tumores linfoides humanos. Así se han encontrado LLA no-B no-T, leucemia de células vellosas, crisis blásticas de LMC y ciertos linfomas. Sin embargo, estos reordenamientos no son específicos de las células B porque también se han descrito en leucemias de células T [180] y leucemias agudas no linfoblásticas [181]. La cadena beta del receptor de las células T se reordena en líneas celulares T y en algunos tumores de células T [174,175,178,182].

6. EL RECEPTOR T

Si bien los estudios iniciales a nivel molecular en las LLA confirmaban una estrecha correlación entre fenotipo inmunológico y los reordenamientos genéticos que codifican para la cadena pesada y liviana de las inmunoglobulinas en las LLA con linaje B y para el receptor T (cadenas β , γ y δ) en las LLA con linaje T, se demostró posteriormente que las LLA con fenotipo B en un alto porcentaje (29-56%) pueden presentar simultáneamente reordenamientos genéticos del receptor T y viceversa (17%). Más aún, las leucemias con linaje no linfocítico también pueden presentar reordenamientos genéticos de las inmunoglobulinas y/o del receptor T (11%) [183].

Estos hallazgos demuestran que el linaje celular de las leucemias no se puede establecer solamente a través de la determinación de los reordenamientos genéticos de las inmunoglobulinas y del receptor T, siendo no válido para fines de clasificación. Sin embargo, el hecho de que la leucemia sea la expresión clonal a partir de unas pocas células, el hallazgo de un reordenamiento genético, ya sea de las inmunoglobulinas o del receptor T en una leucemia, nos permite determinar clonalidad celular. Por lo tanto conociendo el reordenamiento genético de la leucemia en el momento del diagnóstico, mediante técnicas moleculares que permiten amplificar el reordenamiento genético observado inicialmente, teóricamente es posible monitorear la enfermedad mínima residual [184].

Cadena gamma del Receptor T

En 1984 buscando genes que codificaran para el receptor de las células T, Saito *et al*, identificaron en las células T otro gen similar al de las inmunoglobulinas y lo llamaron gamma. El producto del locus gamma reordenado es la cadena gamma, que es expresado junto con la cadena delta en la superficie de un subset de los linfocitos T [185]. Más tarde se identificó la cadena gamma como parte del heterodímero gamma-delta, asociado con el CD3 en la superficie de los linfocitos T periféricos y timocitos CD3+/CD4-/CD8- [186-8]. Aunque algunas células gamma-delta (+) presentan actividad citolítica, su función precisa aún no se ha dilucidado.

El mapeo del locus del receptor de las células T gamma (TCRG) fue realizado en el cromosoma

7 por hibridización con un panel de células híbridas [189]. Por hibridización *in situ* fue localizado en 7p15-p14 [190-191]. El locus TCRG comprende 2 regiones constantes separadas por 16 kb y esas dos regiones pueden sufrir reordenamientos, deleciones del gen C-gamma-1 que acompañan los reordenamientos del gen C-gamma-2 [192]. Esos reordenamientos se observaron en todos los tipos de células T estudiadas, evidenciando que el gen TCRG es un excelente marcador de clonalidad en leucemias T y en linfomas.

Lefranc *et al.* (1986) demostraron que el gen C-gamma-1 posee 3 exones, mientras que el gen C-gamma-2 posee 4 exones incluyendo un segundo exón duplicado [193]. Otros autores demostraron que la cadena humana gamma puede estar unida a la delta con o sin puentes disulfuro. Para ambos genes C-gamma-1 y C-gamma-2 existen variantes alélicas [194-95].

Strauss *et al.* (1987) estimaron por electroforesis de campos pulsados que el locus gamma abarca 160 kb [196]. Lefranc *et al.* (1986) clonaron 2 segmentos de unión (joining), J1 y J2 y 2 genes variables y, subsecuentemente, describieron 9 genes variables gamma de células T que cayeron en 2 subgrupos basados en su secuencia nucleotídica [193]. Un subgrupo (V-gamma-I) contiene al menos 8 genes, 4 genes activos (V2, V3, V4, V8) y 4 pseudogenes. El gen V-gamma-9 es el único miembro del subgrupo V-gamma-II. Lefranc *et al.* (1986) también demostraron que no había mutaciones somáticas o segmentos D en el locus TCRG y que la variabilidad está restringida a la región de diversidad N [197].

Forster *et al.* (1987) identificaron 2 genes variables nuevos, V10 y V11, miembros de los subgrupos V-gamma-III y V-gamma-IV, respectivamente, un gen adicional, V5 (que pertenece al subgrupo I) y 2 pseudogenes, VA y VB (que no pertenecen a ninguno de estos subgrupos). También demostraron que los tamaños de los fragmentos reordenados *Bam*H1, *Hind*III y *Eco*R1 detectados por hibridización con la sonda J1, pH60, permiten la identificación de un gen V reordenado con J1 o J2. Esta asignación inequívoca provee una manera sencilla de determinar V-gamma y es clínicamente útil para determinar la clonalidad de las células en leucemia y linfomas [198].

Quertermous *et al.* (1987), Huck y Lefranc (1987) y Tighe *et al.* (1987) secuenciaron los segmentos de unión JP1 y JP2 [199-201]. Huck y Lefranc (1987) mostraron que se puede identificar los reordenamientos de segmentos adicionales JP1, JP y JP2 por hibridización del

digesto de *KpnI* con pH60, demostrando que una única sonda puede detectar todos los reordenamientos gamma [200]. Más tarde se comprobó que la mayoría de las células gamma-delta (+) de sangre periférica expresan una cadena gamma V9-JP-C1. Finalmente, Lefranc *et al* (1989) resumieron la organización de la región variable del TCRG, las 14 regiones variables se localizan *upstream* y comparten 2 genes C- γ . El orden de los subgrupos es 5'--V- γ -I--VA--V- γ -II--V- γ -III--VB--V- γ -IV--C- γ --3'; el orden de unión génica es: 5'---TRGV1, V2, V3, V4, V5, V5P, V6, V7, V8, VA, V9, V10, VB, V11, JP1, JP, J1, C1, JP2, J2, C2--3'- [202].

Ghanem *et al.* (1989) demostraron un polimorfismo en el repertorio de los genes V- γ -I, el número de genes V- γ -I varía desde 7 (debido a la delección de V4 y V5) a 10 (debido a la inserción de un gen V adicional, V3P, entre V3 y V4) [202]. Lefranc *et al.* (1989) mostraron que todos los genes V- γ se esparcen en 100 kb y demostraron concomitantemente con Fox *et al.* (1989) que el gen variable más próximo al 3' (V- γ -11) está separado por 16 kb del segmento de unión más próximo al 5' (JP1); de esta manera, todo el locus abarca alrededor de 160 kb [202,204].

Tycko *et al.* (1989) sospecharon que los fragmentos de unión intergénicos entre los diferentes genes de receptores antigénicos podrían ocurrir en tejidos linfoides normales humanos debido a la presencia de secuencias flanqueantes de los segmentos V-, D- y J- altamente conservadas heptámeros-nonámeros [205]. Detectaron reordenamientos quiméricos de genes del TCR gamma-delta en timo, sangre periférica y amígdalas. Estos productos quiméricos se generan probablemente por translocaciones cromosómicas y estos genes híbridos probablemente contribuyan a incrementar la diversidad dentro del repertorio del receptor antigénico. Los genes gamma y delta se hallan en los cromosomas 7 y 14, respectivamente. Las translocaciones cromosómicas balanceadas t(7;14)(p13;q11) se han observado con frecuencias de 10^{-3} a 10^{-4} en linfocitos de sangre periférica normal humana estimulados con fitohemoaglutinina [206-08]

En 1985 se encontró evidencia de reordenamientos somáticos de los genes de la cadena gamma en células de leucemias T. Los genes de las 2 regiones constantes se localizan en 7p15; región involucrada en reordenamientos cromosómicos en células T en pacientes con ataxia-telangiectasia [190]. En las células T de pacientes con ataxia-telangiectasia, Stern *et al.* (1989) observaron un reordenamiento inv(7)(p14q35). La caracterización molecular de esta inversión mostró que un punto de corte ocurría en la región variable del TCRG, lo cual es

consistente con la localización en 7p14 [209].

--

Kaufmann (1996) revisó la función de las células T gamma/delta [210]; el mayor caudal de conocimientos acerca de las células T proviene de las alpha/beta. A diferencia de estas células T alpha/beta específicas para péptidos antigénicos presentados por productos génicos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, las células T gamma/delta reconocen directamente proteínas, e incluso fosfolípidos no proteicos. De esta manera, los 2 tipos de células T reconocen antígenos de manera distinta y así moderan el dogma de reconocimiento exclusivo por las células T a través del péptido-MHC. El rol de las células T gamma/delta en la inmunidad antimicrobiana está claramente establecido. La permanencia de las células T gamma/delta en tejidos epiteliales y su movilización rápida en respuesta a las infecciones son consistentes con actividades regulatorias bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Kaufmann (1996) observó que aunque estas células sean una fracción muy pequeña de las células T, tienen funciones específicas [210].

El análisis molecular de los reordenamientos de los genes del receptor T representa una herramienta diagnóstica importante en pacientes con desórdenes linfoproliferativos. La investigación de los reordenamientos de la cadena gamma del TCR por PCR se basa en la simplicidad estructural del gen de la cadena gamma del TCR. Durante la recombinación se genera un único reordenamiento por linfocito, lo que representa un marcador excelente de clonalidad en pacientes con desórdenes linfoproliferativos. Aunque los genes TCRG se reordenan en todas las células T, sólo se expresan en un pequeño grupo de las mismas [195]. Cuando se produce el reordenamiento se puede reconocer por Southern blot una estructura de ADN distinta a la de la línea germinal. Esto ha sido utilizado para investigar linaje y clonalidad en neoplasias hematológicas.

La mayoría de las LLA-T y muchas LLA comunes poseen reordenamientos en el locus TCRG que involucran regiones variables del subgrupo V γ 1 [37,211-13]. En general, los métodos basados en PCR para investigar los reordenamientos de los genes del receptor T utilizan primers oligonucleótidos consenso complementarios a secuencias nucleotídicas altamente conservadas en los genes de las cadenas variables V de la familia V- γ -1 (V1-V8) y de los segmentos de unión J1 y J2 [184,214-219]. Esta aproximación se limita a los reordenamientos de los genes V del

primer subgrupo.

Utilizando la técnica de PCR para el TCRG desarrollada por Taylor *et al.* hemos caracterizado las muestras leucémicas de LLA [184]. Este método amplifica los fragmentos V-J del locus TCRG V γ I reordenado. De esta manera se puede visualizar fácilmente el fragmento de 400 bp amplificado. Hemos demostrado que esta estructura ocurre en una alta proporción de las LLA a su presentación. Es posible también determinar el subtipo de V γ por análisis de restricción de los productos de PCR sin la necesidad del Southern blot. Además se podría realizar un seguimiento de los marcadores moleculares durante el curso del tratamiento y así investigar la evolución clonal y la enfermedad mínima residual.

Para confirmar nuestros resultados hemos recurrido a un sistema de PCR Multiplex con primers específicos para los genes TCR γ subtipo V γ I: V2, V3, V4, V8 y V9 [220] y para los J: JGT12 (J1 y J2), JGT3 (J3) y JTG4 (J4) [221]. En aquellos casos negativos para estos reordenamientos se podría tratar de las otras familias de V γ . Para ello se utilizan los primers V5 (V γ I), V9 (V γ II), V11 (V γ III) y V12 (V γ IV) y los mismos primers J. Estas últimas familias se expresan en un porcentaje muy bajo dentro de las V γ .

Hipótesis de trabajo

En función de los antecedentes descriptos, se presenta una síntesis del marco conceptual en el que han de enunciarse las hipótesis de trabajo

Debido a la existencia de alteraciones genéticas a nivel de los cromosomas 9, 7 y 14, resulta de interés analizar los niveles de proteínas y DNA del gen del Interferón, p16 (dentro del cromosoma 9) y los reordenamientos de la cadena γ del receptor T (cromosoma 7) y de las inmunoglobulinas (cromosoma 14).

Sobre la base de estas consideraciones se enuncia el siguiente plan de trabajo:

- 1 Determinar la producción de IFN en las LLA
- 2 Determinar deleciones de los genes del IFN y p16 en las LLA.
- 3 Detectar reordenamientos VDJ en la cadena pesada de las inmunoglobulinas en las LLA B y T.
- 4 Detectar reordenamientos γ TCR en LLA T y B

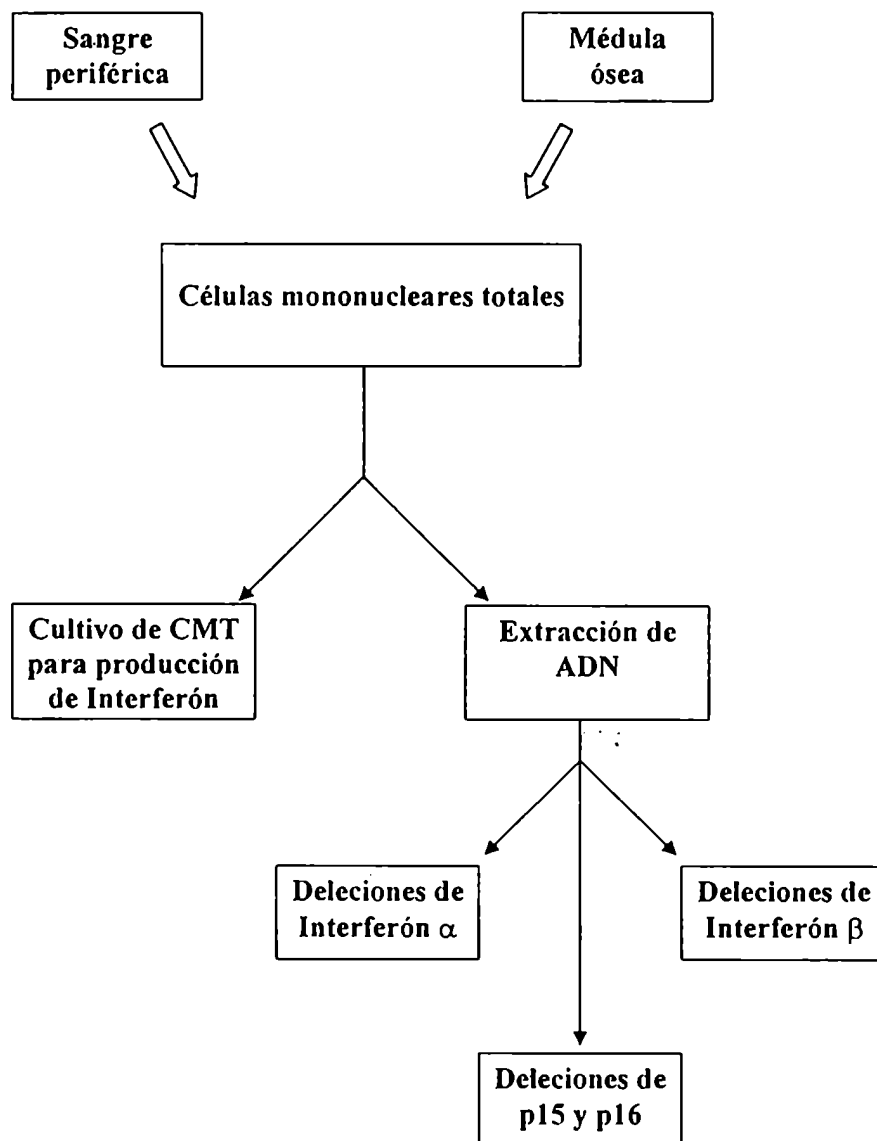
Al haberse constatado que los reordenamientos génicos de los receptores T y de los genes de las inmunoglobulinas pueden ser indicadores de clonalidad se proyectó investigar en LLA los hallazgos con el TCR y/o IgH.

Plan de Trabajo

Con el fin de responder a lo enunciado se establecieron 2 etapas principales.

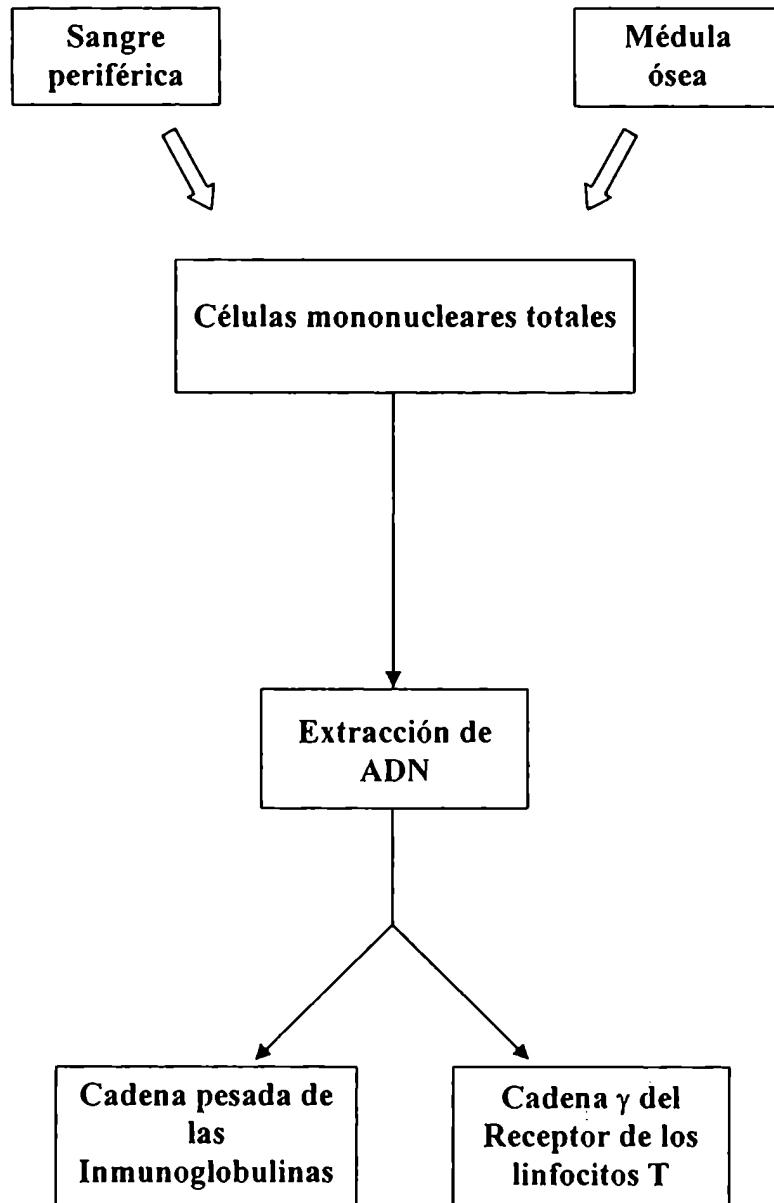
Capítulo 1: Estudio del sistema *IFNA* en células de LLA y el gen supresor de tumor *p16*.

En esta etapa se llevaron a cabo estudios sobre la producción espontánea de interferón en controles y pacientes con LLA y LMA y se probó un sistema de inducción utilizando 2 estímulos distintos. Se verificó la frecuencia de deleciones de interferón α , β y el gen supresor de tumor *p16*, y *p15*.

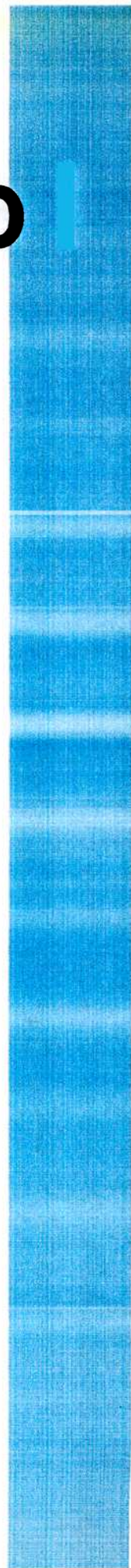


Capítulo 2: Estudio de las cadenas pesadas de las Inmunoglobulinas y de los receptores T γ en LLA

En esta etapa se llevaron a cabo estudios sobre los reordenamientos de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y la cadena γ y del receptor T en LLA.



capítulo 1



CAPÍTULO 1

A. PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN

Introducción

El interferón α es producido por los leucocitos, fundamentalmente linfocitos y monocitos. Esta citoquina posee dos actividades biológicas importantes: antiviral e inmunomodulatoria. En relación a su actividad inmunomodulatoria se destaca su capacidad antiproliferativa. El interferón α ha sido empleado terapéuticamente como antiproliferativo en neoplasias hematológicas, sarcoma de Kaposi y hepatitis crónica, con un efecto depresor de la médula ósea. Como es bien conocido, la leucemia es una proliferación descontrolada de un clon celular del sistema hematopoyético que se encuentra detenido en un estadio de la diferenciación celular. Dado que la fuente del interferón α son los leucocitos, se postuló que la malignización de los mismos podría deberse a alguna falencia génica, transcripcional o post-transcripcional en la producción fisiológica del interferón α .

Objetivos

Estudiar la producción de Interferón α por los blastos de LLA y su relación con los diferentes inductores.

Plan de trabajo

Estudio del sistema IFNA en células de LLA.

Para determinar la producción de IFN α en las LLA se procedió a cultivar CMT de pacientes con LLA y medir su producción de IFN mediante la inducción de la producción del mismo con el agregado de virus Sendai y/o interferón.

Materiales y Métodos

Pacientes y toma de muestras

Se estudiaron muestras (obtenidas entre 1991 y 1996) de punción aspirativa de médula ósea o de sangre periférica. Estas últimas se utilizaron cuando la aspiración de médula ósea no pudo ser posible ya sea porque la aspiración era dificultosa o porque la punción medular lograba escaso material.

Tanto para el aspirado de médula ósea como para la obtención de sangre se utilizó heparina como anticoagulante.

Las muestras se obtuvieron a partir de 70 pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda que fueron remitidos a nuestro laboratorio (Sección de Inmunología Oncológica del Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano Castex" Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, y Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan"). Las muestras consideradas como controles se obtuvieron en las mismas instituciones fueron: a) pacientes con LMA; b) dadores de sangre normales.

La edad de los pacientes tuvo un rango entre 0 y 80 años, que se observó en LLA T, B y LMA, sin que las diferencias entre los grupos analizados fueran significativas.

Controles Normales

Se estudió un total de 22 controles normales, 13 varones y 9 mujeres cuyas edades estaban comprendidas entre 18 y 61 años; las muestras de sangre se obtuvieron a partir de los bancos de sangre del Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano Castex" Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, y del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan".

Obtención de células mononucleares

Se utilizaron entre 1 y 3 ml de aspirado de médula ósea, o en su defecto 10-20 ml de sangre periférica. El porcentaje de blastos respecto de la población celular en la sangre utilizada,

siempre superó el 80%. Los blastos en ambos casos fueron separados mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque ($\delta=1077$). La cantidad de células por volumen de muestra se determinó por conteo utilizando microscopía óptica, con cámara cuentaglobulos (Neubauer modificada). La viabilidad celular se verificó por el método de exclusión de un colorante vital (azul tripan).

Estudios de poblaciones celulares

Con el objetivo de determinar el fenotipo inmunológico de los individuos se estudiaron poblaciones linfoides y no-linfoides. Para ello se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia indirecta. mientras que la determinación de los distintos antígenos de superficie se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos; para la identificación de estos últimos se utilizó un anticuerpo policlonal anti IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (provisto por Kallestad, Austin, Texas).

La identificación de los linfocitos B se realizó por inmunofluorescencia directa; para ello, se utilizó la fracción F(ab)₂ de inmunoglobulina de cobayo anti Ig humana, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (provisto por Kallestad, Austin, Texas).

Se evaluaron los siguientes antígenos:

Antígenos evaluados más frecuentes en las LLA:

CD1, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD13, CD19, CD33, CD34

Antígenos no clasificados por el Comité de Nomenclatura de Antígenos Leucocitarios (no en "clusters"):

HLA-DR, Mieloperoxidasa

Valores normales

La determinación de los valores normales para cada uno de los marcadores mencionados constituye un problema importante en muchos laboratorios, ya que cada proteína de las utilizadas tiene una expresión normal en algún tipo celular, incluso con frecuencia en médula ósea.

Adicionalmente se presenta el problema de la contaminación de los aspirados de médula ósea con sangre periférica. Los criterios para establecer los valores normales fueron:

a) Para los antígenos con expresión extramedular pero que incluye sangre periférica, se requirió su detección como población dominante (superior al 25% de las células medulares, sin otra población equivalente en tamaño) y, de preferencia, con indicios indirectos de clonalidad (por ejemplo, expresión preferencial de una cadena liviana de Ig o detección simultánea de dos marcadores de linfocito T mutuamente excluyentes); este fue el criterio aplicado a los marcadores T maduros (CD3, CD4, CD5, CD8), e inmaduros (CD7) y también para los marcadores B maduros (expresión de Ig de superficie).

b) Para los antígenos con expresión normal en médula, pero en muy bajo porcentaje, se requirió su expresión como población dominante, con un fenotipo consistente. El mejor ejemplo es la determinación de marcadores pre-B (expresión de CD10 solo, o de CD19 o CD20 en ausencia de Ig de superficie).

c) Para los antígenos de expresión normal, en valores relativamente importantes en médula ósea, se adoptó el criterio de tomar los valores máximos presentados usualmente en la literatura como límite superior de normalidad. Debido a la imposibilidad de obtener muestras de médula ósea normales para estudiar los antígenos, se utilizó como criterio de determinación de rangos normales datos provenientes de una amplia búsqueda bibliográfica realizada a tal fin. Los límites considerados normales varían para cada marcador (10% para CD14 o CD15; 35% para CD33, etc).

d) Por último, la expresión de HLA-DR es normal en tantas series y estadios de diferenciación diferentes al que sólo se le asignó valor cuando acompañaba otro marcador en la forma esperada para algún estadio característico (por ejemplo, asociado a CD10 para pre-B, o a CD14 para estirpe monocitoide).

Inducción de la producción de interferón α

Las células obtenidas de los pacientes (o de los controles) se incubaron en microplacas de cultivo, (5×10^6 células/ml) en RPMI 1640 (GIBCO, EE.UU.) con glutamina 2 mM, 10% v/v de suero

fetal bovino (Bionos, Argentina). Se realizó una primer incubación con IFN- α (*priming*) en baja concentración, durante 1 h. El efecto del *priming* es incrementar la eficiencia de los inductores que se emplean a continuación, y es debido aparentemente a la capacidad del IFN- α (y también del IFN- γ) de incrementar la producción celular de Factor Regulador de Interferón I (IRF-I). A continuación se realizó el desafío con virus Sendai, que provee al ARNdc necesario para activar la síntesis de IFN- α , durante 18 h. Se centrifugaron los sobrenadantes en microcentrífuga, a 12.000 R.P.M. durante 30 minutos, descartando los desechos celulares y recuperándose los sobrenadantes con el interferón. Estos fueron conservados congelados a -20°C hasta el momento de medición de IFN- α .

Medición de la concentración de IFN- α

La técnica utilizada fue descrita por Pestka y modificada por Staehelin [222]. Esta técnica se basa en el empleo de anticuerpos monoclonales; para ésto se empleó un equipo comercial (Endogen, Bélgica) de enzimoimmunoensayo (ELISA). Las lecturas se efectuaron a 490 nm en un MicroElisa *reader* (Dynatech, EE.UU.). El rango de detección óptimo es de 10 a 10000 pg/ml y el conjugado para el revelado emplea peroxidasa de rábano.

Análisis estadístico

Estudio de la producción de interferón en CMT de pacientes con LLA

Se testearon la normalidad y homogeneidad de varianzas (homoscedasea) mediante los métodos de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett respectivamente. Posteriormente se realizó un análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis por rangos) para investigar similitudes entre los grupos [223]. Para diferencias intergrupos (contrastes múltiples por rangos) fueron realizadas pruebas no paramétricas entre los grupos de pacientes con LLA y los controles normales.

Estudio de la correlación entre las distintas variables independientes: edad, sexo, estimulación

Se realizó la prueba de correlación por rangos de Spearman con el objetivo de investigar la correlación entre la respuesta a las distintas estimulaciones teniendo en cuenta también el sexo

y la edad de los pacientes como variables independientes

Análisis de la función discriminante

Se realizó un análisis de la función discriminante [224,225] con el objeto de brindar una representación gráfica descriptiva y hallar una o más funciones que permitieran separar cuando fuera posible, a los pacientes con distintas formas de leucemia. Como primer paso se verificó qué variables presentaban colinealidad elevada (altos índices de correlación) para evitar utilizar en el análisis discriminante aquellas que pudieran estar brindando la misma información. Los grupos analizados estuvieron constituidos de la siguiente manera:

Control: (6) individuos sanos

Pacientes: individuos con LLA (21) subdivididos en tres grupos, debido a que uno de ellos presentaba un perfil de respuesta distinta, individuos con LMA (4) utilizados como controles.

Se utilizó como criterio de significatividad aquellos estadísticos de comparación con $p < 0.01$ debido a que la composición numérica varió entre grupos y a que las variables no presentaban una distribución normal.

Resultados

Producción de IFN- α por blastos de LLA

En una primera etapa se investigó la capacidad de los blastos de las LLA para producir interferón α , ya sea en forma espontánea o al ser inducidos con virus Sendai y/o con dosis subliminales de interferón α . Para ello estudiamos 21 LLA, 4 LMA y como controles positivos 6 muestras provenientes de células mononucleares totales de sangre periférica de sujetos normales; y como control negativo, células de la línea celular K-562 que presentan deleciones génicas en el brazo corto del cromosoma 9 y son incapaces de producir interferón α dado que carecen de los genes del mismo.

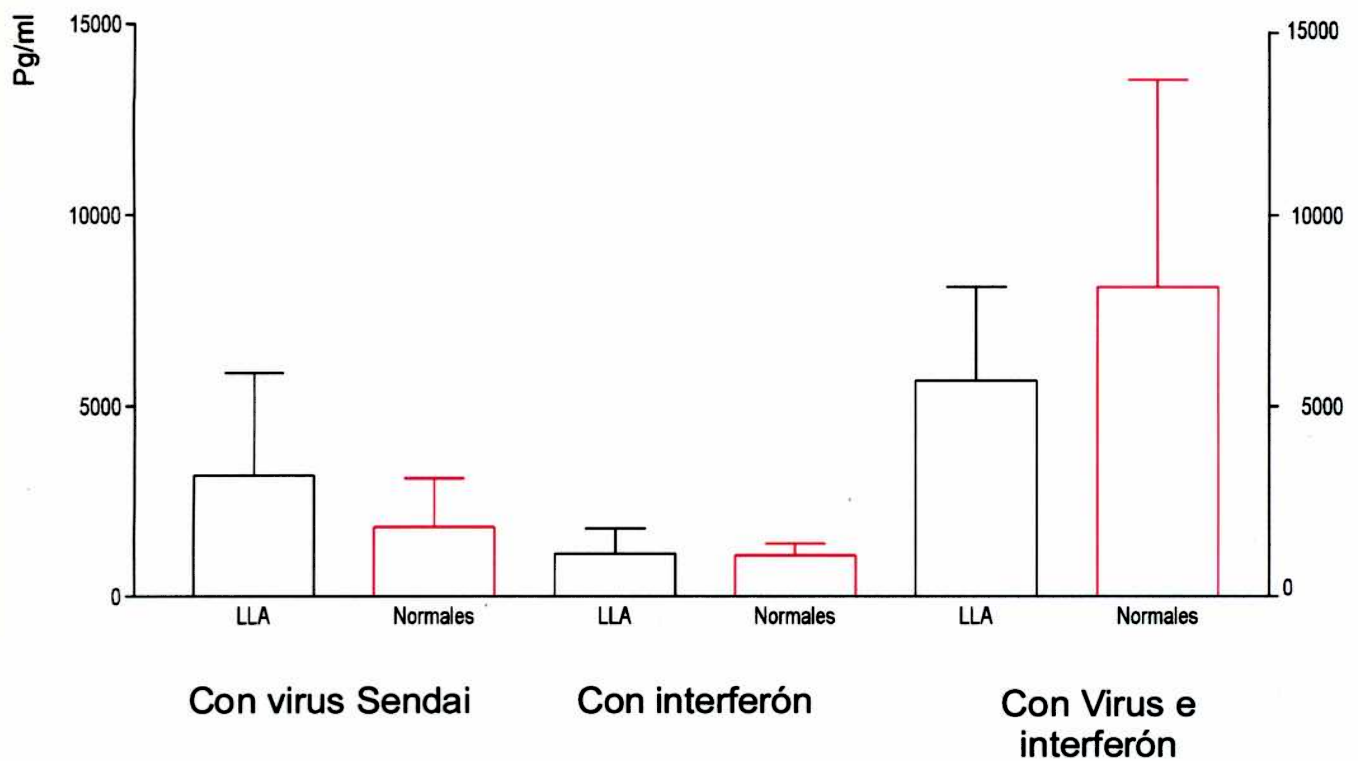
Se incubaron las células blásticas y las CMT normales con: 1) una dosis baja de interferón sólo, 2) virus Sendai solamente, como fuente de ARN de doble cadena, 3) un doble estímulo de virus Sendai e interferón y 4) sin ningún estímulo. La producción de interferón se midió entre las 18 hs y 24 hs post-inducción por inmunoensayo enzimático en el sobrenadante de los cultivos celulares.

No se observó producción espontánea de interferón en ninguno de los cultivos estudiados. Esto corrobora los resultados obtenidos por Pestka y colaboradores [110].

En las CMT de los controles hubo una escasa producción de IFN (<3500 pg/ml) cuando fueron estimulados con virus Sendai o IFN separadamente. Sin embargo, cuando los mismos fueron expuestos a ambos estímulos simultáneos, produjeron un incremento de la producción equivalente al doble de lo esperado si la respuesta fuera aditiva. Las concentraciones de interferón en los sobrenadantes oscilaron entre 2150 y 18400 pg/ml, con una mediana de 6976 pg/ml.

En las CMT de las LLA, en general, se observó un perfil de respuesta a los estímulos similar a los controles (Tabla 2). Tanto en los grupos normales como en las LLA tratados con el virus, se observó una gran dispersión de los datos, (Tabla 3, Figura 1). A fin de analizar los posibles factores responsables de la dispersión observada se analizaron las distintas respuestas obtenidas para cada LLA por separado, y aquellos valores que resultaron mayores o menores que la media

Figura 1. Producción de interferón α en cultivo de CMT de pacientes con LLA y controles normales



Los resultados se expresan en media + DS

± ESM o CV, fueron analizados como grupos separados.

Tabla 2: Medición del Interferón α por Inmunoensayo Enzimático (ELISA). (Valores promedio*)

Sobrenadantes de cultivos celulares inducidos con:								
Muestra	IFN	virus	IFN	virus	IFN	virus	IFN	virus
	-	-	+	-	-	+	+	+
Total LLA (n=21)	0		1124 ± 672,82** mediana: 1200 rango: (0-3400)		3183,14± 2683,93 mediana: 3000 rango: (0-8500)		5666.9 ± 2455,13 mediana: 6000 rango: (633-8850)	
Total LMA (n=4)	0		12177 ± 3317 mediana: 11149,5 rango: (9419-16990)		788,5± 256,63 mediana: 788,5 rango: (556-1021)		11249,5± 3911,24 mediana: 9844 rango: (8500-16810)	
K 562	0		0		1240		920	
Total Normales (n=6)	0		1170,83 ± 345,98 mediana: 900 rango: (880-1600)		1829,83± 1282,21 mediana: 1600 rango: (0-3400)		8117 ± 5428,76 mediana: 6976 rango: (2150-18400)	

* pg/5x10⁶ células

** media ± DS

Tabla 3: Dispersión de los valores de producción de interferón en cada grupo

Grupo	virus	interferón	virus e interferón
LLA T	6119	3315	2870
LLA B	10279	11452	7677
LLA B1	436	2907	414
LMA	2511	2110	2693
Control	7009	16471	6687

En esta **Tabla 3** se observan los valores de dispersión entre cada uno de los grupos analizados para

Figura 2. Producción de interferón α en cultivo de CMT de pacientes con LLA y controles normales

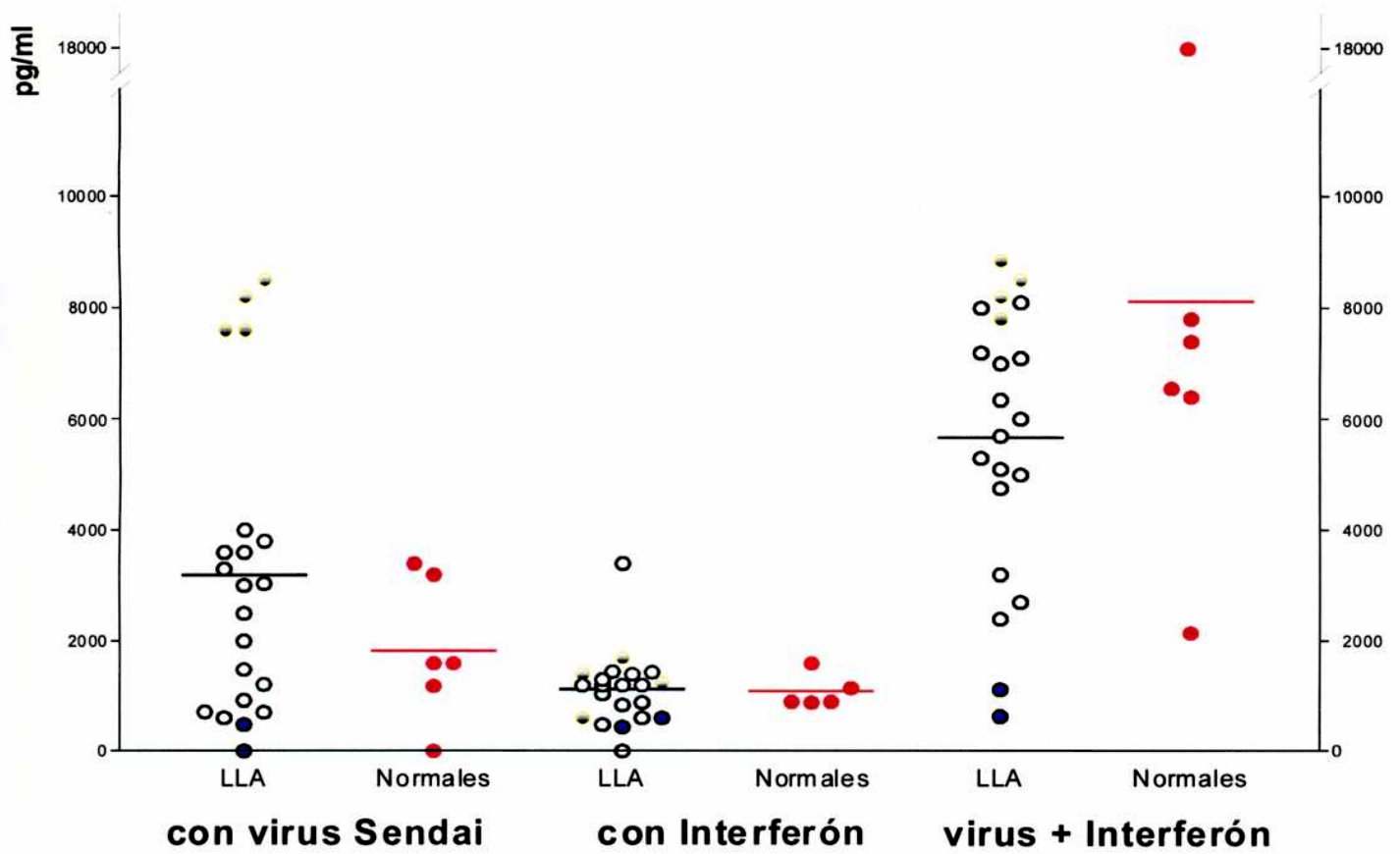


Tabla 1: Inducción de interferón. Medición de interferón α por inmunoensayo enzimático (ELISA).

Nº	Paciente	Diagnóstico	Material	Edad	Sexo	sin nada	con virus	con interferón	con virus e interferón		pg/5x10 ⁶ células
									muestra 1	muestra 2	Promedio 1 y 2
1	LLA 41	LLAT	m.o.	7	M	0	480	1440	8000	8000	8000
2	LLA 42	LLAT	s.p.	6	F	0	3800	1040	6300	6400	6350
3	LLA 64	LLAT	s.p.	12	M	0	2500	440	4500	5000	4750
4	LLA 51	LLAT	s.p.	18	M	0	920	1400	3200	3200	3200
5	LLA 104	B precursora	m.o.	1	F	0	705	1295	5600	5000	5300
6	LLA 92	B precursora	m.o.	2	F	0	8200	600	7600	8000	7800
7	LLA 79	B precursora	s.p.	4	M	0	3300	1200	6400	5000	5700
8	LLA 102	B precursora	m.o.	7	M	0	707	0	224	1042	633
9	LLA 44	B precursora	s.p.	10	F	0	3040	880	7000	7200	7100
10	LLA 80	B precursora	s.p.	12	M	0	3600	1200	6800	7200	7000
11	LLA 81	B precursora	m.o.	12	M	0	4000	1200	8200	8000	8100
12	LLA 83	B precursora	m.o.	12	M	0	7600	1700	9200	8500	8850
13	LLA 84	B precursora	s.p.	16	M	0	8500	1400	8500	8500	8500
14	LLA 100	B precursora	m.o.	17	M	0	1214	839	3435	1969	2702
15	LLA 39	B precursora	s.p.	18	M	0	0	480	1120	1120	1120
16	LLA 47	B precursora	s.p.	33	M	0	1480	3400	4800	5200	5000
17	LLA 90	B precursora	s.p.	33	F	0	7600	1240	8200	8200	8200
18	LLA 93	B precursora	m.o.	33	F	0	600	600	2400	2400	2400
19	LLA 78	B precursora	s.p.	53	M	0	3000	1200	6400	5600	6000
20	LLA 87	B precursora	s.p.	72	M	0	2000	600	4800	5400	5100
21	LLA75	indiferenciada	s.p.	5	F	0	3600	1450	7200	7200	7200
22	LMA 97	LMA	m.o.	11	M	0	1000	10890	8000	9000	8500
23	LMA 71	LMA	m.o.	26	M	0	1021	11409	10930	11390	11160
24	LMA 43	LMA	m.o.	55	F	0	577	16990	16640	16980	16810
25	LMA 77	LMA	m.o.	67	F	0	556	9419	7860	9196	8528
K562	K562	Línea celular				0	0	1240	1240	600	920
LB	LB 109	linf. Burkitt	m.o.	13	F	0	753	1598	4061	3432	3746.5
N1	N1	Normal	s.p.	18	M	0	3200	900	7200	7600	7400
N2	N2	Normal	s.p.	18	M	0	1600	1600	6400	6400	6400
N3	N3	Normal	s.p.	18	F	0	1600	900	2000	2300	2150
N4	N4	Normal	s.p.	20	M	0	3400	880	7600	8000	7800
N5	N5	Normal	s.p.	30	M	0	0	11470	7057	6047	6552
N6	N6	Normal	s.p.	40	M	ND	1179	ND	17260	19540	18400

s. p.: Sangre Periférica

m.o.: Médula ósea

cada una de las variables analizadas. Los valores más altos indican mayor dispersión.

Posibles causas de la dispersión en LLA:

A fin de dilucidar la causa de la dispersión observada analizamos cada una de las LLA por separado (**Figura 2**) y pudimos distinguir seis casos de LLA con un comportamiento disímil al de las CMT normales.

En 4 LLA estimuladas con el virus Sendai, la producción de interferón alfa fue inusualmente alta con valores superiores a los 7500 pg/ml; no se observó diferencias significativas entre ambos (con o sin interferón), asimismo, no se observó la misma respuesta en las CMT con interferón sólo (**Figura 2** sombreado rojo y **Tabla 1** casos 6, 12, 13 y 17). Otros dos pacientes con LLA mostraron valores muy bajos de producción de interferón alfa en todos los casos de estimulación ensayados (**Figura 2** sombreado azul y **Tabla 1** casos 8 y 15).

Se intentó evaluar la relación entre la variación de la producción de interferón α y el fenotipo celular (**Figura 3**) dado que existen distintos subtipos de LLA. Los pacientes estudiados presentaron tres subtipos de LLA: 4 LLA T, 16 LLA precursora B y 1 LLA indiferenciada. El comportamiento de las LLA T y la LLA indiferenciada fue similar al de los normales. En las LLA Precursoras B estuvieron incluidos los 6 casos con comportamientos disímiles en la producción de interferón con respecto de los normales, tanto las cuatro con una producción exagerada de interferón frente al virus Sendai como las dos LLA que no respondieron a ninguno de los estímulos estudiados.

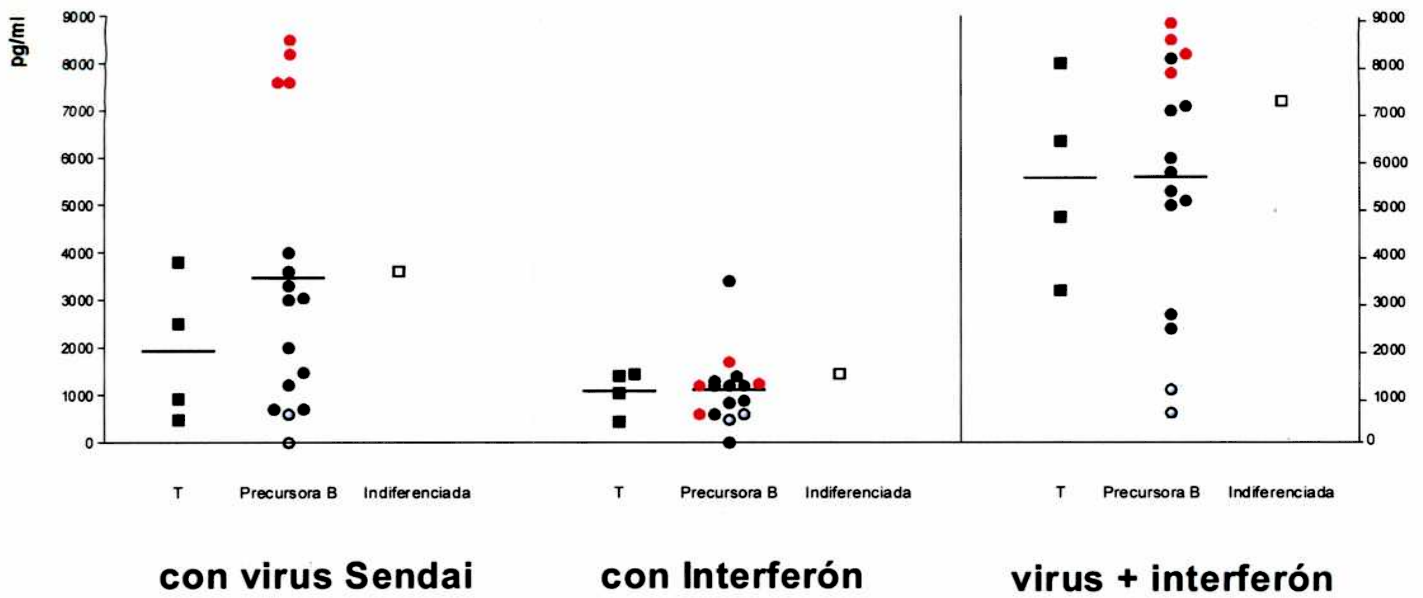
--

Producción en LMA:

Analizando los blastos leucémicos del linaje no linfoide, las 4 LMA estudiadas demuestran un comportamiento diferente al de las CMT normales y al de las LLA (**Figura 4**), con poca producción de interferón α frente al virus Sendai. En cambio con dosis subliminales de interferón α llegaron a valores muy altos, superando a los obtenidos con ambos estímulos juntos. Este hecho es contrario a la dicotomía observada en las 4 LLA mencionadas anteriormente donde el agregado de virus era el que aumentaba la producción de interferón.

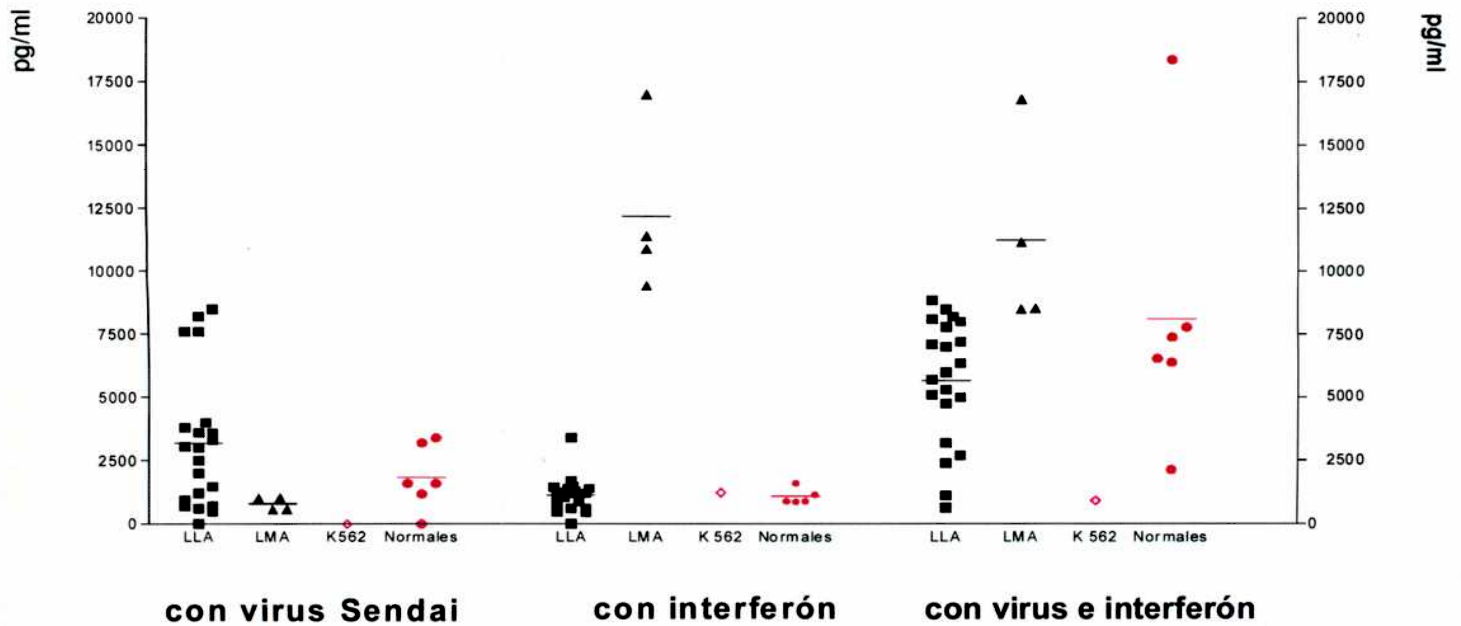
Las células de la línea celular K562 que posee deleciones en los genes del interferón, produjeron

Figura 3. Producción de interferón α en cultivo de pacientes con LLA según subtipo.



Los puntos expresan la cantidad de interferón α producido frente a cada estímulo

Figura 4. Producción de interferón α en cultivo de CMT de pacientes con LLA, LMA, la línea celular K562 y controles normales. Los resultados se expresan individualmente o como promedio (-) en cada caso.



niveles basales de interferón con todos los estímulos analizados, similar a dos de las LLA estudiadas (Figura 4).

Dado que las muestras de los pacientes estudiadas fueron obtenidas por distintas vías (algunas de sangre periférica y otras de médula ósea), se propuso estudiar si este diferente origen constituía una posible fuente de variación en la producción de interferón α . Una de las causas de variación podría ser la presencia de células normales en las muestras, principalmente en aquellas de sangre periférica. Para disminuir la influencia de células normales, siempre se estudiaron muestras cuyos porcentajes de blastos fueran superiores al 80% y en el caso de sangre periférica con un recuento leucocitario superior a los 50000/mm³. Se compararon los valores de interferón α según el origen de la muestra, y los estímulos empleados. Las muestras de médula ósea no difirieron con las de sangre periférica (Figura 5). Si se tiene en cuenta que siempre se cultivó el mismo número de CMT con un alto porcentaje de blastos en los cultivos, la contribución de las células no leucémicas en el caso de las LLA de sangre periférica debería ser despreciable; aún así el comportamiento de las LLA, ya sea proveniente de sangre periférica o de médula ósea, en general difiere de las CMT normales.

Análisis de la función discriminante

Se realizó un análisis discriminante en etapas en el que las variables incluídas fueron: sexo, edad, estimulación (c/u de ellas). Del análisis resultaron significativas las dos primeras funciones discriminantes (Raíz 0 y 1, $p < 0.001$ Tabla 4) que permitieron clasificar el 98,5% de los casos (Tabla 5). La primera función discriminante separó significativamente aquellos pacientes que presentaban LLA con valores altos de respuesta a la estimulación con virus Sendai del resto de los pacientes con LLA-B. También se observó que los pacientes con LMA formaban un grupo separado. La segunda función discriminante también formó una separación de grupos similar.

Figura 5. Producción de Interferón α en cultivo de CMT de pacientes con LLA según el origen de la muestra.

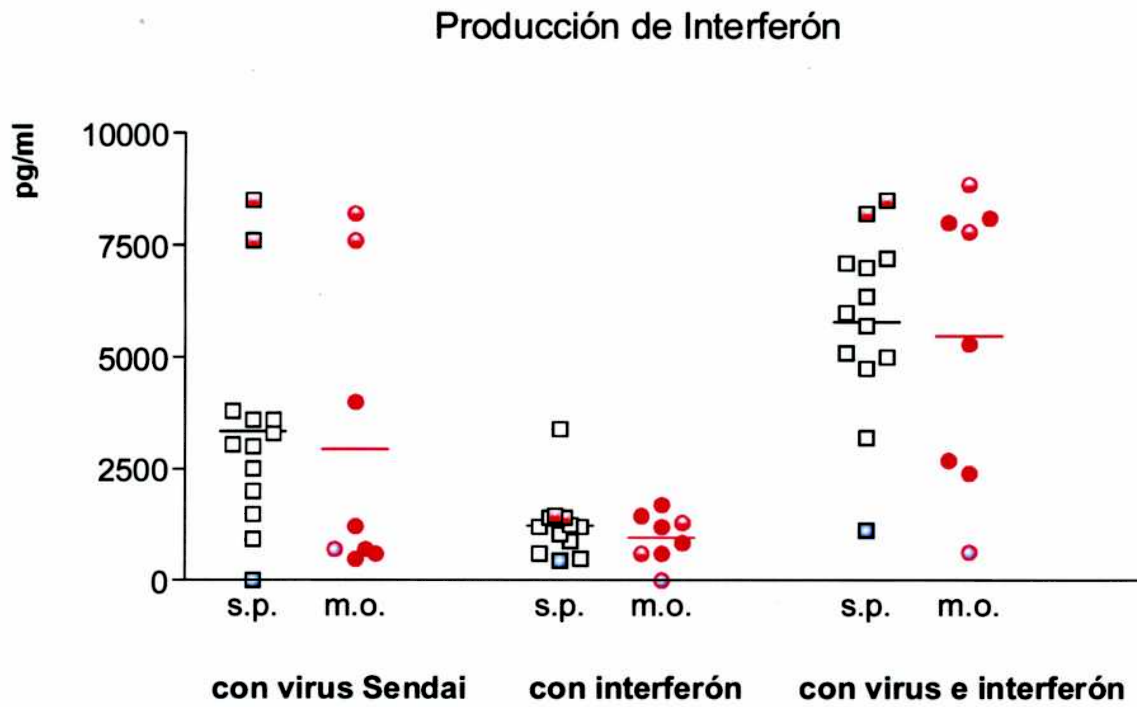


Tabla 4: Test de Chi² para las funciones sucesivas

Función discriminante	autovalor	Regresión Canónica	Wilks' Lambda	Chi ²	grados de libertad	nivel de significancia
primera	4,1265	0,8972	0,0455	77,2424	12	0
segunda	2,8943	0,8621	0,2333	36,3815	6	0,0000
tercera	0,1005	0,3022	0,9087	2,3935	2	0,3022

Tabla 5: Coeficientes estandarizados para variables canónicas

Variable	Funciones discriminantes		
	Primera	Segunda	Tercera
Virus	-0,9431	-0,5271	0,1674
Interferón	0,2190	-0,9398	0,4386
Virus e Interferón	0,2961	-0,1575	-1,0062
autovalor	4,1266	2,8943	0,1005
porcentaje acumulado	0,5795	0,9859	1,0000

La ubicación de los centroides para cada grupo se indica en la **Tabla 6** y se observa en la **Figura 6**

Tabla 6: Ubicación de los centroides en el análisis de la función discriminante

Grupo	Funciones discriminante		
	Primera	Segunda	Tercera
LLA T	0,2265	1,0746	-0,0408
LLA B	0,1100	1,0997	0,2380
LLA B1	-4,2336	-1,7597	-0,1752
LMA	2,6637	-3,1637	0,1507
Control	0,6757	0,3664	-0,5375

La función discriminante incluyó como variables significativas a la estimulación individual con virus y con interferón de todas las incluidas en el modelo **Tabla 7**.

Tabla 7: Resumen del análisis de función discriminante

Pasos: 3

Número de variables incluidas en el modelo: 3

Número de grupos estudiados: 5

Número de casos incluidos: 30

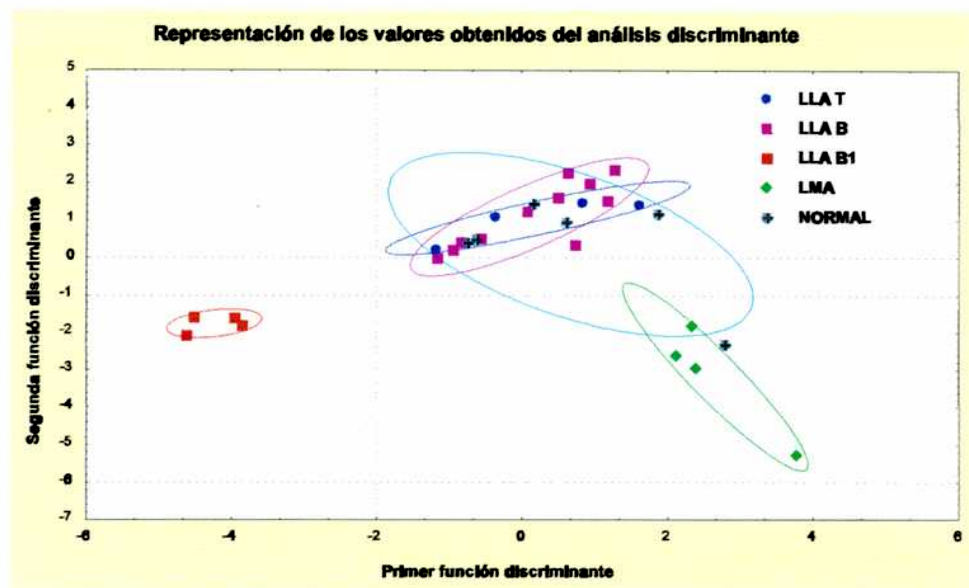
Wilks Lambda= 0,04552, F(12,61)= 11,286, p < 0,001

N=30	Wilks' Lambda	Lambda parcial	F de remoción	Nivel de significancia
Virus	0,2013	0,2261	19,6774	0,0000
Interferón	0,1244	0,3658	9,9709	0,0001
Virus e	0,5427	0,8387	1,1059	0,3776
Interferón				

Como se observa en la **Figura 6** el modelo permitió discriminar a los pacientes en tres grupos de respuesta.

De las variables incluidas en el modelo las estimulaciones con virus Sendai y con interferón mostraron ser las únicas significativas y las que mejor discriminaron entre los pacientes con las distintas formas clínicas en leucemia.

Figura 6. Análisis de la función discriminante: enfoque descriptivo de la respuesta de producción de interferón frente los distintos estímulos de interferón y virus Sendai. Las dos primeras funciones permitieron discriminar a los individuos en tres grandes grupos en el 98,5% de los casos. Se observa la respuesta exacerbada en uno de los controles normales.



Las funciones obtenidas a partir del análisis realizado no discriminaron las LLA T de las B ni de los controles.

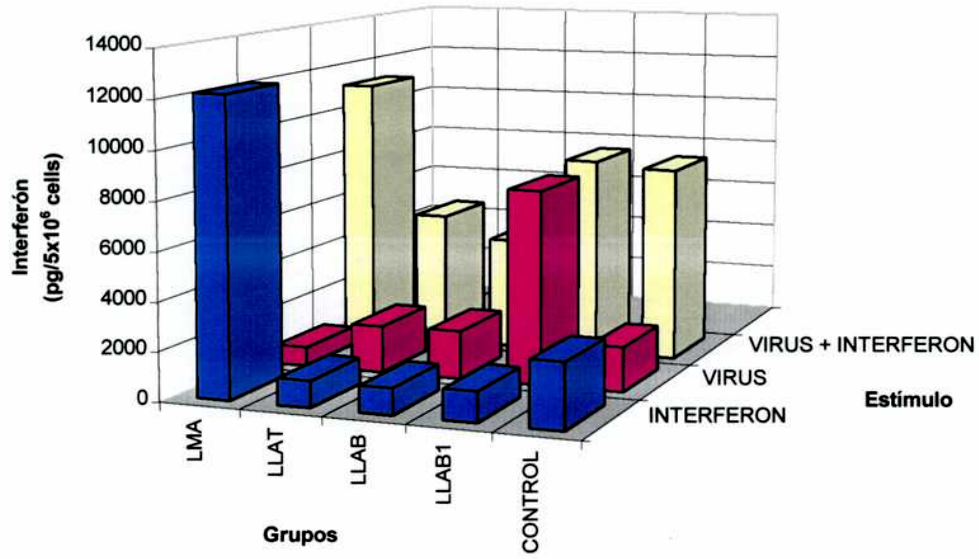
El análisis realizado no permitió discriminar a los controles sanos de los pacientes con LLA B y LLA T, pero sí permitió realizar una clara diferenciación de estos 3 grupos y la LMA así como de las del subgrupo B1 distintos. Y por otra parte diferenció claramente entre la LMA y la B1. En todos los casos estas diferencias fueron significativas ($p < 0.001$) (Ver **Tabla 8**).

En la **Figura 7** se esquematizan los promedios de cada caso en cada población analizada.

Tabla 8: Niveles de significancia entre-distintos grupos

Niveles de significancia					
	LLA T	LLA B	LLA B1	LMA	Control
LLA T		0,9734	0,0000	0,0000	0,5877
LLA B	0,9734		0,0000	0,0000	0,1670
LLA B1	0,0000	0,0000		0,0000	0,0000
LMA	0,0000	0,0000	0,0000		0,0001
Control	0,5877	0,1670	0,0000	0,0001	--

Figura 7: Producción de Interferón α en cultivo de CMT de pacientes con LLA, LMA y controles normales



Discusión

El análisis realizado permitió comprobar que, en general los pacientes con LLA no presentaron una disminución de la producción de interferón. Cabe destacar que este análisis permitió la confirmación como subgrupo a cuatro pacientes de LLA B que manifestaron una sobreproducción de interferón al ser estimulados.

Por el contrario, las LLA no presentaron una disminución en la producción de interferón; sin embargo, un subgrupo de LLA de tipo B manifestó una sobreproducción de interferón cuando eran estimuladas.

El análisis discriminante demostró que es posible encontrar un par de combinaciones lineales de variables que pueden discriminar a los pacientes con LMA y algunos tipos de LLA (LLA B1). Cabe destacar que dentro de esta combinación de variables las de mayor importancia fueron la estimulación de la producción con la doble inducción independientemente del sexo, el grupo etario y el origen muestral.

Por otra parte, si bien el objetivo planteado para el presente análisis fue descriptivo, los resultados obtenidos estimulan un estudio más complejo en el que se contemple un nivel de análisis estructural del interferón producido por CMT de pacientes con LLA. Asumiendo que estas alteraciones pudieran estar relacionadas con deleciones de genes relacionados con la producción de interferón se procedió a dar inicio a la segunda fase de la primer etapa (Parte B de este capítulo).

Conclusiones de la Sección A

En esta etapa se evaluó la relación entre la variación de la producción de interferón α y los distintos subtipos de LLA de acuerdo a su fenotipo inmunológico. Se analizaron tres subtipos de LLA: 4 LLA T, 16 LLA precursora B y 1 LLA indiferenciada. En las muestras de LLA T y la muestra de LLA indiferenciada el comportamiento fue similar al de los controles normales. Sin embargo, al analizarse las LLA precursoras B se encontraron 6 casos con comportamientos disímiles en la producción de interferón con respecto de los normales: cuatro de ellos con una producción exagerada de interferón frente al virus Sendai y otros dos que no respondieron a ninguno de los estímulos estudiados. Aunque cuando se analizó el total de las LLA pre B no se hallaron diferencias significativas con respecto de

los normales.

Estos hechos preliminares sugieren que los blastos leucémicos comprometidos al linaje B, que constituyen la mayoría de las LLA, pueden tener afectada la producción de interferón α .

- 1 El enfoque descriptivo del análisis discriminante llevó a concluir que la combinación de variables a) inducción con virus y b) inducción con interferón permite discriminar significativamente a las LLA de las LMA, sin embargo las LLA no se diferenciaron estadísticamente de los controles normales.
- 2 El planteamiento de un análisis de la producción de interferón con un objetivo decisional diagnóstico no tendría sentido dada la complejidad del método y su análisis estadístico.

Analizando de manera individual los resultados obtenidos en las LLA, es evidente que algunas LLA producen cantidades de IFN- α significativamente menores que el límite inferior de los normales; tal es el caso de las LLA denominadas 8 (LLA 102) y 15 (LLA 39) detalladas en la **Tabla 2** y en la **Figura 2**. En estos casos podría postularse la existencia de genes del interferón alterados que impidan la expresión normal del mismo; uno de ellos podría ser la delección génica del interferón. Con el objeto de analizar esta posibilidad, se diseñó la siguiente etapa experimental para analizar la existencia de delecciones en los genes del interferón.



B. DELECIONES DE LOS GENES DE INTERFERÓN Y P16

Introducción

El efecto depresor del interferón α sobre la función de la médula ósea en pacientes sin patología hematológica (hepatitis crónica, o sarcoma de Kaposi) o su utilización en neoplasias hematológicas como la leucemia mieloide crónica y algunos tipos de linfomas B y T, sugieren que el interferón α podría actuar como un gen supresor de tumor. A partir de esta propuesta, resultó de interés tratar de establecer la participación global del sistema del interferón en ellas; por ejemplo si se podía detectar una menor producción de interferón α , lo cual sugeriría algún grado de represión de sus genes, o bien una menor actividad biológica, que asociada a una producción normal sugeriría un defecto a nivel de sus receptores o en alguna etapa de transducción ulterior; luego se intentaría buscar una frecuencia real de deleciones o reacomodamientos de los genes del interferón α en leucemias agudas.

En los últimos años la búsqueda de nuevos genes supresores de tumor se desarrolló en las proximidades de los genes del cluster del interferón α . Recientemente, estudiando el ciclo celular, se localizó un nuevo gen supresor de tumor [116] que se encontró delecionado en algunas líneas celulares provenientes de tumores sólidos. Este gen fue denominado de varias maneras: *MTS1*, *p16^{INK4A}* o *CDKN2*, y se encuentra en el brazo corto del cromosoma 9, particularmente en la banda p21, centromérico y próximo al cluster de los genes del interferón α . Posteriormente se encontró en la misma zona cromosómica otro gen denominado *MTS2* o *p15^{INK4B}*. Dadas la proximidad de los mismos a los genes de los interferones de tipo I y la existencia de deleciones en las líneas celulares de origen maligno, sobre todo en aquellas de origen leucémico, se quiso analizar la existencia de deleciones en las LLA analizadas y si las mismas estarían relacionadas con las de los interferones.

Objetivos

Los objetivos de esta etapa consistieron en ver la frecuencia de deleciones de los genes de los interferones de tipo I en las LLA, y posteriormente su comparación con la de los genes supresores de tumor, *p15* (*MTS2* o *p15^{INK4B}*) y *p16* (*MTS1*, *p16^{INK4A}* o *CDKN2*).

Plan de trabajo

Determinar deleciones de los genes del IFN y *p16* en las LLA.

Para la detección de deleciones de los genes del interferón y de *p16* en LLA se realizó un Southern blot a partir de las muestras obtenidas con sondas para los distintos genes a analizar.

--

Materiales y Métodos

Extracción de ADN

Se utilizaron 3 métodos que se fundamentan en técnicas de extracción y precipitación. Inicialmente se utilizó el método de Maniatis modificado para extraer ADN a partir de 5 ml de sangre heparinizada [226]; como nos interesaban solamente las células mononucleares totales (CMT) se reemplazó los 5 ml de sangre por una cantidad equivalente de CMT (aproximadamente 2×10^6 CMT), el mismo consistía en una precipitación nuclear de material fresco (a partir de 30×10^6 células) en un buffer de lisis y extracción (45 ml de 0,32 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM Cl_2Mg y 1% Tritón X-100) 10 minutos a 2500 rpm, seguido de resuspensión en 5 ml de medio con isotiocianato de guanidina (4 M), acetato de sodio (0,25 M) y 42 μ l de β mercaptoetanol por 20 minutos, precipitación con un volumen de isopropanol 25 minutos a 2500 rpm y sucesivos lavados con etanol 70%. Finalmente las muestras se resuspenden en Tris-EDTA (TE). El segundo método fue similar al primero, pero precedido de la congelación de las células en nitrógeno líquido, luego del agregado de RPMI 1640, 20% de suero fetal bovino y 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) con pasajes graduales por 4°C, -20°C, -70°C, para su posterior extracción. Este se utilizaba en aquellos casos en que no se podía realizar la extracción con las células frescas.

Finalmente se utilizó un método más clásico; (Maniatis modificado): los blastos obtenidos de médula ósea o sangre periférica, en concentración de 10^7 cél/2 ml, fueron homogeneizadas durante una noche con proteinasa K (100 μ g/ml) en buffer PK (Tris-ClH pH 7,8 10 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,5% v/v) a 37°C. A continuación se realizaron sucesivas extracciones con 1 volumen de fenol (2 veces); fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1; y cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. En cada una de ellas se homogeneizó durante 10 minutos, seguido de precipitación de 10 minutos a 3000 RPM. Se extrajo luego la fase acuosa conteniendo el ADN, que fue precipitado con un volumen de isopropanol. Por último, se le extrajo el etanol 70% y una vez evaporado el alcohol se lo resuspendió en buffer TE. Este método, si bien requiere la utilización de tubos nuevos en cada paso fue el que dió mejores resultados, obteniéndose buena cantidad de ADN con un alto grado de pureza.

Digestión enzimática para Southern blot

Las muestras obtenidas a partir de la extracción fueron sometidas a digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Para la misma se utilizó 100 μ l de una solución de ADN (100 μ g/ml) que contenía albúmina sérica bovina (100 μ g/ml), espermidina (0,1 mM), el buffer provisto con cada enzima (**H** para *EcoRI* y **B** para *HindIII* (Boehringer Mannheim)). Se utilizaron 3 UI de cada enzima por cada μ g/ADN. La digestión se realizó a 37°C. En todos los casos el tiempo de digestión fue superior a las 4h y el tratamiento con cada enzima fue realizado independientemente. Como control conocido para ambas enzimas se realizó paralelamente una digestión del bacteriófago lambda (0.5 μ g del bacteriófago lambda en 5 μ l de la solución ya descrita). Como método de comparación se utilizó un minigel de agarosa con el material digerido y el ADN de fago Lambda precortado con *HindIII* (GIBCO-BRL) como control. Cuando la digestión no había sido completada se repitió la incubación con el agregado de enzima fresca.

Preparación de las muestras digeridas

Una vez completada la digestión, las muestras fueron purificadas nuevamente. Se agregó un volumen (aproximadamente 100 μ l) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó durante 10 minutos a alta velocidad (aproximadamente 12000 RPM en microcentrífuga). Se utilizó la fase superior y se la dejó precipitar durante una noche con 2 volúmenes de etanol frío y 0,1 volumen de acetato de sodio 0,3 mM a -20°C. El precipitado se separó por centrifugación a 4°C, durante 15 minutos a 12000 RPM. Se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se resuspendió en buffer TE (25 μ l); se le agregó colorante de carga concentrado (preparado 10 x, que consiste en glicerol 50% v/v, EDTA disódico 100 mM, SDS 1% p/v, azul de bromofenol 0,1% p/v) que sirve para monitorear la corrida. Se dejó desnaturalizar durante 10 minutos a 65°C. Se sembró en un gel de agarosa al 0,8% p/v la muestra y el control (5 μ g de ADN del bacteriófago Lambda digerido con *HindIII*).

Geles de agarosa

Se prepararon minigeles y geles de dimensiones convencionales (11 x 14 cm) de agarosa al 0,8%. Los

primeros fueron empleados para verificar la concentración del ADN, el grado de degradación de las muestras y la eficiencia de la digestión enzimática; los geles convencionales se utilizaron para realizar el Southern Blot (transferencia del ADN y posterior hibridización).

Minigeles:

Siembra: se sembraron 0,5 μg de ADN en buffer de colorante de carga; el volumen final de siembra fue de 7 μl .

Corrida: se realizó durante 30 minutos en buffer de corrida TAE (Tris base 40 mM, EDTA disódico 2 mM, acetato de sodio 20 mM, ácido acético glacial 29,6 mM, pH 8,0), con intensidad de 40 mA.

Tinción: una vez finalizada la corrida se tiñó el minigel con bromuro de etidio (aproximadamente 5 mg/ml) durante 15 minutos; se controló con luz ultravioleta que permite ver naranja en aquellos lugares donde se localiza el ADN.

--

Controles y marcadores de peso molecular: Según el propósito del minigel se utilizaron distintos marcadores de PM a saber: fragmentos del bacteriófago lambda digeridos con *Hind*III (GIBCO BRL), 1 Kb ladder (GIBCO BRL), pGEM DNA markers (Promega).

Geles convencionales:

La separación de los fragmentos de ADN digeridos fue llevada a cabo por electroforesis horizontal en geles de agarosa (generalmente al 0,8% o al 1%).

Siembra: el volumen final sembrado en cada pocillo fue de 33 μl .

Corrida: se corrió durante 18 h a 25 V con intensidad constante. Las condiciones restantes fueron similares a las empleadas en los minigeles.

Tinción: una vez finalizada la corrida se tiñó el minigel con bromuro de etidio durante 15 minutos. Si la digestión resultó buena a la luz ultravioleta se visualizó una mancha corrida de color naranja.

Controles y marcadores de peso molecular: como control se utilizó ADN proveniente de sujetos normales. Como marcador de PM se utilizaron fragmentos del bacteriófago lambda digeridos con *Hind*III (GIBCO BRL).

Transferencia del material en el gel a una membrana de nylon:

El ADN presente en el gel fue transferido a una membrana de nylon (Gene Screen Plus^{NR}) de la siguiente manera.

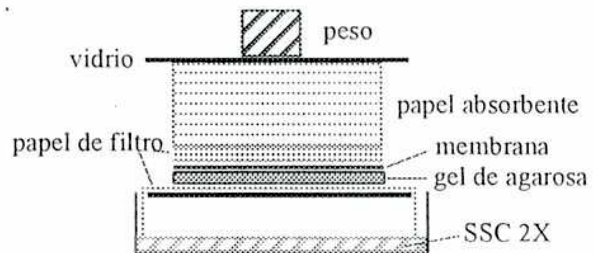
Desnaturalización y neutralización: Se desnaturalizó el ADN por inmersión del gel durante 90 minutos en una solución alcalina (NaOH 0,4 M, NaCl 0,6 M). Se lo neutralizó con una solución de NaCl 1,5 M en buffer Tris clorhídrico 0,5 M (pH 7,5).

Tratamiento de la membrana: Se cortó una membrana de nylon del tamaño de la superficie del gel a transferir. Se la sumergió durante 5 minutos en agua destilada y posteriormente 15 minutos en el buffer de transferencia (SSC 2X).

Transferencia: La transferencia se realizó en una solución salina citratada (SSC 2X), por capilaridad, hacia la membrana (preincubada durante 15 minutos en la misma solución) durante 16 h. Para ello se armó un dispositivo.

Lavados y conservación: La membrana fue lavada a continuación durante 1 minuto con hidróxido de sodio 0,4 M, luego durante 2 minutos con Tris 0,2 M (pH 7,5), ambas en exceso de solución salina citratada (2x) y por último, durante 5 minutos en solución salina citratada (2x).

Al secarse la membrana, se la expuso durante 2 h a 80°C; se la conservó a 4°C hasta el momento de la hibridización. El ADN quedó unido a la membrana de forma irreversible.



Preparación de las sondas radioactivas

La técnica utilizada fue "random primer". Esta técnica se basa en la utilización del fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* con el fin de incorporar [³²P]-dCTP a oligonucleótidos. El ADN utilizado fue en todos los casos un inserto de cDNA correspondiente al gen a buscar extraído de un plásmido; se desnaturalizaron 25 a 50 ng de este ADN mediante calentamiento a 95°C durante 7 minutos, tras lo cual se conservaron en hielo hasta la marcación, la misma se realizó

en un tubo Eppendorf con: dATP 2 μ l, dGTP 2 μ l, dCTP 2 μ l, "primadores aleatorios" 15 μ l, [³²P]dCTP 5 μ l (de Amersham, EEUU, radioactividad específica 3000 Ci/mmol, en concentración de 10 μ Ci/ μ l), fragmento de Klenow 2 μ l (2 unidades), agua bidestilada, csp 50 μ l. El marcado duró 2 h a temperatura ambiente, siendo detenido con 5 μ l de un buffer consistente en NaCl 20 mM, Tris-ClH (pH 7,5) 20 mM, EDTA 2 mM, SDS 0,25%, dCTP 1 μ M. A continuación se separó el ADN sintetizado de los nucleótidos no incorporados mediante pasaje por columna de Sephadex G-50, preequilibrada con Tris-EDTA y se lo desnaturalizó mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos.

Hibridización de las membranas

Prehibridización: Las membranas con el ADN transferido fueron incluidas en bolsas de plástico, con solución salina citratada 0,1x y SDS 0,1% p/v y se incubó 1 h a 65°C en baño térmico con agitación continua. Se agregó la solución de prehibridización (solución salina citratada 5x, Denhart 10x, SDS 1%, ADN monocatenario de esperma de salmón 0,1 mg/ml, dextrán sulfato 75 mg/ml y formamida desionizada 50% v/v). Se removieron las burbujas, se selló la bolsa térmicamente y se incubó como mínimo 4 h a 42°C con agitación continua (Posteriormente se reemplazó el uso de bolsas por tubos de vidrio en un horno de hibridización. Las condiciones de pre-hibridización e hibridización fueron las mismas, salvo el reemplazo de las bolsas por tubos de vidrio correspondientes al aparato).

Hibridización: Finalizada la prehibridización se abrió la bolsa y se agregó la sonda radioactiva. Con el objeto de separar las cadenas de ADN la sonda radioactiva previamente se mantuvo a aproximadamente 95 °C durante 5 minutos. Se selló nuevamente la bolsa y se la dejó en el baño térmico, a 42°C con agitación overnight.

Lavado: Se removió el exceso de radioactividad realizando 4 lavados de la membrana:

- el primero con solución salina citratada 2x, SDS 1%, 15 minutos a temperatura ambiente;
- el segundo con solución salina citratada 1x, SDS 0,1%, 30 minutos a 65°C;
- y los dos últimos con solución salina citratada 0,1x y SDS 0,1%, 30 minutos a 65°C.

Autorradiografía

Exposición: Para la realización de la misma se colocaron las membranas protegidas por una película plástica en chasis radiográfico. La película utilizada fue XOMat (Kodak, EEUU). La exposición fue de 48 h, la temperatura -70°C .

Revelado: finalmente se realizó el revelado de la película y se procedió a analizar las bandas detectadas por la sonda radioactiva.

Lavado de la membrana: El material radioactivo es eliminado de la membrana incubando la misma con una solución Tris 2 mM, pH 7,9, EDTA 1 mM, SDS 0,1% durante 2 h a 75°C .

Transformación y preparación de bacterias competentes

Método de CaCl_2

Se incubaron 15 μl de bacterias (cepa *E. coli* JM109) en 5 ml de medio de cultivo LB a 37°C toda la noche con agitación; se extendió 1 ml del cultivo overnight en 50 ml LB a aproximadamente 37°C por 1 h (hasta la fase log temprana); se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante y finalmente se lo resuspendió en 25 ml de CaCl_2 frío en tubo Corex. Se dejó en hielo por 20 minutos y se centrifugó a 4000 rpm, 15 min, 4°C . Se descartó el sobrenadante y se lo resuspendió en 3-4 ml de CaCl_2 frío. Las células en estas condiciones eran **competentes**.

Se tomó 1 μl de la mezcla de ligación y se la agregó a un tubo Eppendorf pre-enfriado, se agregaron 250 μl de bacterias competentes, se incubó en hielo durante 20 min y luego a 42°C por 2 min (heat shock). Se las dejó en hielo por 1-2 min. y luego a temperatura ambiente. Se agregó 1 ml de LB y se las incubó a 37°C durante 1 hr. Se sembraron las bacterias en placas de Petri previamente preparadas y se las incubó a 37°C durante 16 hs. Posteriormente se sacaron las placas del incubador y se las guardó a 4°C . Aquellas colonias que verificaban resistencia al antibiótico en el vector correspondiente, fueron seleccionadas.

Preparación de minipreps

Se inocularon ~3-5 ml de medio de cultivo LB con el antibiótico apropiado con una sola colonia bacteriana que se incubaron a 37°C con agitación o continua durante 16 hs.

Se utilizó 1,5 ml del cultivo en un eppendorf; se centrifugó un minuto para separar las bacterias y se guardó el resto a 4°C; luego se aspiró el sobrenadante hasta dejar el precipitado seco, el que se resuspendió por agitación con vortex en 100 μ l de una solución helada de: 50 mM Glucosa; 10 mM EDTA; 25 mM Tris CL (pH 8) y 4 \bar{m} g/ml Lysozyme. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente 5 min y se agregaron 200 μ l de una solución recientemente preparada de: 0.2N NaOH/1%SDS. Se dejó en hielo durante 5 min y se agregaron 150 μ l de solución helada de 3 M NaOAc (pH 4.8); luego se mezcló en posición invertida por 10 segundos y se dejó en hielo 5 min. Se centrifugó a aproximadamente 4°C por 5 min y se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se agregó un volumen de Fenol-Cloroformo; se extrajo la fase superior la que se precipitó en etanol. Finalmente se analizaron los fragmentos por digestión enzimática y se los visualizó en un minigel como se ha descrito anteriormente.

Primers y probes de DNA

Los probes utilizados fueron: clon cDNA para p16 humano [116]; pHFb, clon cDNA para el gen interferón- β_1 humano [227]; pL-fA, clon cDNA para el gen interferón- α_2 humano [228] que cross-hibridiza con todos los genes de la familia interferón- α_i . Como control se utilizó un fragmento del gen de la fibrosis quística. El gen de la F.Q. se localiza en el cromosoma 11 humano. Los insertos de DNA se separaron del vector plasmídico por restricción enzimática y se marcaron con [32 P]dCTP usando la técnica de random primer con un kit comercial (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD).

Resultados

Análisis de los genes de Interferón de tipo I

Se analizó la frecuencia de deleción de los genes de interferón α en LLA.

Los interferones α y $\beta 1$ se localizan próximos entre sí en el brazo corto del cromosoma 9. Se estudiaron 39 muestras de ADN de pacientes con LLA. En 37 de los 39 casos se estudió el cluster de interferón α y en 34 de 39 el gen del interferón $\beta 1$.

El análisis de dichas deleciones se realizó por medio de Southern blot digiriendo las muestras con *HindIII* y con *EcoR1* separadamente. En cada caso el resultado obtenido con *HindIII* fue corroborado digiriendo con *EcoR1*.

En 5 de los 39 (13%) pacientes estudiados (Tabla 9) se encontraron deleciones de los genes del interferón de tipo I.

Interferón α

Analizando cada cluster por separado se encontraron deleciones en el cluster del interferón α en 4 de las 37 (11%) muestras analizadas. La distribución de estas deleciones de acuerdo al fenotipo fue la siguiente: LLA B Precursoras 1 de 19 (5,3%), en las LLA T 2 de 14 (14%) y en las LLA indiferenciadas 1 de 4 (25%). De estos 4 casos, 2 pacientes presentaron deleciones homocigotas completas, es decir de todo el cluster de interferones α , mientras que en los dos restantes uno tiene deleciones homocigotas de los subtipos $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 13$ y $\alpha 14$, mientras que en el otro paciente el único subtipo faltante es el $\alpha 2$.

En la Figura 8 se muestra un experimento representativo que ilustra el patrón de restricción del ADN de 7 muestras digerido con *EcoR1*, en tanto que en la Figura 9 se presenta el patrón de restricción de las mismas muestras digeridas con *HindIII*.

En las calles 1 y 3, en la Figura 8 se muestra la ausencia de los genes de varios subtipos de IFN- α . En particular en la muestra de calle 1 faltan los genes correspondientes a los subtipos $\alpha 14$, $\alpha 5$, $\alpha 13$ y $\alpha 6$.

Tabla 9: Características de los pacientes con LLA y presencia de deleciones en genes de IFN.

Nº	Paciente	LLA	Material	Edad (años)	Sexo	IFN α	IFN β
1	LLA 39	Precursora B	s.p.	18	M	-	-
2	LLA 129	T-cell	m.o.	6	M	-	-
3	LLA 64	T-cell	s.p.	12	M	- p	-
4	LLA 27	Indiferenciada	m.o.	9	M	- p	ND
5	LLA 120	Precursora B	m.o.	5	M	+	- p
6	LLA 128	Indiferenciada	s.p.	1 1/2	M	+	+
7	LLA 31	Indiferenciada	m.o.	6	M	+	+
8	LLA 108	Precursora B	s.p.	33	M	+	+
9	LLA 121	Precursora B	m.o.	2	M	+	+
10	LLA 92	Precursora B	m.o.	2 1/2	F	+	+
11	LLA 11	Precursora B	m.o.	2	M	+	+
12	LLA 54	Precursora B	m.o.	3	M	+	+
13	LLA 78	Precursora B	m.o.	3	M	+	+
14	LLA 127	Precursora B	s.p.	4	F	+	+
15	LLA 89	Precursora B	m.o.	5	M	+	+
16	LLA 9	Precursora B	m.o.	5	M	+	+
17	LLA 10	Precursora B	m.o.	6	M	+	+
18	LLA 123	Precursora B	s.p.	10	M	+	+
19	LLA 4	Precursora B	m.o.	10	M	+	+
20	LLA 122	Precursora B	m.o.	13	M	+	+
21	LLA 100	Precursora B	m.o.	17	M	+	+
22	LLA 87	Precursora B	s.p.	72	F	+	+
23	LLA 13	T-cell	m.o.	4	F	+	+
24	LLA 66	T-cell	m.o.	4	M	+	+
25	LLA 3	T-cell	m.o.	6	F	+	+
26	LLA 6	T-cell	m.o.	7	F	+	+
27	LLA 50	T-cell	m.o.	8	M	+	+
28	LLA 68	T-cell	m.o.	8	M	+	+
29	LLA 130	T-cell	m.o.	8	M	+	+
30	LLA 39	T-cell	m.o.	10	F	+	+
31	LLA 131	T-cell	s.p.	10	M	+	+
32	LLA 83	T-cell	m.o.	12	F	+	+
33	LLA 45	T-cell	m.o.	13	M	+	+
34	LLA 124	T-cell	m.o.	2	M	+	ND
35	LLA 95	Indiferenciada	s.p.	39	F	+	ND
36	LLA 80	Precursora B	s.p.	12	M	+	ND
37	LLA 90	Precursora B	s.p.	33	F	+	ND
38	LLA 98	Precursora B	m.o.	6	M	ND	+
39	LLA 102	Precursora B	m.o.	7	M	ND	+

s.p.: Sangre Periférica

m.o.: Médula ósea

+: gen normal

- p: deleción parcial o hemicigota

-: deleción total homocigota

ND: No Determinado

Tabla 10: Características de los pacientes con LLA y presencia de deleciones en genes de p16

Nº	Paciente	LLA	Material	Edad (años)	Sexo	p16
1	LLA 39a	Precursora B	s.p.	18	M	-
2	LLA 129	T-cell	m.o.	6	M	-
3	LLA 64	T-cell	s.p.	12	M	-
4	LLA 31	Indiferenciada	m.o.	6	M	-
5	LLA 108	Precursora B	s.p.	33	M	-
6	LLA 13	T-cell	m.o.	4	F	-
7	LLA 6	T-cell	m.o.	7	F	-
8	LLA 39	T-cell	m.o.	10	F	-
9	LLA 128	Indiferenciada	s.p.	1 1/2	M	+
10	LLA 120	Precursora B	m.o.	5	M	+
11	LLA 98	Precursora B	m.o.	6	M	+
12	LLA 102	Precursora B	m.o.	7	M	+
13	LLA 121	Precursora B	m.o.	2	M	+
14	LLA 92	Precursora B	m.o.	2 1/2	F	+
15	LLA 11	Precursora B	m.o.	2	M	+
16	LLA 54	Precursora B	m.o.	3	M	+
17	LLA 78	Precursora B	m.o.	3	M	+
18	LLA 127	Precursora B	s.p.	4	F	+
19	LLA 89	Precursora B	m.o.	5	M	+
20	LLA 9	Precursora B	m.o.	5	M	+
21	LLA 10	Precursora B	m.o.	6	M	+
22	LLA 123	Precursora B	s.p.	10	M	+
23	LLA 4	Precursora B	m.o.	10	M	+
24	LLA 122	Precursora B	m.o.	13	M	+
25	LLA 100	Precursora B	m.o.	17	M	+
26	LLA 87	Precursora B	s.p.	72	F	+
27	LLA 124	T-cell	m.o.	2	M	+
28	LLA 66	T-cell	m.o.	4	M	+
29	LLA 3	T-cell	m.o.	6	F	+
30	LLA 50	T-cell	m.o.	8	M	+
31	LLA 68	T-cell	m.o.	8	M	+
32	LLA 130	T-cell	m.o.	8	M	+
33	LLA 131	T-cell	s.p.	10	M	+
34	LLA 83	T-cell	m.o.	12	F	+
35	LLA 45	T-cell	m.o.	13	M	+

s.p.: Sangre Periférica

m.o.: Médula ósea

+: gen normal

-: deleción total homocigota

En la restricción con *Hind*III (Figura 9) se aprecia que la muestra de la calle 3 tiene una marcada disminución de intensidad en las bandas correspondientes al IFN- α 2, lo cual sugiere que en un porcentaje significativo de los blastos de los cuales se extrajo el ADN el gen de este subtipo de IFN- α estaría ausente (delecionado). En las Figuras 10 y 11 se analizan otras muestras de pacientes con LLA y se ve en la calle 9 la ausencia total de señal, producto de una deleción homocigota de los genes del interferón α . Sobre la base de las muestras estudiadas, el porcentaje de deleción o rearrreglos de los genes de IFN- α en pacientes con LLA es del 11 %.

Interferón β

Analizando los genes del interferón β 1 se encontraron deleciones del mismo en 4 de los 34 (12%) casos analizados; tres resultaron homocigotas y uno hemicigota (paciente 5). La distribución de estas deleciones de acuerdo al fenotipo fue la siguiente: LLA B Precursoras 2 de 19 (10.5%) y LLA T: 2 de 13 (15%). Ninguno de los dos casos de LLA indiferenciada presenta deleción del gen de interferón β 1. En el caso de la deleción hemicigota de IFN β 1 se ve una banda débil cuando se digiere con las dos enzimas. No se debe descartar la posibilidad de que esas bandas provengan de una posible contaminación con linfocitos normales. En las Figuras 12 y 13 se observa el resultado de digerir la misma muestra sucesivamente con *Hind*III y con *Eco*R1 separadamente. En cada caso el resultado obtenido con *Hind*III fue confirmado cortando con *Eco*R1. Los resultados son similares a los obtenidos con el interferón α . Solamente en un caso que no presentaba deleciones de los genes de interferón α se hallaron deleciones del interferón β 1. Estos resultados sugieren que la falta de uno de los tipos de interferón, no necesariamente se corresponde con la ausencia del otro.

Análisis del gen p16

Recientemente, estudiando el ciclo celular, se localizó un nuevo gen supresor de tumor [116] que se encontró delecionado en algunas líneas celulares provenientes de tumores sólidos. Este gen denominado p16, o MTS1, o p16^{INK4A} o CDKN2, se encuentra en el brazo corto del cromosoma 9, particularmente en la banda p21, centromérico y próximo al cluster de los genes del interferón α . Dada la proximidad del mismo a los genes de los interferones de tipo I y la existencia de deleciones en las

Tabla 11: Características de los pacientes con LLA y presencia de deleciones en genes de IFN y p16

N°	Paciente	LLA	Material	Edad (años)	Sexo	p16	IFN α	IFN β
1	LLA 39a	Precursora B	s.p.	18	M	-	-	-
2	LLA 129	T-cell	m.o.	6	M	-	-	-
3	LLA 64	T-cell	s.p.	12	M	-	- p	-
4	LLA 31	Indiferenciada	m.o.	6	M	-	+	+
5	LLA 108	Precursora B	s.p.	33	M	-	+	+
7	LLA 13	T-cell	m.o.	4	F	-	+	+
8	LLA 6	T-cell	m.o.	7	F	-	+	+
6	LLA 39	T-cell	m.o.	10	F	-	+	+
9	LLA 120	Precursora B	m.o.	5	M	+	+	- p
10	LLA 128	Indiferenciada	s.p.	1 1/2	M	+	+	+
11	LLA 121	Precursora B	m.o.	2	M	+	+	+
12	LLA 92	Precursora B	m.o.	2 1/2	F	+	+	+
13	LLA 11	Precursora B	m.o.	2	M	+	+	+
14	LLA 54	Precursora B	m.o.	3	M	+	+	+
15	LLA 78	Precursora B	m.o.	3	M	+	+	+
23	LLA 127	Precursora B	s.p.	4	F	+	+	+
16	LLA 89	Precursora B	m.o.	5	M	+	+	+
17	LLA 9	Precursora B	m.o.	5	M	+	+	+
18	LLA 10	Precursora B	m.o.	6	M	+	+	+
19	LLA 123	Precursora B	s.p.	10	M	+	+	+
20	LLA 4	Precursora B	m.o.	10	M	+	+	+
21	LLA 122	Precursora B	m.o.	13	M	+	+	+
22	LLA 100	Precursora B	m.o.	17	M	+	+	+
24	LLA 87	Precursora B	s.p.	72	F	+	+	+
27	LLA 66	T-cell	m.o.	4	M	+	+	+
28	LLA 3	T-cell	m.o.	6	F	+	+	+
29	LLA 50	T-cell	m.o.	8	M	+	+	+
30	LLA 68	T-cell	m.o.	8	M	+	+	+
25	LLA 130	T-cell	m.o.	8	M	+	+	+
26	LLA 131	T-cell	s.p.	10	M	+	+	+
31	LLA 83	T-cell	m.o.	12	F	+	+	+
32	LLA 45	T-cell	m.o.	13	M	+	+	+
33	LLA 98	Precursora B	m.o.	6	M	+	ND	+
34	LLA 102	Precursora B	m.o.	7	M	+	ND	+
35	LLA 124	T-cell	m.o.	2	M	+	+	ND
36	LLA 27	Indiferenciada	m.o.	9	M	ND	- p	ND
37	LLA 95	Indiferenciada	s.p.	39	F	ND	+	ND
38	LLA 80	Precursora B	s.p.	12	M	ND	+	ND
39	LLA 90	Precursora B	s.p.	33	F	ND	+	ND

s.p.: Sangre Periférica

m.o.: Médula ósea

+: gen normal

- p: deleción parcial o hemicigota

-: deleción total homocigota

ND: No Determinado

Tabla 12: Características de los pacientes con LLA a los que se tituló el IFN α y se investigó las deleciones en genes de IFN y p16

Nº	Paciente	LLA	Material	Edad (años)	Sexo	Prod. de IFN pg/5x10 ⁶	p16	IFN α	IFN β
1	LLA 39a	precursora B	s.p.	18	M	1120	-	-	-
2	LLA 64	T-cell	s.p.	12	M	4750	-	- p	-
3	LLA 92	precursora B	m.o.	2 1/2	F	7800	+	+	+
4	LLA 100	precursora B	m.o.	17	M	2702	+	+	+
5	LLA 87	precursora B	s.p.	72	F	5100	+	+	+
6	LLA 80	precursora B	s.p.	12	M	7000	ND	+	ND
7	LLA 90	precursora B	s.p.	33	F	8200	ND	+	ND
8	K 562	línea celular				920	-	-	-
9	LB 109	linfoma Burkitt	m.o.	13	F	3746	+	+	+

s.p.: Sangre Periférica

m.o.: Médula ósea

+: gen normal

- p: deleción parcial o hemicigota

-: deleción total homocigota

ND: No Determinado

líneas celulares de origen maligno, sobre todo en aquellas de origen leucémico, se quiso analizar la existencia de deleciones en nuestras LLA analizadas y si estas estarían relacionadas con las de los interferones.

Para determinar si el gen que codifica para la proteína p16 podría ser un blanco frecuente de deleción en las LLA se analizaron por Southern blot blastos de 35 pacientes con LLA. Se hibridizó el ADN digerido con *HindIII* con el cDNA de *p16^{INK4A}*. En la **Figura 14** se observa el resultado en algunas muestras. En la calle C se halla el control normal y en las siguientes 7 muestras de las LLA analizadas. Se visualizaron tres fragmentos de aproximadamente 20 kb, 12 kb y 6 kb (**Figura 14**). Estos fragmentos corresponden a los dos exones del *p16*. Los fragmentos de 20 kb y 12 kb están relacionados con el exón 2 del *p16* y de otro gen supresor de tumor llamado *p15* (o *MTS2* o *p15^{INK4B}*), que mapea próximo al *p16* y conserva un 90% de homología con el *p16*. Dado que las deleciones encontradas del *p16* son homocigotas, todas las halladas están asociadas con deleciones del gen vecino *p15*. Como se ilustra en la **Tabla 10**, en 8 casos se observaron deleciones homocigotas de *p16*. De acuerdo al fenotipo de los blastos las deleciones de *p16* se hicieron presentes en: LLA precursora B 2 de 19 (10,5%), LLA T 5 de 14 (36%) y LLA indiferenciada 1 de 2 (50%). En las restantes 27 LLA estudiadas no se encontraron alteraciones en los genes que codifican para p16.

Análisis del gen *p16* y de los interferones de tipo I

En esta etapa analizamos el conjunto de las muestras para los tres genes en cuestión: *p16* y los interferones α y β . En 32 casos se realizó el estudio comparativo. Se identificaron deleciones homocigotas del gen *p16* en 8 de las 32 LLA (25%) a las que se les analizó los tres genes en cuestión. *p16* fue el gen predominantemente delecionado en las LLA. Los genes del interferón solamente se encontraron alterados en 3 de las 8 muestras (37,5%) con deleciones en *p16* (**Tabla 11**). Solamente en una de las 24 muestras sin deleciones de *p16* se halló una deleción del gen interferón β 1. En la **Figura 15** se observan las mismas muestras analizadas para los tres genes. En la **Figura 15 a** se realizó el Southern blot para el gen de *p16*, en la parte inferior se observa el control de carga realizado con la sonda de FQ. En la **Figura 15 b** se visualizan las mismas muestras para el interferón α y en la **Figura 15 c** las mismas para el interferón β . Se observa que, de los 3 genes estudiados, el gen mayormente delecionado es el que corresponde a *p16*. Las deleciones de los genes de los interferones

Figuras 8 y 9. Southern blot de muestras de ADN de pacientes con LLA frente a la sonda de IFN α_2 . En la figura 8 se digirió las muestras con *EcoR* I, mientras que en la figura 9 se digirió las mismas con *Hind*III. En el control normal se destacan los distintos subtipos encontrados.

Figura 8

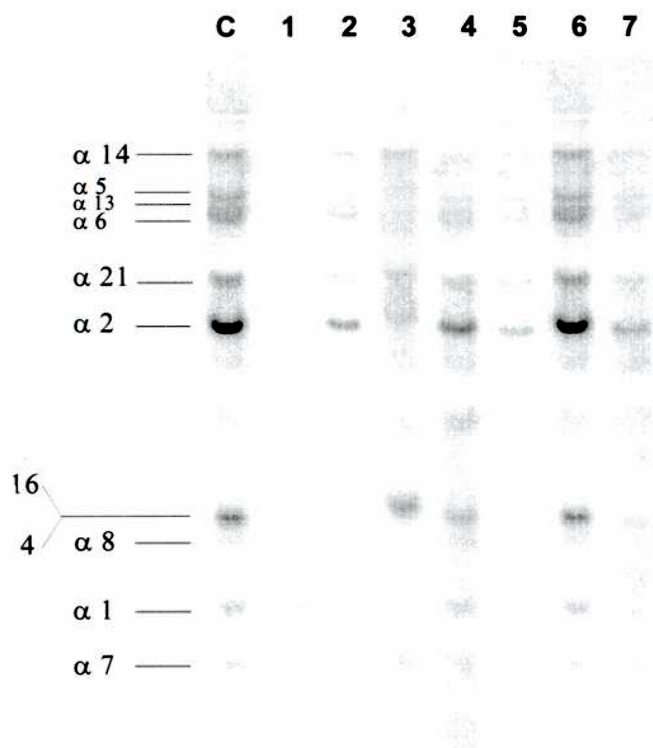
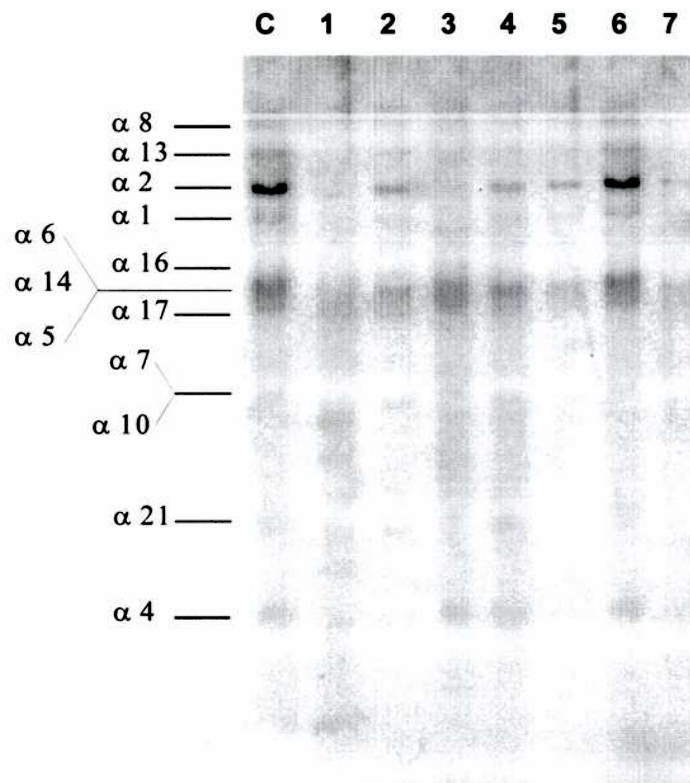


Figura 9



Figuras 10 y 11. Southern blot de muestras de ADN de pacientes con LLA frente a la sonda de IFN α_2 . En la figura 10 se digirió las muestras con *EcoR* 1, mientras que en la figura 11 se digirió las mismas con *Hind*III.

Figura 10

C 1 2 3 4 5 6 7 8 9

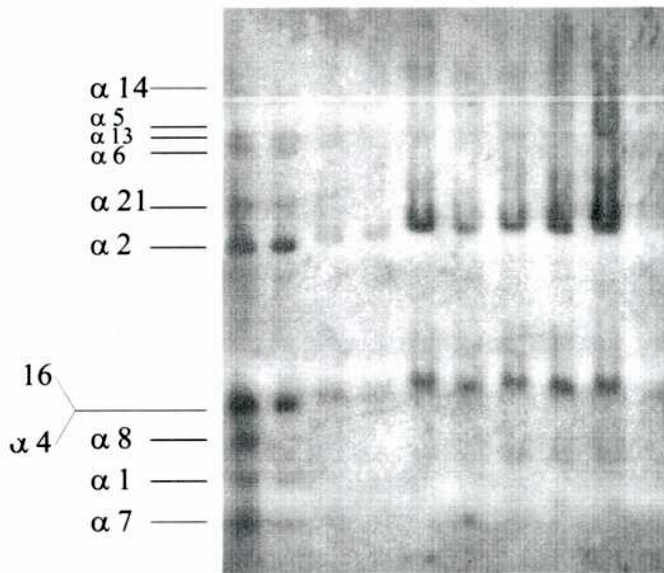
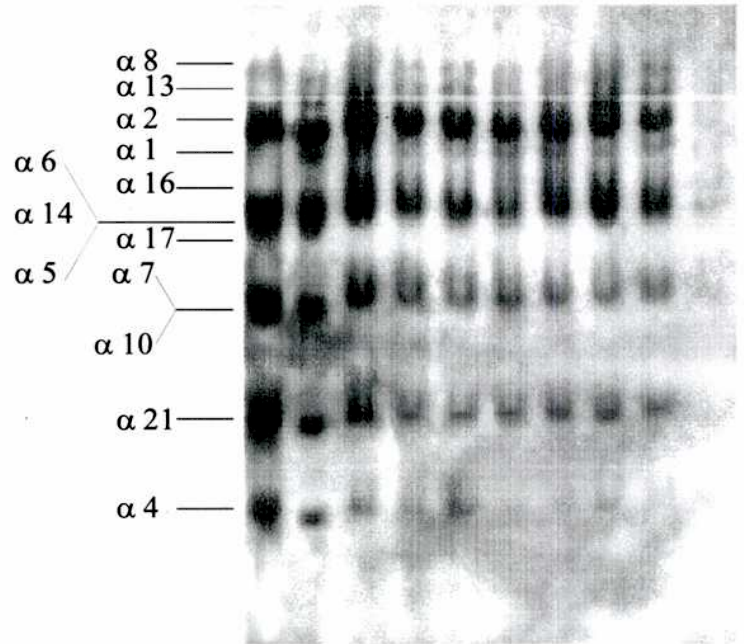


Figura 11

C 1 2 3 4 5 6 7 8 9



Figuras 12 y 13. Southern blot de muestras de ADN de pacientes con LLA frente a la sonda de IFN β . En la figura 12 se digirió las muestras con *EcoR*I, mientras que en la figura 13 se digirió las mismas con *Hind*III. En las placas de abajo se observa el control de ADN, en este caso la sonda FQ.

Figura 12

Figura 13

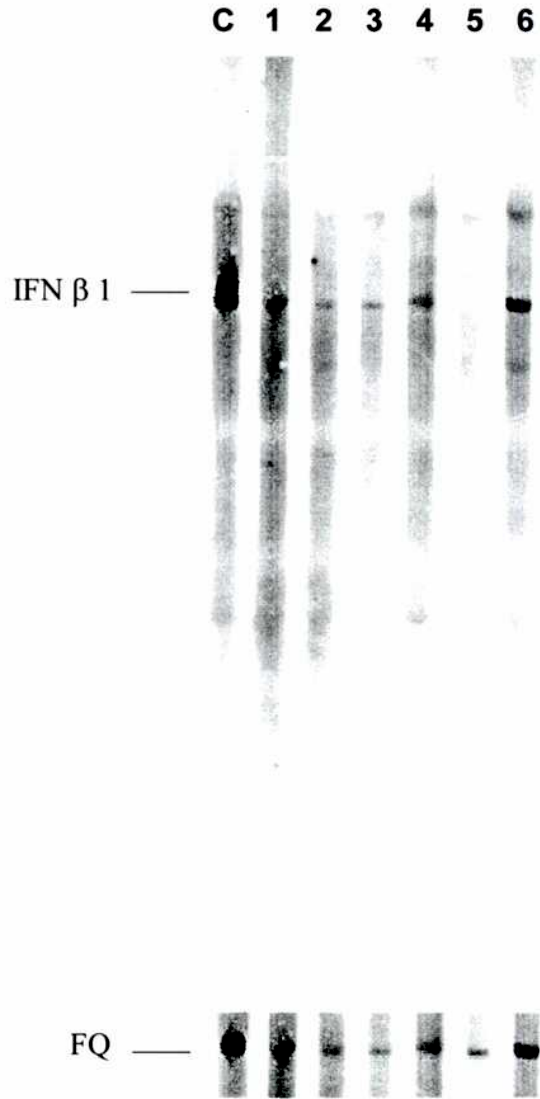
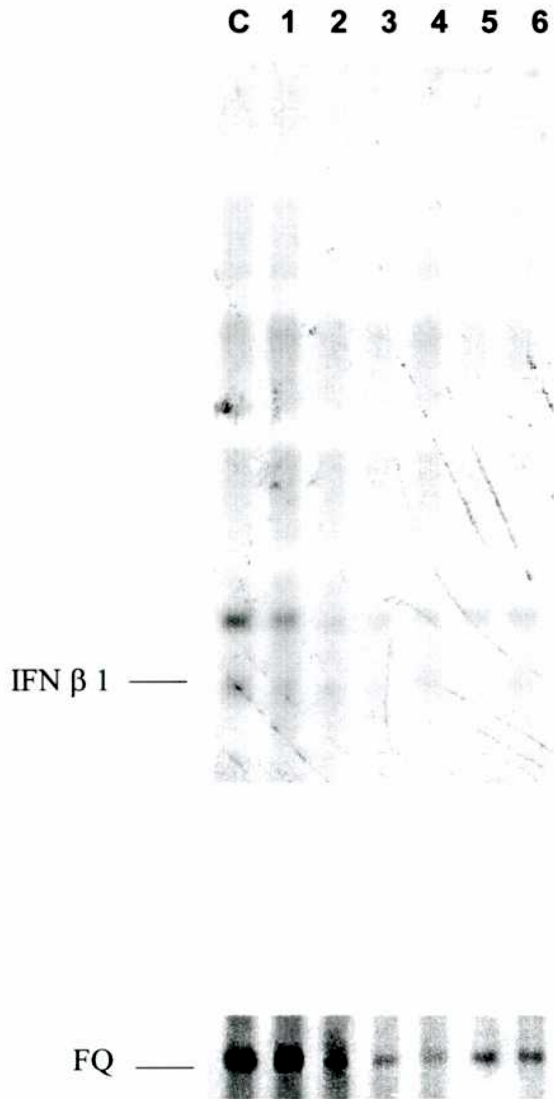
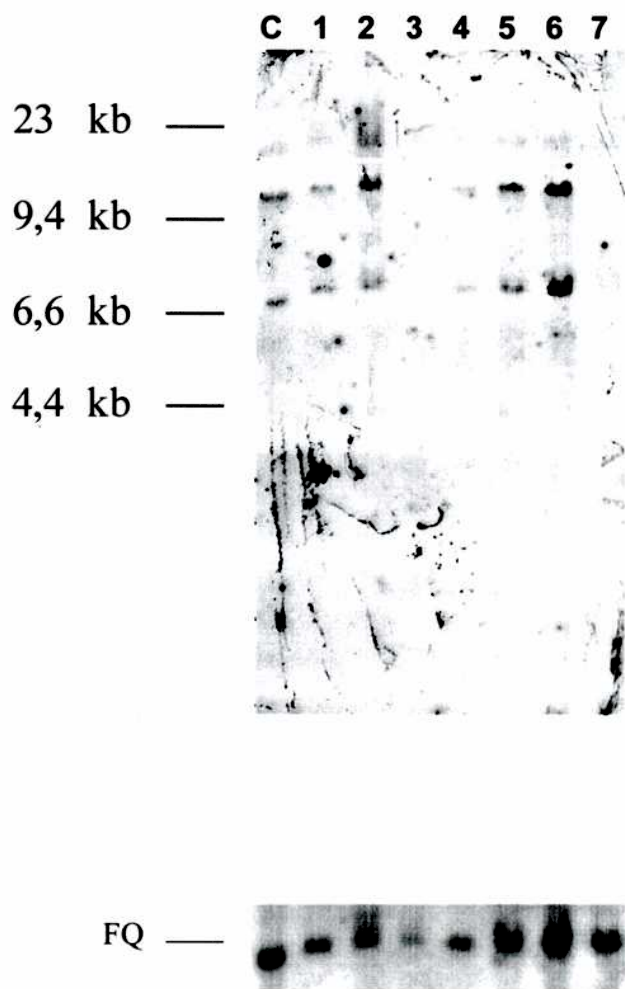


Figura 14. Southern blot de muestras de ADN de pacientes con LLA frente a la sonda de cDNA del gen supresor de tumor $p16^{INK4A}$. Como control se utilizó la sonda del gen *FQ*.



de tipo I podrían estar simplemente asociadas a una deleción de *p16* por proximidad. Sin embargo, la existencia de una deleción aislada en el gen del interferón β deja abierta la posibilidad de una participación propia de estas deleciones.

En todos los casos se utilizaron dadores normales como controles positivos y la línea celular K562 (que posee delecionada la zona en cuestión del cromosoma 9) como control negativo.

No se observó ningún patrón característico en cuanto a sexo, edad y su relación con las deleciones halladas.

Producción de IFN- α y deleciones del sistema IFN

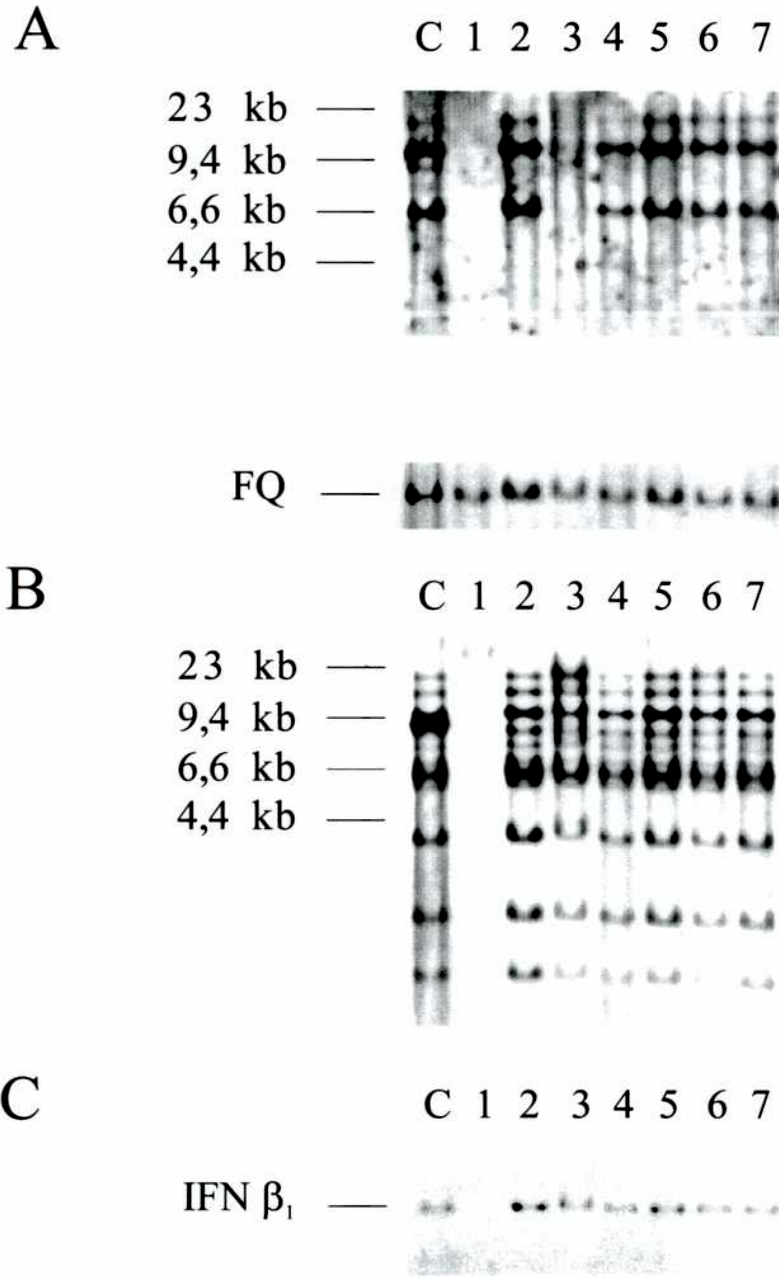
El paso siguiente fue comparar los resultados obtenidos referentes a la producción de interferón y a las deleciones del mismo. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de interferón producido por células mononucleares totales provenientes de LLA y por controles normales. Hay un porcentaje de las muestras leucémicas que presenta deleciones en los genes del interferón de tipo I. En aquellos casos en que se realizaron las dos experiencias se evaluó qué sucedía. De todas las muestras obtenidas se pudo analizar la producción de interferón α en 7 de las muestras que habíamos estudiado por Southern blot. En la Tabla 12 se observa el resultado de ambas experiencias. En el caso de la línea celular K562, utilizada como control negativo, que presenta deleciones en el brazo corto del cromosoma 9, en la zona donde se hallan los genes del interferón. Como se esperaba, la producción de interferón α se mantuvo en el nivel basal de nuestros controles, lo que nos asegura que si existen deleciones en la zona de estudio la correlación sería una menor producción de interferón α .

No en todos los casos con baja producción de interferón se detectó ausencia de los genes del mismo, tal es el caso de la muestra 4 (LLA 100), también con un mínimo de producción, pero sin deleciones detectadas para los genes del interferón y *p16*. En este caso puede existir alguna mutación puntual no detectable, o alguna modificación post-transcripcional que lleve a alguna conformación distinta. También puede ocurrir que estas células presenten modificaciones en los receptores para interferón, o en alguno de los factores estimulables por el mismo, lo que llevaría a que el proceso de producción no sea el óptimo, ya que el mismo interferón su síntesis. En cambio, en el caso de la muestra 1 (LLA 39a), con deleciones en los tres genes, la expresión de interferón α es mínima. En el caso de la muestra

2 (LLA 64) se había visto la falta de algunos subtipos de interferón α ; esto no se corresponde estadísticamente con el nivel de producción, aunque es menor que la media en las LLA analizadas.

Aunque no existen diferencias significativas entre las muestras de LLA y los controles normales, dada la gran diversidad obtenida es posible que la proteína identificada no sea 100% activa, aún en el caso de aquellas muestras con título alto. Como se puede apreciar, la deleción de algunos de los genes del IFN- α no acarrea inevitablemente la pérdida de la capacidad de producir IFN- α frente a la inducción con virus Sendai, lo cual indica probablemente la capacidad de compensar, frente a una sobreestimulación no fisiológica (el virus Sendai), la carencia de las formas de IFN faltantes con sobreproducción de las restantes.

Figura 15. Análisis por Southern blot de las mismas muestras leucémicas frente a hibridizaciones sucesivas con las sondas de (A) p16, (B) interferón α y (C) interferón β .



Discusión

Se analizó la frecuencia de deleción de los genes de interferón α y $\beta 1$ en LLA para ver si existía algún defecto a nivel génico en dichos genes que se localizan próximos entre sí en el brazo corto del cromosoma 9. En 5 de los 39 (13%) pacientes estudiados (Tabla 9) se encontraron deleciones de los genes del interferón de tipo I.

Cuando se analizó cada cluster por separado se encontraron deleciones en el cluster del interferón α en 4 de las 37 (11%) muestras analizadas. La distribución de estas deleciones de acuerdo al fenotipo fue la siguiente: LLA B Precursoras 1 de 19 (5,3%), en las LLA T 2 de 14 (14%) y en las LLA indiferenciadas 1 de 4 (25%). Dos pacientes presentaron deleciones homocigotas de los subtipos $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 13$ y $\alpha 14$, mientras que en el otro paciente sólo se encontraba ausente el $\alpha 2$. Si bien otros grupos hallaron deleciones homocigotas de los genes del interferón α en LLA [228-230], esta es la primera vez que se encuentran deleciones parciales de determinados subtipos. Sobre la base de las muestras estudiadas, el porcentaje de deleción o rearreglos (probablemente inefectivos) de los genes de IFN- α en pacientes con LLA es del 11 %; lo que concuerda con los resultados hallados por los grupos anteriormente mencionados

Se encontraron deleciones de los genes del interferón $\beta 1$ en 4 de los 34 (12%) casos analizados; tres resultaron homocigotas y uno hemicigota; distribuidas de la siguiente forma: LLA B precursoras 2 de 19 (10.5%) y LLA T: 2 de 13 (15%). Si bien los resultados son similares a los obtenidos con el interferón α , se encontró un caso con deleciones del interferón $\beta 1$ y sin deleciones visibles de los genes de interferón α ; lo que sugeriría que la falta de uno de los tipos de interferón, no necesariamente se corresponda con la ausencia del otro.--

Con el descubrimiento del gen *p16* la búsqueda de genes supresores de tumor cobró un nuevo impulso [116]. Su proximidad hacia los genes de los interferones de tipo I y la existencia de deleciones en las líneas celulares de origen maligno, en especial aquellas de origen leucémico hizo que se quisiera analizar la existencia de deleciones de *p16* en nuestras LLA analizadas y si estas estarían relacionadas con las de los interferones. Se observaron deleciones homocigotas de *p16* en 8 casos de los 35 analizados (Tabla 10); distribuidos de la siguiente manera: LLA precursora B 2 de 19 (10,5%), LLA T 5 de 14 (36%) y LLA indiferenciada 1 de 2 (50%).

Se visualizaron tres fragmentos de aproximadamente 20 kb, 12 kb y 6 kb (**Figura 12**). Estos fragmentos corresponden a los dos exones del *p16*. Los fragmentos de 20 kb y 12 kb están relacionados con el exón 2 del *p16* y de otro gen supresor de tumor llamado *p15*, que mapea próximo al *p16* y conserva un 90% de homología con el *p16* [148,122]. Dado que las deleciones encontradas del *p16* son homocigotas, todas las halladas están asociadas con deleciones del gen vecino *p15*. De esta manera el porcentaje de deleciones de *p15* y *p16* en las LLA es del 23% (8/35).

Cuando analizamos según el fenotipo hallamos que otros grupos encontraron mayores porcentajes de deleciones en las LLA T; estos varían entre un 35% y un 83%, mientras que en nuestro caso sólo hallamos un 36% [147,156,232,233]. En cambio, cuando se analizan las LLA de tipo B el porcentaje resulta más bajo (10,5%) respecto de los resultados hallados por otros autores (15-30%) [112].

En la última etapa se analizó el conjunto de las muestras para los tres genes en cuestión (*p16* y los interferones α y β) en 32 casos. Se identificaron deleciones homocigotas del gen *p16* en 8 de las 32 LLA (25%) a las que se les analizó los tres genes en cuestión; siendo *p16* el gen predominantemente delecionado en las LLA. Los genes del interferón solamente se encontraron alterados en 3 de las 8 muestras (37,5%) con deleciones en *p16* (**Tabla 11**). Solamente en una de las 24 muestras sin deleciones de *p16* se halló una deleción del gen interferón $\beta 1$. De los 3 genes estudiados, el gen mayormente delecionado es el que corresponde a *p16*. Las deleciones de los genes de los interferones de tipo I podrían estar simplemente asociadas a una deleción de *p16* por proximidad; sin embargo, la existencia de un caso con una deleción aislada en el gen del interferón β deja abierta la posibilidad de una participación propia de estas deleciones. No se observó ningún patrón característico en cuanto a sexo, edad y su relación con las deleciones halladas.

Entre aquellas muestras a las que se les estudió la producción de interferón α , a 7 de ellas también se les buscó deleciones por Southern blot (**Tabla 12**). Sin embargo, no se detectaron deleciones en todos los casos con baja producción. Podría tratarse de la presencia de alguna mutación puntual no detectable, o alguna modificación post-transcripcional que lleve a alguna conformación distinta. También puede ocurrir que estas células presenten modificaciones en los receptores para interferón, o en alguno de los factores estimulables por el mismo, lo que llevaría a que el proceso de producción no sea el óptimo, ya que el mismo interferón induce su síntesis. En cambio, en el caso de la muestra I (LLA 39a), con deleciones en los tres genes, la expresión de interferón α es mínima. En el caso de

la muestra 2 (LLA 64) con falta de algunos subtipos de interferón α ; el nivel de producción es menor que la media en las LLA analizadas.

Muchas veces, debido a la gran diversidad obtenida es posible que la proteína identificada no sea 100% activa, aún en el caso de aquellas muestras con título alto. Como se puede apreciar a partir de éstos experimentos, la existencia de deleciones de algunos de los genes del IFN- α no acarrea inevitablemente la pérdida de la capacidad de producir IFN- α frente a la inducción con virus Sendai, lo cual indica probablemente la capacidad de compensar, frente a una sobreestimulación no fisiológica (el virus Sendai), la carencia de las formas de interferón faltantes con sobreproducción de las restantes.

Algunos pacientes son refractarios al tratamiento con interferón; probablemente aquellos con alteraciones en el sistema interferón. Es posible que en algunos casos su ausencia esté involucrada con la formación neoplásica, mientras que en otros no tenga ningún tipo de relación. Las LLA son muy diversas entre sí, y solamente en pequeños porcentajes presentan modificaciones en el sistema de interferón, ya sea en su genoma, en la producción del mismo, o en alguna de las etapas involucradas en la producción del mismo. El interferón podría estar involucrado en alguna de estas neoplasias, ya sea como un gen supresor de tumor y/o asociado a otro gen supresor de tumor.

No se puede descartar que el interferón sea sólo uno de los eventos que intervengan en la formación neoplásica, estando asociado a deleciones de *p16* en gran porcentaje, ya sea por su proximidad, o como un evento más en la carcinogénesis.

Conclusiones de la Sección B

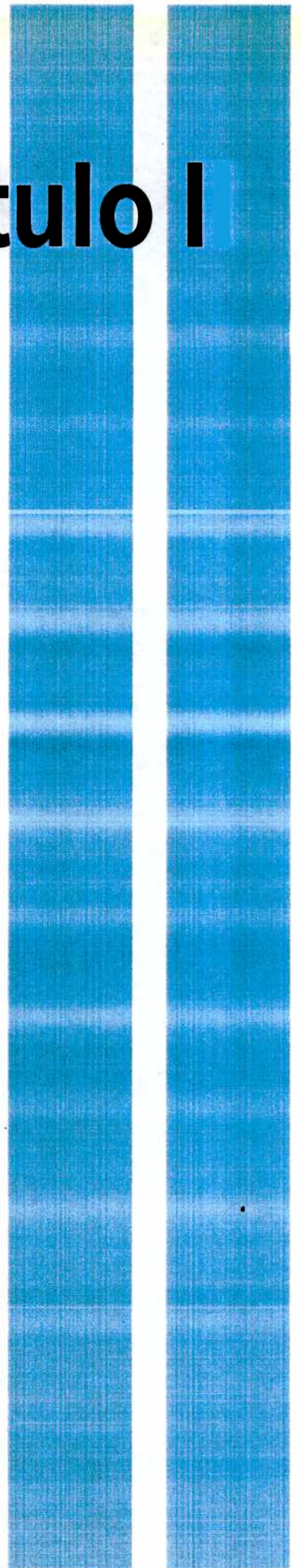
- 1 Se encontraron deleciones en los genes de Interferón α en un 11%, de interferón β en un 12%, y de *p15* y *p16* en un 23% de las LLA analizadas
- 2 No siempre una baja producción de interferón al ser estimulas las células se corresponde con una deleción detectable en las LLA

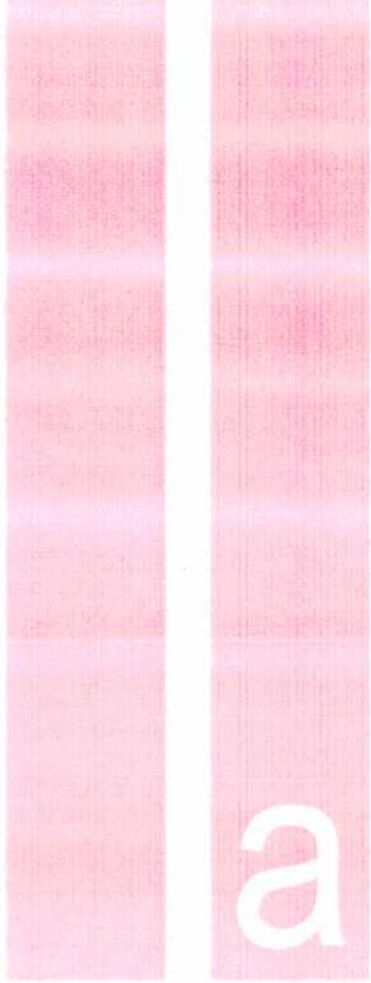
conclusión

C. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1

- 1 La producción de interferón en pacientes con LLA no difiere significativamente de los controles normales
- 2 Dentro del grupo de las LLA B precursoras existe un subgrupo de 4 muestras con elevada producción de interferón que se diferencia del resto
- 3 También se encontraron 2 casos con muy baja producción de interferón
- 4 La producción de Interferón en las LLA depende del estímulo al que se sometan las células
- 5 Las LMA poseen elevada la producción de interferón
- 6 Se encontraron deleciones en los genes de Interferón α en 4 de 37 (11%) LLA, de interferón β en 4 de 34 (12%) LLA y de *p15* y *p16* en 8 de 35 (23%) LLA analizadas
- 7 No siempre una baja producción de interferón al ser estimulas las células se corresponde con una deleción detectable en las LLA

capítulo I





CAPÍTULO 2

A. ESTUDIO DE LAS CADENAS PESADAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Introducción

Para la detección de reordenamientos clonales de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas se ha recurrido principalmente a la técnica del Southern blot. Esta técnica necesita grandes cantidades de ADN que no siempre se encuentran disponibles; en cambio para la amplificación de ADN por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se requiere una menor cantidad y es posible partir incluso de muestras embebidas en parafina que se han conservado así durante años. Utilizando primers complementarios a secuencias consenso presentes en aproximadamente 100-200 regiones variables y 6 regiones de unión, la región V-D-J de la cadena pesada de las inmunoglobulinas puede ser amplificada y se puede demostrar clonalidad. En este caso se utiliza una técnica de PCR seminested.

La clonalidad IgH se establece cuando la amplificación por PCR genera un producto de uno o dos fragmentos de 80-150 bp. La PCR seminested amplifica el producto de la reacción de PCR externa y aumenta el rendimiento de los reordenamientos clonales que representan una pequeña subpoblación de células. Estos segmentos tienen entre 70-140 bp de longitud, dado que son 10 bp más cortos que los primeros. A veces se ven muchas bandas indistintas correspondientes a poblaciones policlonales reactivas.

Objetivos

El objetivo de esta etapa fue analizar la clonalidad B presente en las muestras de LLA por medio de el análisis por PCR de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

Plan de trabajo

Estudio de las cadenas pesadas de las Inmunoglobulinas en LLA

En esta etapa se llevaron a cabo estudios sobre los reordenamientos de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas en LLA. A partir de ADN proveniente de CMT de pacientes se realizó la identificación del reordenamiento de la cadena pesada de las inmunoglobulinas mediante la amplificación por PCR de un fragmento de la región de unión correspondiente a la región determinante de complementaridad 3 (CDR3) del gen de la cadena pesada.

--

Materiales y Métodos

Amplificación del ADN por reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para IgH:

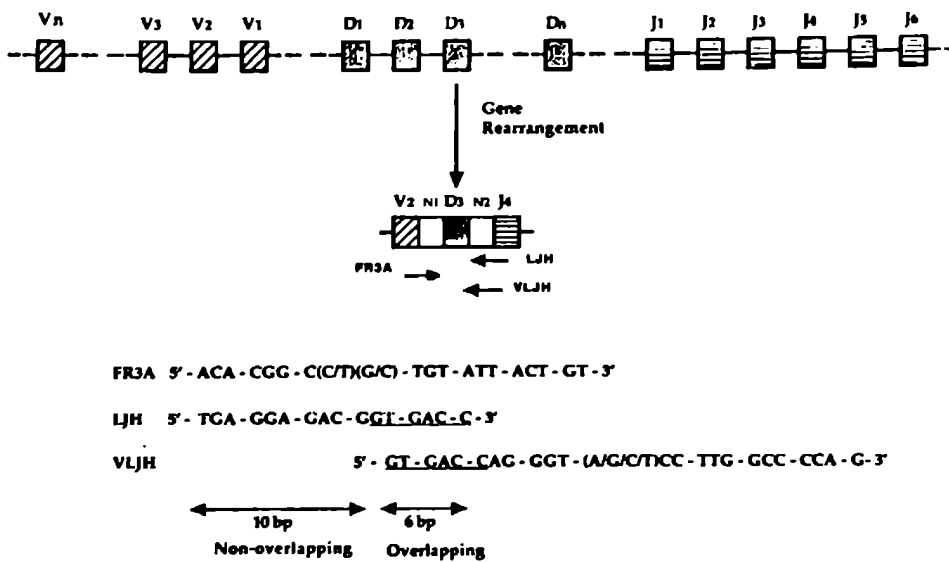
Se realizó una PCR seminested para el caso de los reordenamientos de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Esta consiste en dos rounds de amplificación utilizando un primer en común en uno de los extremos y uno distinto en el otro. Para el primer round se realizó además una pre-PCR para eliminar artefactos de la técnica llamados dímeros de primers y amplificaciones inespecíficas. La mezcla de reacción (50 μ l) contiene Tris-HCl pH 8,3 10 mM, KCl 50 mM, Cl₂Mg 1,5 mM, dNTPs 200 μ M de cada uno, 1 μ M de cada uno de los primer oligonucleótidos más un μ g de la muestra de ADN y 1,25 U de la Taq Polimerasa que se agrega luego de la pre-PCR. La pre-PCR consiste en tres ciclos de 3 minutos a 94°C y 3 minutos a 55°C. La mezcla se somete a 35 ciclos repetitivos con una desnaturalización de 1 minuto a 94°C, un apareamiento de los primers de 2 minutos 30" a 55°C y la extensión de la cadena de ADN con la Polimerasa Taq de 2 minutos a 72°C, seguido de 12 minutos a 72°C con un enfriamiento rápido a 4°C; ésto se realiza empleando un termociclador de ADN (Perkin-Elmer/Cetus 2400). El segundo round es exactamente igual al primero excepto que las concentraciones de los primers son de 0,1 μ M y el templado de ADN es una dilución 1/100 del primer producto de PCR.

Primers de DNA

Para la detección de reordenamientos en los genes de las inmunoglobulinas se utilizaron oligonucleótidos sintéticos a partir de las cadenas V y J de la cadena H de los genes de Inmunoglobulinas. En el primer round de PCR se utilizan los primers externos FR3A, primer consenso de la región variable que se une a 20 pares de bases (bp) de una región altamente conservada que incluye los codones 88-95 de la mayoría de las regiones variables y un primer consenso de las regiones de unión, LJH, que se une a 16 bp de una secuencia altamente conservada incluyendo a los codones 101-112 de los segmentos de unión J1-J6 (**Figura 1**) en una concentración de 1 μ M. Para aumentar la sensibilidad del método el producto amplificado en la primera reacción se sometió a una segunda PCR con el primer FR3A y un nuevo primer de la región J, VLJH, que se une a una secuencia muy conservada de 24 bp a 10 bp hacia el extremo 5' del LJH. Esto genera un fragmento 10 bp más corto que el de la primera reacción. En el segundo round se utilizan los primers FR3A y VLJH en una concentración de 0,1 μ M.

A. IgH

Figura 1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) de ADN del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas reordenado. FR3A es un primer consenso de la región variable utilizado en ambas PCR, externa e interna. LJH y VLJH son primers consenso para la región de unión (J), LJH se utiliza en la PCR externa, y VLJH en la interna. Hay un fragmento de 6 bp que se superpone entre ambos y uno de 10 bp que no se superpone. V, D, y J significan regiones variable, de diversidad y de unión del gen respectivamente; N1 y N2 es un número variable de nucleótidos agregados o delecionados al azar durante la diferenciación B, originando fragmentos de diferentes tamaños entre los clones B.



Resultados

PCR para IgH

Se realizó la detección de reordenamientos en la cadena pesada de las inmunoglobulinas por PCR en 24 muestras de LLA. De ellas 15 (63%) resultaron positivas para el mismo. De acuerdo al fenotipo de las LLA la distribución es la siguiente:

LLA B precursora: 11 de 13 (85%)

LLA indiferenciada: 1 de 2 (50%)

LLA bifenotípica: 1 de 1

LLA-T: 2 de 8 (25%)

También se analizaron dos linfomas de Burkitt, los que resultaron uno positivo y uno negativo para el reordenamiento VDJ.

En la **Figura 2** se puede ver un ejemplo de una de las experiencias de PCR. En las calles 1 y 2 se corre un control normal, donde se ven varias bandas debido a la policlonalidad de los fragmentos amplificados. En la calle 6 se ve claramente el fragmento amplificado de alrededor de 100 bp que determina clonalidad. Cuando se realiza el primer round de PCR (externa) se ven muchas bandas producto de la amplificación de varios segmentos, en cambio la PCR interna es mucho más específica ya que sólo amplifica si el templado es el adecuado.

En la siguiente tabla (**Tabla 1**) se puede observar el resultado de los ensayos de detección de clonalidad B por PCR.

También se han comprobado los reordenamientos VDJ en biopsias de 10 linfomas centroblásticos de tipo B y en todos los casos se ha encontrado clonalidad.

Figura 2. Fragmentos amplificados de los rearreglos clonales para IgH. M: Marcador de peso molecular pGEM marker que abarca un rango desde 36 bp hasta 2645 bp; 1 y 2: control normal; 3 y 4: muestra 1; 5 y 6: muestra 2; 7 y 8: muestra 3; 9 y 10: muestra 4; 11 y 12: muestra 5; 13 y 14: muestra 6. El fragmento amplificado en la PCR seminested es 10 bp más corto que el producto del primer round (externo). En varias muestras a las que se le realizó el primer round se puede ver una mancha de amplificaciones inespecíficas e incluso varias bandas de fragmentos. En la calle 13 se ve un fragmento de alrededor de 260 bp, producto de la co-amplificación del fragmento HLA dq α , utilizado como control de amplificación en una muestra cuyo resultado de la amplificación del fragmento de IGH es negativo. E: PCR externa; S: PCR seminested.

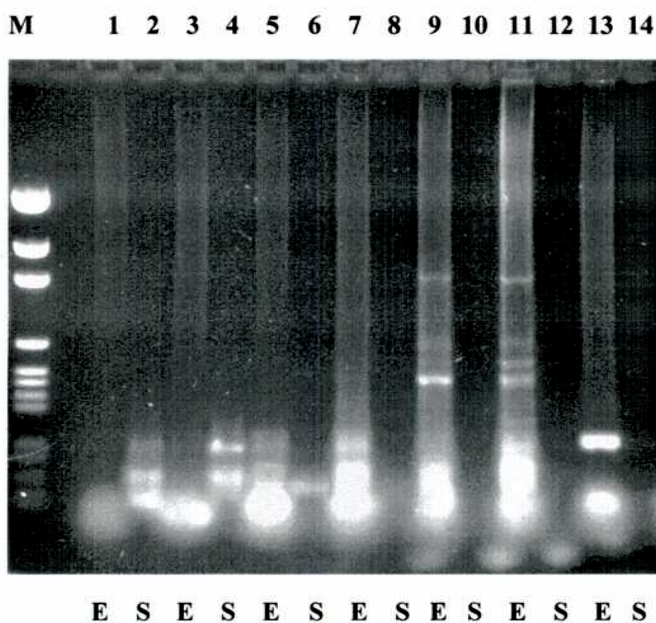


Tabla 1: Características de los pacientes con LLA y reordenamientos de IgH

Nº	Paciente	LLA	Material	Edad (años)	Sexo	IgH
1	LLA 128	Indiferenciada	s.p.	1 1/2	M	-
2	LLA 27	Indiferenciada	m.o.	9	M	+
3	LLA 121	Precursora B	m.o.	2	M	+
4	LLA 92	Precursora B	m.o.	2 1/2	F	-
5	LLA 37	Precursora B	m.o.	3	M	+
6	LLA 127	Precursora B	s.p.	4	F	-
7	LLA 58	Precursora B	s.p.	5	M	+
8	LLA 120	Precursora B	m.o.	5	M	+
9	LLA 123	Precursora B	s.p.	10	M	+
10	LLA 100	Precursora B	m.o.	17	M	+
11	LLA 39	Precursora B	s.p.	18	M	+
12	LLA 46	Precursora B	m.o.	26	M	+
13	LLA 90	Precursora B	s.p.	33	F	+
14	LLA 87	Precursora B	s.p.	72	F	+
15	LLA 36	L A	m.o.	7 d	M	+
16	LLA 107	LA Bifenotípica	m.o.	17	F	+
17	LLA 124	T-cell	m.o.	2	M	-
18	LLA 129	T-cell	m.o.	6	M	-
19	LLA 42	T-cell	s.p.	6	F	+
20	LLA 25	T-cell	m.o.	6	M	-
21	LLA 130	T-cell	m.o.	8	M	-
22	LLA 64	T-cell	s.p.	12	M	-
23	LLA 130	T-cell	m.o.	14	M	-
24	LLA 26	T-cell	m.o.	-	M	+
25	LLA 50	L A monocítica	m.o.	56	M	-
26	LMA 99	L M A	m.o.	9	F	+
27	LB 109	Linfoma Burkitt	m.o.	13	F	-
28	LB 53	Linfoma Burkitt	m.o.	24	F	+
29	LLC 66	LLC	s.p.	18	F	+
30	LLC 63	LLC	s.p.	63	M	-
31	LLA 38	L Megacarioblástica	m.o.	18	M	+

s.p.: Sangre Periférica

m.o.: Médula ósea

Discusión

En la mayoría de las LLA B Precursoras se puede observar una correlación entre el fenotipo y la presencia de reordenamientos VDJ de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Sin embargo, en varios casos de LLA-T también se encuentran estos reordenamientos. Según van Dongen *et al* [234] cuando se analizan los reordenamientos IgH por PCR se puede hallar positividad en un 98% de las LLA- B precursoras y en un 14% de las LLA-T. En nuestro caso hemos encontrado positividad en un 85% de las LLA B Precursoras y en un 25% de las de tipo T, lo que podría deberse a varios factores, como por ejemplo a que en el momento del diagnóstico no se pudo establecer correctamente el linaje solamente por medio de los anticuerpos monoclonales y la clínica.

En concordancia con estudios de otros autores, hallamos que por ser un número escaso, a pesar de pertenecer algunas LLA al linaje T un 14% de ellas pueden presentar reordenamientos en los genes de las inmunoglobulinas.

Los reordenamientos VDJ estudiados en 10 linfomas de tipo B presentaron clonalidad en el 100% de los casos, lo que concuerda con el hecho de que los linfomas B representan estadios de diferenciación más maduros. No se puede descartar que la elección de los primers utilizados, que fueron los preferentemente empleados para analizar linfomas B, también pudo haber influenciado en los resultados obtenidos. De todos modos los resultados concuerdan con los descritos en la literatura.

Los cambios en los reordenamientos de los genes del receptor T en las LLA comprometidas al linaje B también ocurren, pero en menor grado.

Para otros eventos oncogénicos se analizan aberraciones cromosómicas como marcadores específicos, sin embargo la principal limitación de esta técnica radica en que la mayoría de las leucemias agudas no las poseen.

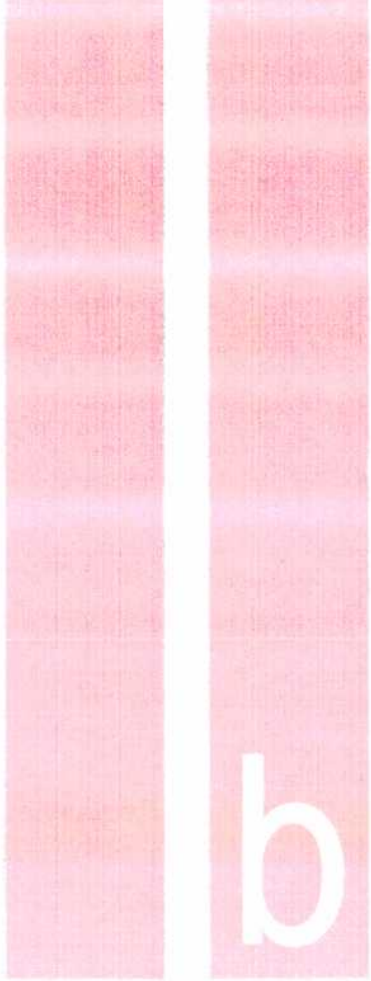
En las LLA-T también se pueden aplicar estas técnicas, sin embargo se necesitan más estudios para evaluar su eficiencia en definir especificidad.

En un futuro la detección de Enfermedad Mínima Residual probablemente dependerá del

inmunofenotipo de la leucemia, presencia de reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y/o del Receptor T y de las aberraciones cromosómicas con marcadores bien definidos.

Conclusiones de la Sección A

- 1 Se encontraron reordenamientos en los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en un 85% de las LLA B precursoras y en un 25% de las de tipo T.
- 2 El diagnóstico fenotípico por medio de los anticuerpos monoclonales no siempre nos indica exactamente la presencia de clonalidad .
- 3 A pesar de pertenecer al linaje T algunas células presentan reordenamientos en los genes de las Inmunoglobulinas.
- 4 En los 10 linfomas de tipo B analizados, los reordenamientos VDJ de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas resultaron visibles, encontrando clonalidad B en todos ellos.



B. ESTUDIO DE LOS REORDENAMIENTOS DEL RECEPTOR T CADENA γ

Introducción

Durante la maduración de los linfocitos T tiene lugar el reordenamiento somático de los genes del TCR. Los productos finales de los genes TCR son las variedades de los heterodímeros $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ [235] El reordenamiento del gen TCR- β en la línea germinal da como resultado una inmensa diversidad, que contribuye al repertorio del TCR para el reconocimiento antigénico. El locus humano para el TCR- γ se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 7 y consiste en sólo 14 segmentos para los genes variables (V), cinco de unión (J) y dos constantes (C) en alrededor de 160 bp. El reordenamiento del gen TCR- γ resulta en una menor diversidad comparado con los genes TCR- β .

Objetivo

El objetivo de esta etapa fue establecer una comparación directa entre la detección de reordenamientos de la cadena γ del receptor T por Southern Blot y por PCR en LLA.

Aunque el Southern Blot sigue siendo la técnica más eficaz para el material fresco o congelado cuando este se halla disponible; nuestros resultados por PCR nos dan una versión más completa en cada caso.

Plan de trabajo

Estudio de los receptores T γ en LLA

En esta etapa se llevaron a cabo estudios sobre los reordenamientos de la cadena γ del receptor T en LLA. Para ello a partir de ADN obtenido de CMT de pacientes se realizaron amplificaciones por PCR de fragmentos correspondientes a la cadena γ TCR para detectar clonidad e identificar el subtipo de reordenamiento V γ por medio de digestiones enzimáticas de los fragmentos amplificados. A su vez también se realizó Southern blot con el objeto de comparar resultados.

Materiales y Métodos

Primers y Sondas de DNA

Como control se utilizó un fragmento del gen de la fibrosis quística del páncreas (F.Q.). El gen de la F.Q. se localiza en el cromosoma 11 humano. Los insertos de DNA se separaron del vector plasmídico por restricción enzimática y se marcaron con [³²P]dCTP usando la técnica de random primer con un kit comercial (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD).

Para la identificación de los reordenamientos de la cadena variable del γ TCR se utilizaron la sonda pH60 [192] y los primers C20/10 y T20/10 [184] que amplifican un fragmento de 400 bp correspondiente a la cadena V₁ reordenada del γ TCR. Posteriormente se utilizaron para la realización de la PCR Multiplex otros primers específicos para los genes TCR γ subtipo V γ I: V2, V3, V4, V8 y V9 [220] y para los J: JGT12 (J1 y J2), JGT3 (J3) y JTG4 (J4) [221].

Primers de oligonucleótidos para TCRG

Se prepararon primers de oligonucleótidos sintéticos. Los dos primers utilizados para el TCRG fueron los siguientes: Primer C20/10 21mer: 5'CCCTCTATTACCTTGGAAATG3'; y Primer T20/10 21mer: 5'TCTTCCAACCTTGGGAAGGGAGA3'. EL Primer C20/10 es complementario a una secuencia de 21-bp (posición 227-247) dentro del segmento del gen J γ 2 y es complementario a la misma región del gen J γ 1 [192]. El Primer T20/10 es idéntico a una secuencia de 21-bp (posición 180-200) dentro del gen V γ 3 y la misma región en los genes V γ 1, V γ 1, V γ 4, V γ 5P y V γ 8 y posee un mismatch de 1-bp con los genes V γ 5 y V γ 7 y otro de 4-bp con el gen V γ 6 [193,234].

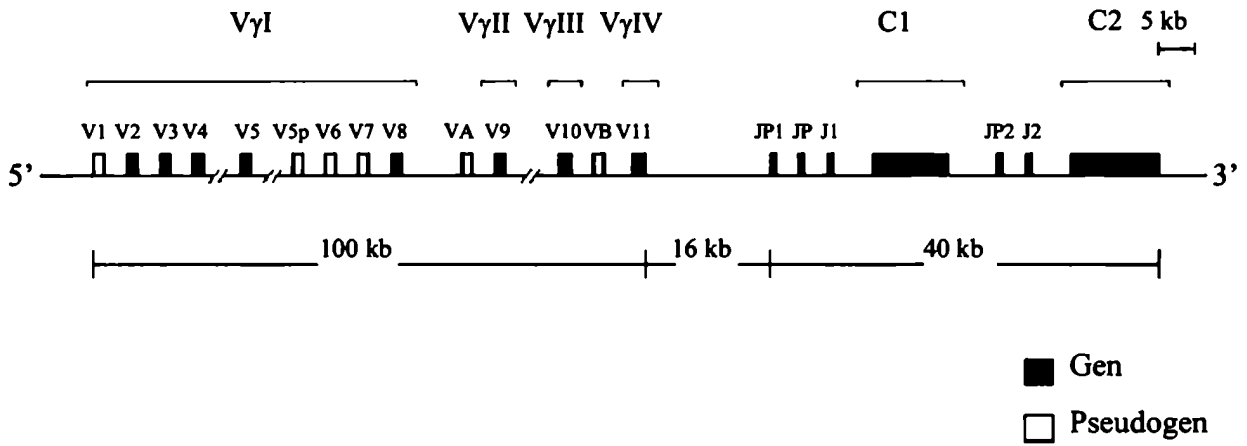
Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de alrededor de 400-bp del locus TCRG reordenado que involucra a los genes del subgrupo V γ 1 y los genes J γ 1/J γ 2 (**Figura 3**).

Amplificación del ADN por reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para TCRG.

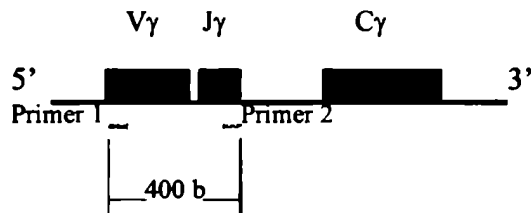
Para la amplificación se utilizaron 50 μ l de la siguiente mezcla de reacción: Tris-HCl pH 8,3 10

Figura 3. Ubicación de los distintos genes de la cadena γ del receptor T en la línea germinal, e identificación del fragmento de 400 bases una vez producido el reordenamiento.

Línea germinal



Fragmento reordenado



mM, KCl 50 mM, Cl_2Mg 1,5 mM, dNTPs 200 μM de cada uno, 1 μM de cada uno de los primer oligonucleótidos más un μg de la muestra de ADN y 2,5 U de la Taq Polimerasa. Se realizaron 25 ciclos repetitivos con un termociclador de ADN Perkin-Elmer/Cetus. Cada ciclo constó de 3 etapas: 1) desnaturalización de 1 minuto a 94°C, 2) apareamiento de los primers de 2 minutos a 55°C, 3) extensión de la cadena de ADN con la Polimerasa Taq a 72°C (3 minutos más 15 segundos acumulativos por ciclo), seguido de 7 minutos a 72°C con un enfriamiento rápido a 4°C. Al finalizar la reacción se tomaron alícuotas de 1 μl de la mezcla de reacción y se realizó una segunda PCR con las siguientes características: 30 ciclos repetitivos; cada uno consistió de las siguientes etapas 1) una desnaturalización de 15 segundos a 94°C, 2) 15 segundos a 55°C y 3) extensión de la cadena de ADN con la Polimerasa Taq 30 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C con un enfriamiento rápido a 4°C.

Desarrollo del método de PCR para TCRG

Luego de optimizar las condiciones se procedió a la identificación de los fragmentos amplificados. La confirmación de que los mismos se originan del fragmento reordenado del TCRG fue realizada utilizando controles conocidos con reordenamientos que involucran a los alelos $V\gamma 1/J\gamma 1/2$ y 6 controles normales, que poseen la configuración de la línea germinal del TCRG, donde no se observaron bandas. Con la técnica de Southern blot se observó la conformación de la línea germinal en estos últimos controles.

PCR Multiplex para TCRG

En este caso se utilizó una mezcla de primers específicos para los genes TCR γ subtipo $V\gamma 1$: V2, V3, V4, V8 y V9 [220] y para los J: JGT12 (J1 y J2), JGT3' (J3) y JTG4 (J4) [221]. Las condiciones de reacción son las siguientes:

50 μl de la siguiente mezcla de reacción: Tris-HCl pH 8,3 10 mM, KCl 50 mM, Cl_2Mg 2,0 mM, Tritón X-100 0,1%, dNTPs 200 μM de cada uno, 10-15 pM de cada uno de los primer oligonucleótidos más 0,5 μg de la muestra de ADN y 2,5 U de la Taq Polimerasa. Luego de un calentamiento inicial (*hot-start*) de 4 minutos a 96°C se realizaron 45 ciclos repetitivos con un termociclador de ADN Perkin-Elmer/Cetus. Cada ciclo constó de 3 etapas: 1) desnaturalización

de 1 minuto a 94°C, 2) apareamiento de los primers de 1 minuto a 64°C, 3) extensión de la cadena de ADN con la Polimerasa Taq a 72°C 1 minuto, seguido de 20 minutos a 72°C con un enfriamiento rápido a 4°C.

Geles de poliacrilamida

Los productos amplificados correspondientes a los segmentos TCRG se identificaron en geles de poliacrilamida al 6%. Los mismos se sembraron con buffer azul de bromofenol 0,042%, xileno cianol 0,042%, glicerol 5%. La electroforesis se realizó a 20 mA en una cuba vertical con buffer TAE. Los resultados se visualizaron por teñido del gel en nitrato de plata.

Coloración con nitrato de plata

El gel se fijó en Metanol 10%, ácido acético 0,5% durante 10 min; se coloreó en una solución de nitrato de plata 0,15% (p/v) durante 10 min; el revelado se realizó en una solución de NaOH 3% y formaldehído 0,3% hasta la aparición de las bandas. Luego se fijó el gel en Metanol 10%, ácido acético 0,5% durante 10 min y se lo dejó secar en papel de filtro envuelto en una película transparente.

Resultados

Detección de reordenamientos en el receptor T

Se analizaron 41 muestras provenientes de pacientes con LLA de ambos sexos, cuyas edades oscilaron entre los 0 y 39 años. Las mismas correspondieron a los distintos subtipos distribuidos de la siguiente manera: dos LLA indiferenciada, 29 LLA precursora B (y una en recaída), ocho LLA T y dos leucemias agudas bifenotípicas; también se analizaron cuatro LMA y un leucoma, un linfoma de Burkitt y un hematoblastoma. En la **Tabla 2** se visualizan las características de los mismos y los resultados obtenidos en ellos.

Southern blot

Se han identificado reordenamientos en la cadena γ del receptor T por medio de la técnica de Southern blot, digiriendo las muestras con *EcoRI* y utilizando la sonda genómico J γ pI160. Se puede observar en la figura 4 que la línea germinal presenta dos bandas, mientras que cuando se producen reordenamientos se ven nuevas bandas. En total se analizaron 32 muestras de LLA al momento del diagnóstico y una en recaída, encontrándose reordenamientos sólo en 20 de las 32 (62,5%) LLA al diagnóstico (**Tabla 2**). La distribución por fenotipo fue la siguiente: LLA indiferenciada 1 de 2 (50%), LLA precursora B 12 de 24 (50%), LLA T 5 de 5 (100%). En la LLA en recaída no se encontraron reordenamientos por Southern blot. La LA bifenotípica a la que se le analizó el TCRG por Southern blot presentó reordenamientos. **Figura 4**

PCR

Desarrollo del método de PCR

Luego de optimizar las condiciones se procedió a la identificación de los fragmentos amplificados. La confirmación de que los fragmentos amplificados se originan del fragmento rearrreglado del TCRG fue realizada utilizando como controles la línea celular CEM-CCRF, con reordenamientos que involucran a los alelos V γ 1/J γ 1/2 y seis controles normales, que poseen la

Figura 4. Southern blot demostrando reordenamientos clonales para la cadena γ del receptor T, en el locus TCRG en muestras de LLA tomadas en el momento del diagnóstico. C: Control normal. Calles 1 a 4: Pacientes con LLA. Se indican la línea germinal (LG) y las bandas reordenadas (flechas).

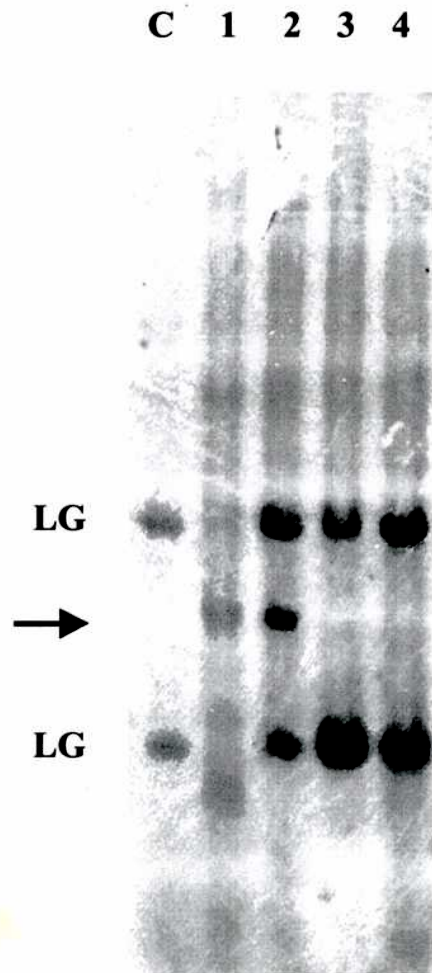


Tabla 2: Reordenamientos de la cadena variable del receptor T γ

Nº	Paciente	Diagnóstico	Material	Edad	Sexo	Southern blot pH60 / EcoR 1	PCR TCRG	Rearreglo V γ I
1	LLA 128	LLA indiferenciada	s.p.	1	M	LG	SI	3 +
2	LLA 31	LLA indiferenciada	m.o.	6	M	R	SI	7 +
3	LLA 92	LLA B precursora	m.o.	2 ½ m	F	LG	NO	-
4	LLA 136	LLA B precursora	m.o.	7 m.	M	LG	SI	1 +
5	LLA 104	LLA B precursora	m.o.	1	F	LG	SI	+
6	LLA 137	LLA B precursora	s.p.	1a 10 m	M	LG	NO	-
7	LLA 121	LLA B precursora	m.o.	2	F	LG	NO	-
8	LLA 133	LLA B precursora	s.p.	3	F	LG	NO	-
9	LLA 145	LLA B precursora	m.o.	3a11m	M	R	SI	+
10	LLA 89	LLA B precursora	m.o.	5	M	LG	SI	1 +
11	LLA 120	LLA B precursora	m.o.	5	M	R	SI	+
12	LLA 127	LLA B precursora	s.p.	5	F	LG	SI	1 +
13	LLA 98	LLA B precursora	m.o.	6	M	R	SI	3 +
14	LLA 102	LLA B precursora	m.o.	7	M	R	SI	-
15	LLA 44	LLA B precursora	s.p.	10	F		SI	6
16	LLA 101	LLA B precursora	m.o.	10	M	LG	SI	-
17	LLA 123	LLA B precursora	s.p.	10	M	R	SI	3 +
18	LLA 80	LLA B precursora	s.p.	12	M		SI	+
19	LLA 81	LLA B precursora	m.o.	12	M		SI	-
20	LLA 138	LLA B precursora	s.p.	12	F	R	SI	-
21	LLA 122	LLA B precursora	m.o.	13	M	R	SI	1
22	LLA 142	LLA B precursora	s.p.	14	M	LG	NO	-
23	LLA 84	LLA B precursora	s.p.	16	M	R	SI	3 o 6 +
24	LLA 39	LLA B precursora	s.p.	18	M	R	SI	-
25	LLA 85	LLA B precursora	m.o.	29	M	R	SI	8 +
26	LLA 90	LLA B precursora	s.p.	33	F		NO	-
27	LLA 95	LLA B precursora	s.p.	39	F	LG	NO	-
28	LLA 146	LLA B precursora	m.o.	< 15	M	R	SI	6 +
29	LLA 148	LLA B precursora	m.o.	< 15	F	R	SI	2 +
30	LLA 9	LLA B precursora	m.o.	< 15	M	LG	SI	+
31	LLA 132	LLA B precursora en recaída	s.p.	< 15	M	LG	NO	-
32	LLA 124	LLA- T	m.o.	2	M	R	SI	1 +
33	LLA 129	LLA- T	m.o.	6	M	R	SI	4 +
34	LLA 130	LLA- T	m.o.	8	M		SI	3 +
35	LLA 139	LLA- T	s.p.	8	M	R	SI	2 +
36	LLA 131	LLA- T	s.p.	10	M		SI	4 +
37	LLA 64	LLA- T	s.p.	12	M		SI	+
38	LLA 45	LLA- T	m.o.	13	M	R	SI	+
39	LLA 149	LLA- T	m.o.	< 15	M	R	SI	2 +
40	LLA 100	LA bifenotípica	m.o.	17	M	R	SI	3 +
41	LLA 107	LA bifenotípica	m.o.	17	M		SI	3 +
42	LLA 72bis	LA o hematoblastoma	s.p.	2 ½	M	LG	NO	-
43	LMA 86	L M A	m.o.	2a7m	F	LG	SI	-
44	LMA 143	L M A	s.p.	4	F	LG		-
45	LMA 97	LMA	m.o.	11	M		SI	1
46	LMA 99	LMA	m.o.	< 15	F	LG		-
47	L147	Leucoma	m.o.	6	M		NO	-
48	LB 109	Linfoma Burkitt	m.o.	13	F	LG	SI	-
49	LB 53	Linfoma Burkitt	m.o.	24	F	R		-
K562	K562	Línea celular					NO	-

LG Línea Germinal
R Reordenamiento
s.p. Sangre Periférica
m.o. Médula ósea

configuración de la línea germinal del TCRG donde no se observaron bandas; también se vio por Southern blot la conformación de la línea germinal en estos últimos controles.

Reordenamientos del locus TCRG en LLA

Usando el método de PCR se amplificaron 40 muestras de ADN provenientes de CMT de pacientes con LLA; se detectaron reordenamientos en el locus TCRG en 33 de 40 (82,5%) LLA en el período de diagnóstico. En una muestra de LLA en recaída no se detectó reordenamiento. La distribución fenotípica es de la siguiente manera: LLA T 8 de 8 (100%), LLA precursora B 23 de 30 (77%) y 2 de 2 (100%) LLA indiferenciadas (Tabla 2). Como control de amplificación por PCR se utilizó una co-amplificación en el primer set con los primers para el fragmento HLA α . En todos los casos se obtuvo la banda correspondiente de 242 pb luego del primer round. Luego del segundo *round* se pudo observar en los casos positivos un fragmento de alrededor de 400 pb de longitud. En la Figura 5 se puede observar el resultado de amplificación de algunas muestras. Las bandas difusas en la región de bajo peso molecular representan probablemente el artefacto de la técnica de PCR llamado dímero de primers. En todos los casos en que se vio reordenamientos por Southern blot se corroboró lo mismo por PCR; mientras que en algunos casos en que por Southern blot se detectó la presencia de la línea germinal por amplificación por PCR se encontraron reordenamientos. Es por ello que el porcentaje de reordenamientos encontrados se eleva en el caso de las LLA precursoras B (77% vs 50%). En el caso de las LMA también se detectaron reordenamientos por PCR, no así por Southern blot, llegando incluso a identificarse en un caso el tipo de reordenamiento.

Análisis de los reordenamientos de la cadena variable

La identificación de los reordenamientos de la cadena variable del locus TCRG en los fragmentos amplificados fue determinada por análisis de restricción. Las enzimas utilizadas en la identificación de cada subgrupo V γ I fueron determinadas analizando las secuencias [193,236] y se muestra en la Figura 6.

El patrón de reordenamiento se limita a aquellos que involucran los cinco genes funcionales de

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de amplificación por PCR de ADN proveniente de muestras de LLA tomadas al momento del diagnóstico. PM: marcador de peso molecular pGEM markers. Calles 1 a 12: Pacientes con LLA. C: Control de H₂O.

PM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 C

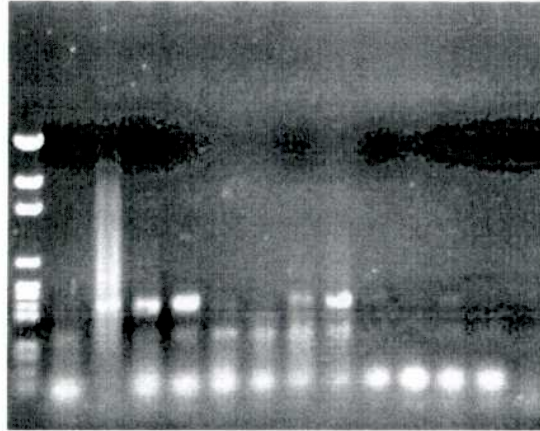
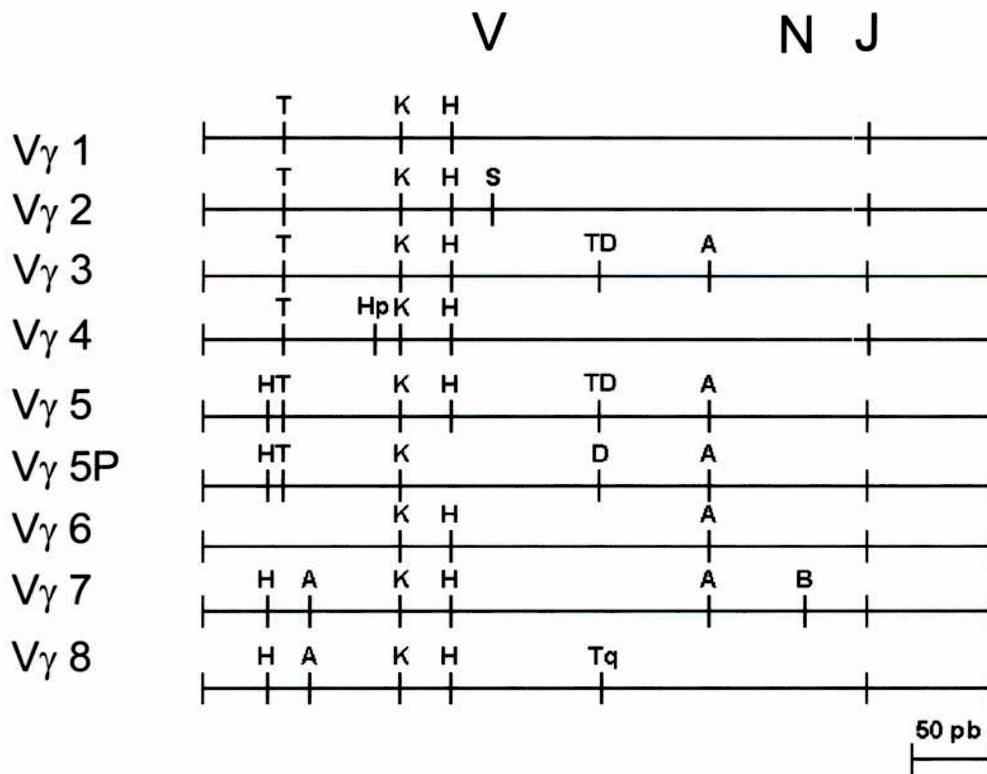


Figura 6. Mapa de restricción de cada producto de PCR resultante de la amplificación de una región de aproximadamente 400 pb que involucra a los genes del subgrupo V γ I y J γ 1/J γ 2. Se visualizan los sitios para las siguientes enzimas de restricción: *Alu* I (A), *Bst*YI (B), *Dde* I (D), *Hae* III (H), *Hpa* II (Hp), *Kpn* I (K), *Sca* I (S), *Taq* I (Tq), y *Tth* 111I (T).



V γ I: V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8, más V γ 7 que es el único pseudogen del subgrupo que presenta reordenamientos. La validez de esta aproximación ya ha sido confirmada por otros grupos por análisis de restricción de la línea celular CEM, con arreglos V γ 3 y V γ 5 ya conocidos y secuenciando los fragmentos amplificados.

Se identificó el subtipo de reordenamiento en 19 de las muestras a las que se les detectó reordenamiento por PCR. En la **Tabla 3** se ilustran las identificaciones correspondientes. Las **Figuras 6 y 7** muestran la identificación en dos de las muestras analizadas y su procedimiento. Se encontraron reordenamientos en las cadenas V γ 1 (5 de 21), V γ 2 (3 de 21), V γ 3 (6 de 21), V γ 4 (2 de 21), V γ 6 (3 de 21) y V γ 7 (1 de 21). En un caso no se pudo identificar si el reordenamiento correspondía a V γ 3 o a V γ 6. Una muestra de LMA presentó reordenamiento V γ 1.

Identificación de los reordenamientos del receptor T

En 21 muestras de LLA se identificó el subtipo de reordenamiento de la cadena γ del receptor T. También en una muestra de LMA

Los productos de PCR de las muestras de LLA representan marcadores clonales porque:

- 1) Sólo se identifican 1 o 2 genes V γ I por análisis de restricción.
- 2) Cuando se utilizan controles normales de CMT (policlonales), al digerirse con las enzimas de restricción se producen digestiones parciales. Sólo se ve pérdida de intensidad en la banda original de 400 pb y bandas tenues correspondientes a los productos de digestión; la digestión fue importante únicamente en presencia de una mezcla de enzimas de restricción; esto indica que los productos de amplificación de ADN normales de CMT son representativos de poblaciones policlonales de células que poseen la cadena γ del receptor T reordenada.

Sólo hemos comprobado por Southern blot la clonalidad de algunas muestras utilizando la sonda genómica de J γ pH60.

Se ha utilizado el panel de enzimas de restricción para identificar los V γ I individuales. En un sólo caso no hemos podido discernir entre dos subtipos: V γ 3 o V γ 6 debido a la imposibilidad de realizar la digestión con la enzima Tth 1111. En la **Tabla 4** se observa el detalle de la

B. γ TCR

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de amplificación por PCR de ADN proveniente de una muestra de LLA. Los productos se analizaron sin digerir (uncut), y luego de digestión con Tth 111I (T), *Hae* III (H), y *Alu* I (A). PM1: marcador de peso molecular pGEM markers. PM2: marcador de peso molecular 100 bp.

PM1 uncut T H A PM2

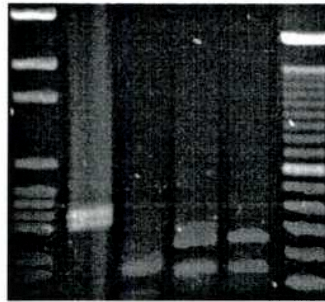


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de amplificación por PCR de ADN proveniente de una muestra de LLA. Los productos se analizaron luego de digestión con Tth 111I y *Hpa* II (T/Hp), *Hae* III (H), y *Alu* I (A). PM: marcador de peso molecular pGEM markers.

PM1 T/Hp A H

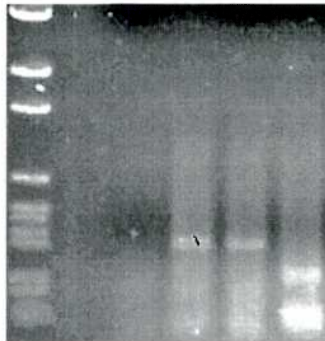


Tabla 3: Reordenamientos de la cadena variable del receptor T γ . Identificación de los distintos subtipos.

Nº	Paciente	Diagnóstico	Material	Edad	Sexo	Rearreglo V γ l
1	LLA 128	LLA indiferenciada	s.p.	1	M	V γ 3
2	LLA 31	LLA indiferenciada	m.o.	6	M	V γ 7
4	LLA 136	LLA B precursora	m.o.	7 m.	M	V γ 1
10	LLA 89	LLA B precursora	m.o.	5	M	V γ 1
12	LLA 127	LLA B precursora	s.p.	5	F	V γ 1
13	LLA 98	LLA B precursora	m.o.	6	M	V γ 3
15	LLA 44	LLA B precursora	s. p.	10	F	V γ 6
17	LLA 123	LLA B precursora	s.p.	10	M	V γ 3
21	LLA 122	LLA B precursora	m.o.	13	M	V γ 1
23	LLA 84	LLA B precursora	s. p.	16	M	V γ 3 o 6
24	LLA 100	LA bifenotípica	m.o.	17	M	V γ 3
25	LLA 107	LA bifenotípica	m.o.	17	M	V γ 3
27	LLA 85	LLA B precursora	m.o.	29	M	V γ 8
30	LLA 146	LLA B precursora	m.o.	< 15	M	V γ 6
31	LLA 148	LLA B precursora	m.o.	< 15	F	V γ 2
34	LLA 124	LLA- T	m.o.	2	M	V γ 1
35	LLA 129	LLA- T	m.o.	6	M	V γ 4
36	LLA 130	LLA- T	m.o.	8	M	V γ 3
37	LLA 139	LLA- T	s.p.	8	M	V γ 2
38	LLA 131	LLA- T	s.p.	10	M	V γ 4
41	LLA 149	LLA- T	m.o.	< 15	M	V γ 2
45	LMA 97	LMA	m.o.	11	M	V γ 1

s.p. Sangre Periférica

m.o. Médula ósea

identificación de cada reordenamiento por análisis de restricción.

La muestra que se ilustra en la **Figura 7** representa reordenamientos que involucran exclusivamente al gen $V\gamma 3$, como queda en evidencia por digestión total con *Tth 1111*. Se ven dos fragmentos (234 pb y 166 pb) al digerirse con *Alu I*. Se descarta la presencia del fragmento $V\gamma 5$, al comprobarse digestión total con *Hae III* dando dos fragmentos de 264 pb y 135 pb (en vez de tres, siendo reemplazado el de 135 por uno de 45 pb y otro de 90 pb).

De manera similar se procedió en la muestra de la **Figura 8**. La digestión positiva con *Hae III* y negativa con *Tth 1111/Hpa II* y *Alu I* nos indica que la muestra ilustrada contiene reordenamientos exclusivos del gen $V\gamma 1$. La presencia del $V\gamma 2$ fue excluida al no presentar el sitio de corte para *Sca I*.

En el caso de la **Figura 9** se examinó un fragmento digerido con *Tth 1111*. Se ve un fragmento de aproximadamente 200 pb, que sería el resultado de un corte con la enzima dando dos fragmentos de tamaño similar. En cambio la digestión con las enzimas de restricción *Sca I* y *BstYI* no arrojó ningún fragmento nuevo. Para diferenciar entre $V\gamma 3$ y $V\gamma 5$ se digirió posteriormente con *Hae III*, obteniéndose dos fragmentos de 265 pb y 135 pb, por lo cual el reordenamiento resultante es el $V\gamma 3$.

Para confirmar estos resultados hemos recurrido a un sistema de PCR Multiplex específico para las familias de genes TCR γ : subgrupo $V\gamma 1$: V2, V3, V4, V8. En aquellos casos negativos para estos reordenamientos se podría tratar de las otras familias de $V\gamma$. Para ello se utilizaron los primers V5 ($V\gamma I$), V9 ($V\gamma II$), V11 ($V\gamma III$) Y V12 ($V\gamma IV$) y los mismos primers J antes usados bajo las mismas condiciones anteriores. Estas últimas familias se expresan en un porcentaje muy bajo dentro de las $V\gamma$. Aquellos casos negativos para $V\gamma 1$ también lo fueron para las otras familias, coincidiendo con nuestros resultados anteriores. Se analizaron en este caso (**Tabla 2**, última columna) 34 LLA, de las cuales 26 presentaban clonalidad TCRG y 8 no. Las 2 indiferenciadas presentaban reordenamientos, las 2 bifenotípicas también, mientras que de las B precursoras sólo 14 de las 21 estudiadas. La LLA B precursora en recaída no presentó alteraciones. Las ocho LLA-T fueron positivas para el TCRG de tipo I. Comparando con el primer ensayo se observa que a pesar de que las reacciones son distintas coinciden los resultados.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de los productos de amplificación por PCR de ADN proveniente de una muestra de LLA. Los productos se analizaron sin digerir (uncut), y luego de digestión con Tth 111I (T), *Sca* I (S), y *Bst*y I (B). PM1: marcador de peso molecular pGEM markers. PM2: marcador de peso molecular 100 bp.

PM1 uncut T S B PM2

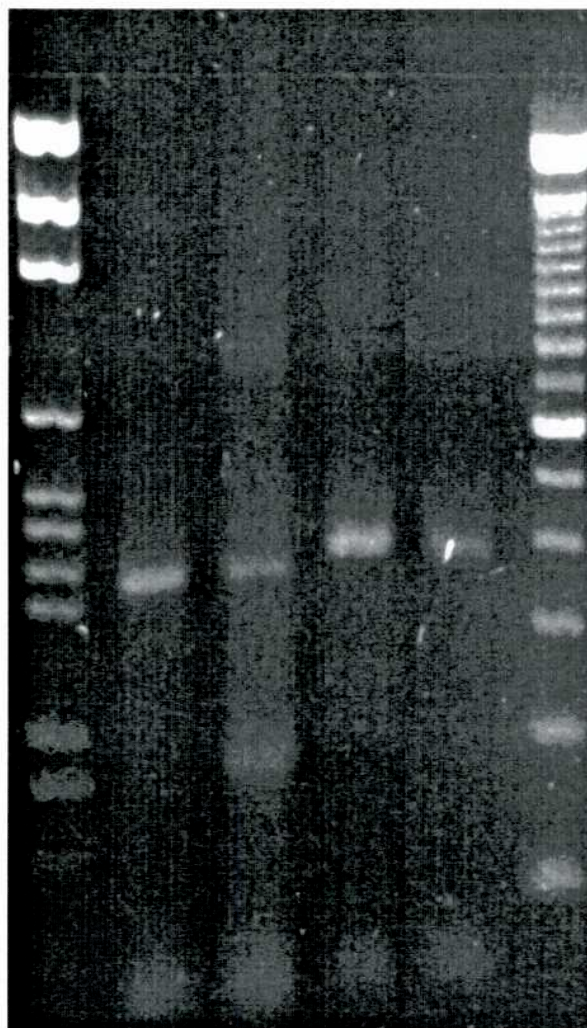


Tabla 4: Análisis de los reordenamientos de la cadena variable del receptor T γ mediante el análisis de restricción de los productos de PCR.

Nº	Paciente	Diagnóstico	Rearreglo V γ I	Digestión enzimática						
1	1	LLA 128	LLA indiferenciada	V γ 3	T +	H +	A +			
2	2	LLA 31	LLA indiferenciada	V γ 7	T -	H +	A +	D -		
3	4	LLA 136	LLA B precursora	V γ 1	T - (350)	H +	A -	Hp -	S -	Tq -
4	10	LLA 89	LLA B precursora	V γ 1	T - (350)	H +	A -	Hp -	S -	Tq -
5	12	LLA 127	LLA B precursora	V γ 1	T - (350)	H +	A +	B -		
6	13	LLA 98	LLA B precursora	V γ 3	T - (350)	H +	A -	Hp -	S -	D +
7	15	LLA 44	LLA B precursora	V γ 6	T -	H +	A +			
8	17	LLA 123	LLA B precursora	V γ 3	T +	H +	A +			
9	21	LLA 122	LLA B precursora	V γ 1	T - (350)	H +	A -	Hp -	S -	Tq -
10	23	LLA 84	LLA B precursora	V γ 3 o 6		H +	A +	B -		
11	27	LLA 85	LLA B precursora	V γ 8	T -	H +	Tq +	Hp -	S -	
12	30	LLA 146	LLA B precursora	V γ 6	T -	H +	A -	Hp -	B -	
13	31	LLA 148	LLA B precursora	V γ 2	T - (350)	H +	A -	Hp -	S +	
14	24	LLA 100	LA bifenotípica	V γ 3	T +	H +	A +			
15	25	LLA 107	LA bifenotípica	V γ 3	T +	H +	A +			
16	34	LLA 124	LLA- T	V γ 1	T - (350)	H +	A -	Hp -	S -	Tq -
17	35	LLA 129	LLA- T	V γ 4	T - (350)	H +	A -	Hp +		
18	36	LLA 130	LLA- T	V γ 3	T +	H +	A +			
19	37	LLA 139	LLA- T	V γ 2	T - (350)	H +	A -	Hp -	S -	
20	38	LLA 131	LLA- T	V γ 4	T - (350)	H +	A -	Hp +		
21	41	LLA 149	LLA- T	V γ 2		H +	A -	Hp -	S -	
22	45	LMA 97	LMA	V γ 1	T - (350)	H +	A -	Hp -	S -	Tq -

A: *Alu* I
 B: *Bst* I
 D: *Dde* I
 H: *Hae* III
 Hp: *Hpa* II
 S: *Sca* I
 Tq: *Taq* I
 T: *Tth* 111I

Discusión

Hemos encontrado reordenamientos de la cadena γ y del receptor T en todos los casos de LLA de tipo T estudiados. Incluso también en un alto porcentaje de los casos de LLA B analizados (77%). Ya sea por Southern blot o por alguno de los métodos de PCR empleados, el resultado fue el mismo. En 19 muestras se identificó el subtipo de receptor V γ 1, lo que sería de suma utilidad si se necesita realizar un seguimiento de la EMR. Es de destacar el alto porcentaje de muestras de LLA B precursoras que presentaron reordenamientos de la cadena γ y del receptor T aún cuando estas sean ontogénicamente pertenecientes a la estirpe B. Otros autores encontraron que sólo un 55% de las LLA B precursoras presentaban reordenamientos de la cadena γ y del receptor T [234].

Si bien estas técnicas poseen sus limitaciones, el análisis inmunológico del fenotipo celular permite la clasificación de las neoplasias y sólo sirve para el seguimiento de la enfermedad mínima residual (EMR) en aquellos casos en que se detectó clonalidad y proporciona resultados excelentes en las LLA-T y gran cantidad de las (75%) LMA, pero está con mayor limitaciones en las LLA de linaje B.

El análisis del fenotipo celular combinado con el de los reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y del receptor T podría llegar a tener una aplicación más completa e integrada en las LLA y una pequeña parte de las LMA. Sin embargo, sólo sería útil para monitorear el clon reordenado identificado en el caso de enfermedad mínima residual y eventuales recaídas.

Si bien en principio se buscó identificar el origen de la clonalidad para una posterior detección de enfermedad mínima residual estos resultados son llamativos desde el punto de vista fenotípico.

Conclusiones de la Sección B

- 1 Se detectaron reordenamientos de la cadena γ y del receptor T en el 100% de las LLA de tipo T analizadas, ya sea por Southern blot o por dos análisis de PCR distintos. En

cambio de las LLA de tipo B un 77% presentó reordenamientos, mostrando que:

1: un reordenamiento de la cadena γ y del receptor T no es suficiente para definir linaje. Probablemente se necesite complementar analizando otro subtipo de receptor como el δ .

2: probablemente algunos reordenamientos detectados permanezcan sin expresión del receptor en membrana.

2 Es posible detectar rápidamente el subtipo de receptor V γ I por medio de digestiones enzimáticas del fragmento analizado por PCR para su posterior seguimiento en caso de EMR

--

conclusión

C. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2

- 1 Se encontraron reordenamientos en los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en un 85% de las LLA B precursoras y en un 25% de las de tipo T.
- 2 El diagnóstico fenotípico por medio de los anticuerpos monoclonales no siempre nos indica exactamente la presencia de clonalidad.
- 3 A pesar de pertenecer al linaje T algunas células presentan reordenamientos en los genes de las Inmunoglobulinas.
- 4 En los 10 linfomas de tipo B analizados los reordenamientos VDJ resultaron visibles, encontrando clonalidad B en todos ellos.
- 5 Se detectaron reordenamientos de la cadena γ y del receptor T en el 100% de las LLA de tipo T analizadas, ya sea por Southern blot o por dos análisis de PCR distintos. En cambio de las LLA de tipo B un 77% presentó reordenamientos, mostrando que:
 - 1: un reordenamiento de la cadena γ y del receptor T no es suficiente para definir linaje. Probablemente se necesite complementar analizando otro subtipo de receptor como el δ .
 - 2: probablemente algunos reordenamientos detectados permanezcan sin expresión del receptor en membrana.
- 6 Es posible detectar rápidamente el subtipo de receptor $V\gamma 1$ por medio de digestiones enzimáticas del fragmento analizado por PCR para su posterior seguimiento en caso de EMR

Utilizando el análisis conjunto de reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y del receptor T se podría llegar a una aplicación más completa en las LLA y un porcentaje de las LMA. Sin embargo, se deben considerar ciertos aspectos de la evolución clonal de los genes de las inmunoglobulinas en las LLA de tipo B, que podría dar origen a resultados erróneos.

Los cambios en los reordenamientos de los genes del receptor T también ocurren, pero en menor

cantidad y en general en la cadena delta, la cual no fue analizada.

Para otros eventos oncogénicos se analizan aberraciones cromosómicas como marcadores específicos, sin embargo la principal limitación de esta técnica radica en que la mayoría de las leucemias agudas no las poseen.

En las LLA-T también se pueden aplicar estas técnicas, sin embargo se necesitan más estudios para evaluar su eficiencia en definir especificidad.

En un futuro la Enfermedad Mínima Residual probablemente dependerá del inmunofenotipo de la leucemia, presencia de reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y/o del Receptor T y de las aberraciones cromosómicas con marcadores bien definidos.

discusión
general

cu

sión

DISCUSIÓN GENERAL

En este estudio se ha presentado la evaluación de una muestra de leucemias agudas reclutadas durante 6 años y se ha tratado de profundizar en la comprensión de su fisiopatología mediante la evaluación genómica y funcional del sistema IFN. Los resultados demuestran la confirmación de datos epidemiológicos ya conocidos de nuestro medio, en lo referente a LLA. La profundización, en términos moleculares, de la fisiopatología de la LLA, muestra que entre 25 y 30 % de los pacientes presentan deleciones o reordenamientos no efectivos de los genes del IFN- α , lo cual se acompaña en ocasiones de una menor capacidad de producción de IFN- α frente a una estimulación máxima con virus Sendai. Ambos resultados apoyan la hipótesis de que el sistema IFN- α es un importante elemento regulador hemopoyético y su perturbación puede contribuir a la progresión del proceso leucémico.

Al tratar de profundizar la comprensión de los mecanismos genéticos involucrados en LLA nos detuvimos en el IFN- α . Esta citoquina, la primera en ser utilizada en terapéutica como producto biotecnológico, sigue arrojando luz sobre la compleja red de interconexiones que unen a las diversas células inmunocompetentes entre sí, incluso desde su producción inicial en la médula ósea.

El IFN consiste en realidad en un grupo de proteínas con capacidad de inducir resistencia antiviral en células de la misma especie. Esta actividad biológica fue descubierta en 1957 y desde entonces se ha demostrado que se debe a varios mediadores diferentes, cada uno de los cuales es un interferón diferente. Actualmente se los subdivide de varias maneras, la más usual los clasifica en interferones α , β y γ .

Los interferones α y β humanos están codificados por un grupo de genes ubicados en el cromosoma 9. Mientras que el IFN- β tiene un solo gen, para el IFN- α hay un grupo de genes (y algunos pseudogenes), en número superior a 20 [237]. Fisiológicamente, el principal productor de IFN- α sería el monocito y en menor medida, el linfocito B. En relación a su producción, el estímulo más importante conocido es el ARN bicatenario (usualmente presente en varias infecciones virales); de allí la importancia que se le atribuye como mecanismo de control de la

diseminación de infecciones virales como la influenza. Sin embargo, esta visión es muy probablemente una simplificación, ya que en los últimos años se ha hecho evidente que uno de los subtipos de IFN- α es producido fundamentalmente por el trofoblasto en los momentos tempranos post-implantación, siendo responsable de inhibir la luteólisis y de esta manera, de permitir la supervivencia del embrión [238]. La concepción más moderna sugiere que los distintos tipos de IFN- α son importantes reguladores de la tasa local de multiplicación celular (probablemente por mecanismos autócrinos) y que forman parte del mecanismo immunoendócrino de la regulación global del organismo (incluyendo acciones de tipo endócrino); en tal concepción es probable que tenga sentido biológico la existencia de tantos subtipos diferentes de IFN- α en un mismo individuo.

El mecanismo de acción de todos los tipos de IFN- α conocidos hasta ahora parece ser el mismo. El primer paso es la unión del IFN- α a receptores específicos, localizados en la membrana celular, en número llamativamente bajo (300 a 700 receptores por célula en los casos estudiados). El gen del receptor está codificado en el cromosoma 21 y ha sido recientemente clonado [239]. Este receptor es multimérico [240] y funcionalmente incluye una subunidad con capacidad de tirosina-kinasa, cuyo sustrato son tres péptidos endógenos que, tras ser fosforilados por la kinasa, se agregan y, junto con un cuarto péptido, constituyen un factor transcripcional, el ISGF-3 (*Interferon Stimulated Gene Factor 3*). Este factor migra entonces al núcleo e interactúa con un elemento de respuesta específico (el ISRE, por *Interferon Stimulated Response Element*) que está presente en un pequeño conjunto de genes. La unión del ISGF-3 al ISRE induce la transcripción de estos genes y la consecuente producción de las proteínas específicamente codificadas en ellos, es la responsable de las acciones biológicas del IFN [241]. Este interesante mecanismo, además de la elegancia intrínseca que presenta, constituye el primer caso conocido en todos sus pasos en que un receptor de membrana no utiliza los clásicos mecanismos de transducción (nucleótidos cíclicos, canales iónicos, etc) sino directamente un factor transcripcional. Su descubrimiento ha sido un paso de excepcional importancia para comprender el funcionamiento del IFN- α y, muy probablemente, de otras citoquinas regulatorias de la hemopoyesis [242].

Desde el descubrimiento del efecto del IFN- α en la tricoleucemia, son varias las lecciones que esta molécula ha dejado acerca del potencial de regulación con citoquinas. Los efectos

antiproliferativos del IFN- α actualmente documentados incluyen el antagonismo de la actividad mitogénica de factores de crecimiento hemopoyéticos, la inducción de detención en G₀/G₁, la supresión de la fosforilación de la proteína Rb (el gen supresor de tumor afectado en el retinoblastoma), la disminución de las ciclinas de G₁ y la ciclina A, la inhibición de la unión del factor transcripcional E2F al ADN y la inhibición de la expresión del oncogén *c-myc* (mecanismos revisados recientemente por Gutterman, 1994 [243]). El ya mencionado descubrimiento de que la delección o inactivación funcional de uno o varios de los genes de IFN- α en la LLA enfatizó la posible importancia de este sistema en el desarrollo, o más probablemente, la progresión, de la LLA. En una muestra de pacientes, nuestros resultados son coincidentes con los resultados de Díaz *et al.* [229], pudiendo estimar una frecuencia de delección y reordenamientos de entre 25 y 30% en los diferentes genes de IFN- α .

Sobre el modelo simplificado antes enumerado, se podría suponer que otro punto significativo de afectación del sistema IFN- α en Oncohematología deberían ser los genes que codifican las distintas subunidades del receptor de IFN- α . Aunque una relación de este tipo se ha encontrado en líneas celulares humanas establecidas de pacientes con leucemias o linfomas [240], su relevancia en material fresco proveniente de pacientes no ha sido aún comunicada; es probable que la extrapolación no sea fácil, habida cuenta de los frecuentes cambios que sufren las líneas celulares en cultivo continuo.

El siguiente punto en base al modelo puede encontrarse a nivel de los factores transcripcionales involucrados en la acción del IFN- α . Existe actualmente una importante evidencia de que este punto es realmente significativo. Es sabido que además del ISGF-3 se requieren otros factores transcripcionales para la completa inducción de genes por IFN- α . Entre ellos están el IRF-1 (por *Interferon Regulatory Factor 1*) y el IRF-2; estos dos factores transcripcionales tienen actividades mutuamente antagónicas: el IRF-1 induce y el IRF-2 reprime los genes regulados por IFN [244]. El IRF-1 se ha encontrado delecionado en mielodisplasia y leucemia aguda con síndrome 5q- (pérdida del brazo largo del cromosoma 5), lo cual constituye una fuerte evidencia de su participación en el proceso de leucemogénesis [245].

La producción de IFN- α por leucocitos mononucleares de sangre periférica de niños con LLA se ha encontrado menor que la de controles normales [246], lo cual coincide con nuestros

resultados preliminares, pese a que las condiciones de estudio eran diferentes. Otro grupo ha comunicado resultados que concuerdan con los obtenidos [230].

La participación del IFN- α y sobre todo, del IRF-1, en la génesis y/o progresión de la mielodisplasia, plantea un modelo interesante para analizar el interjuego de citoquinas, genes supresores de tumor y oncogenes en la leucemogénesis. Los síndromes mielodisplásicos comprenden un grupo heterogéneo de desórdenes de las células hematológicas progenitoras, de origen clonal, caracterizados por la alteración de la maduración, con hemopoyesis ineficaz en una o las tres líneas celulares, con grados variables de citopenias periféricas. Un porcentaje significativo de los pacientes evolucionan a leucemia aguda, por lo que se considera a la mielodisplasia como un cuadro preleucémico. Se ha postulado incluso que parte del defecto puede estar asociado a una deficiente producción de citoquinas por los monocitos [247], que constituyen casualmente la principal fuente de producción de IFN- α .

No en todos los casos con baja producción de interferón se detectó ausencia de los genes del mismo, tal es el caso de la muestra 4 (LLA 100), también con un mínimo de producción, pero sin deleciones detectadas para los genes del interferón y p16. En este caso puede existir alguna mutación puntual no detectable, o alguna modificación post-transcripcional que lleve a alguna conformación distinta. También puede ocurrir que estas células presenten modificaciones en los receptores para interferón, o en alguno de los factores estimulables por el mismo, lo que llevaría a que el proceso de producción no sea el óptimo, ya que el mismo interferón autoinduce su síntesis. En cambio, en el caso de la muestra 1 (LLA 39a), con deleciones en los tres genes, la expresión de interferón α es mínima. En el caso de la muestra 2 (LLA 64) se había visto la falta de algunos subtipos de interferón α ; esto no se corresponde estadísticamente con el nivel de producción, aunque es menor que la media en las LLA analizadas.

Aunque no existen diferencias significativas entre las muestras de LLA y los controles normales, dado la gran diversidad obtenida es posible que la proteína identificada no sea 100% activa, aún en el caso de aquellas muestras con título alto. Hay varias etapas en la regulación de la actividad del interferón y una pequeña alteración en una de ellas llevaría a un desbalance. Como se puede apreciar, la deleción de algunos de los genes del IFN- α no acarrea inevitablemente la pérdida de la capacidad de producir IFN- α frente a la inducción con virus Sendai, lo cual indica

probablemente la capacidad de compensar, frente a una sobreestimulación no fisiológica (el virus Sendai), la carencia de las formas de IFN faltantes con sobreproducción de las restantes.

Algunos pacientes son refractarios al tratamiento con interferón, probablemente aquellos con alteraciones en el sistema interferón. Es posible que en algunos casos su ausencia esté involucrada con la formación neoplásica, mientras que en otros no tenga ningún tipo de relación. Las LLA son muy diversas entre sí y solamente en pequeños porcentajes presenta modificaciones en el sistema de interferón, ya sea en su genoma, en la producción del mismo, o en alguna de las etapas involucradas en la producción del mismo. El interferón podría estar involucrado en alguna de estas neoplasias, ya sea como un gen supresor de tumor y/o asociado a otro gen supresor de tumor.

A pesar de las grandes mejoras en el tratamiento de las LLA, todavía recaen entre un 20 y un 30% de los pacientes recuperados y es muy poco lo que realmente se sabe de su patogénesis

Basados en el concepto de que se pueden encontrar marcadores de clonalidad gracias a los reordenamientos génicos de los receptores B y T, varios investigadores utilizan la técnica de PCR para amplificar un segmento reordenado de los genes de las inmunoglobulinas y del receptor T [211,248,249].

La identificación del clón leucémico al diagnóstico y en la recaída por medio de los reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y del receptor T podría aclarar un poco la heterogeneidad al diagnóstico (proceso de formación de subclones) y en la recaída (selección de subclones) y dentro de la importancia de la detección de EMR por PCR. Sin embargo, hasta el momento sólo unos pocos estudios han sido publicados.

Se sabe que algunos casos cambian su inmunofenotipo luego del diagnóstico, lo que ha llevado a la conclusión de que se pudo haber desarrollado una leucemia secundaria.

Otros autores sugieren que al nivel de genes del TCRG los reordenamientos ocurren constantemente [250]. Sin embargo, los reordenamientos del TCRG, junto con el TCRD serían óptimos para la detección de EMR.

En este estudio se han identificado reordenamientos de la cadena pesada de las inmunoglobulinas

y la cadena γ del receptor T en LLA de tipo B precursora, T e indiferenciadas. Algunas de ellas han sido caracterizadas según el subtipo de V γ I presente. La identificación de los reordenamientos VDJ de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en un 85% de las LLA B precursora y en un 25% de las LLA de tipo T nos lleva a que la clasificación fenotípica basada en la presencia de reordenamientos clonales no siempre es exacta, ya que algunas de las muestras clasificadas como T presentaban reordenamientos B y viceversa.

En síntesis, el análisis fenotípico no es exacto en un 100%, ni la detección de clonalidad significa que ese reordenamiento sea efectivo en todos los casos. Se requiere un análisis en profundidad de cada caso para llegar al diagnóstico adecuado.

CONCLUSIONES GENERALES

Los interferones, principalmente los del tipo I (α y β) son citoquinas que poseen una acción primordialmente antiviral y antiproliferativa. Los leucocitos del sistema hematopoyético son la fuente productora principal del interferon α . En estudios previos se observó que algunas líneas celulares de origen tumoral podían presentar deleciones en el locus de los interferones de tipo I, sugiriendo que podrían estar asociadas a la patogénesis de la neoplasia.

Nuestro propósito fue investigar si los blastos de las leucemias agudas, en particular los pertenecientes al linaje linfoide y de acuerdo al subtipo celular (precursora T, precursora B, o indiferenciada), que están detenidas en un estadio de ontogenia celular eran capaces de producir interferón α .

Los blastos de las leucemias agudas, independiente del linaje celular (mieloide o linfoide T o B) y del estado de diferenciación, al igual que las CMT de sujetos normales no producen espontáneamente interferón y sí al ser inducidos con el virus Sendai. Sin embargo, el rango en la cantidad de interferón producida por los blastos fue muy amplio; sólo en 2 LLA precursoras B (que representó el 10% de las LLA totales estudiadas) la producción fue muy escasa.

Frente a la disparidad en la producción de interferón, el siguiente paso fue investigar si los blastos de las leucemias podían presentar deleciones de los genes que codifican a los interferones de tipo I y tratar de correlacionarlos con la producción de interferón α inducida.

Del total de las LLA sólo el 13% presentaron deleción de los genes del interferón. De ellos, salvo en un caso que sólo estaba afectado el gen del interferón β , el resto presentaba deleciones de ambos genes, tanto del interferón α como del β . Las LLA con deleciones de los genes del interferón correspondieron a un 14% de las LLA T, un 10% de las LLA precursoras B y un 25% de las LLA indiferenciadas, sugiriendo que las deleciones de los genes del interferón son independientes del estadio de diferenciación y del linaje celular. No hubo asociación entre la presencia de deleciones de los genes del interferón y producción del mismo.

Los genes de interferón de tipo I están localizados en el brazo corto del cromosoma 9; próximo a ellos se encuentran los genes supresores de tumor *p15* y *p16*. En algunos tumores sólidos se

hallaron deleciones de dichos genes que sugieren la participación de los mismos en la patogénesis de tumores. Frente a estos hallazgos es que se intentó analizar en las leucemias si podía existir una asociación entre las deleciones observadas de los genes del interferón y a los genes supresores de tumor *p15* y *p16*. Hallamos que el 25% de las LLA presentaron deleciones de los genes que codifican para *p15* y *p16* y siendo más frecuente en las LLA T que en las de tipo B.

A excepción de la LLA que tuvo exclusivamente deleción de interferón β , todas las LLA que tenían deleciones de los genes del interferón de tipo I también presentaron deleciones de *p15* y *p16*. Hubo un 12 % de las LLA totales estudiadas que sólo presenta deleciones de *p15* y *p16*.

En conclusión, si las deleciones en los genes del interferón de tipo I y los genes supresores de tumor *p15* y *p16* pudieran ser factores genéticos condicionantes de tumorigénesis nuestros datos sólo permiten explicar en un 25% de las LLA el desarrollo de la leucemia.

En la segunda parte del trabajo, se presentó la experiencia en el estudio de los reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y del receptor de los linfocitos T en la leucemia aguda. Se comprobó que la detección de clonalidad B o T no define linaje celular. Se encontraron reordenamientos en los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en un 85% de las LLA B Precursoras y en un 25% de las de tipo T. Todos los linfomas de tipo B estudiados presentaron los reordenamientos VDJ clonales de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Se detectaron reordenamientos de la cadena y del receptor T en el 100% de las LLA de tipo T analizadas, ya sea por Southern blot o por dos análisis de PCR distintos. En cambio, de las LLA de tipo B un 77% presentó reordenamientos de la cadena y del receptor T por PCR y un 50% por Southern blot. Estos datos sugieren que un reordenamiento de la cadena y del receptor T no es suficiente para definir linaje celular (las LLA con fenotipo B pueden presentar reordenamientos del receptor T) y para ello es necesario complementarlo con los estudios inmunofenotípicos y citogenéticos, y más aún para identificar las leucemias de linaje mixto o bifenotípicas

Estos resultados constituyen la primera serie de pacientes estudiada en forma sistemática en la Argentina, que en combinación con la inmunotipificación, la citogenética y la clínica, nos posibilitaría acceder a realizar la detección, medición y monitoreo terapéutico de la enfermedad mínima residual en las leucemias agudas y finalmente elaborar estrategias de tratamiento más racionales y efectivas.

bibliografía

bli
o

gra

fía

BIBLIOGRAFÍA

1. Greaves M. F., Chan L. C., *et al.* Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 67, 1. 1986.
2. Smith L. J., Curtis J. E., *et al.* Lineage infidelity in acute leukemia. *Blood* 61, 1138. 1983.
3. Bain B. & Catovsky D. Current concerns in haematology. 2: Classification of acute leukaemia. *J Clin Pathol* 43, 882. 1990.
4. Mirro J. J. Pathology and immunology of acute leukemia. *Leuk* 6, 13. 1992.
5. Fraumeni J. F. Jr. & Manning M. D. Acute leukemia epidemiologic study by cell type of 1263 cases at the Children's Cancer Research Foundation in Boston, 1947-1965. *J Natl Cancer Inst* 46, 461. 1971.
6. Miller R. W. Ethnic differences in cancer occurrence: genetic and environmental influences with particular reference to neuroblastoma. In *Genetics of Human Cancer*, (eds. Mulvihill J. J., Miller R. W., *et al.*), pp. 1-39. Raven Press, New York. 1977
7. Choi S. L. & Simone J. V. Acute nonlymphocytic leukemia in 171 children. *Med. Pediatr. Oncol.* 2, 149. 1976.
8. Miller R. W. Persons with exceptionally high risk of leukemia. *Cancer Res.* 27, 2420. 1967.
9. Young J. L. & Miller R. W. Incidence of malignant tumors in US children. *J. Pediatr.* 86, 254. 1975.
10. Greaves M. F. & Alexander F. E. Review: an infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood? *Leuk* 7, 349. 1993.
11. Crist W. M., Pullen D. J., & Rivera G. K. Acute lymphocytic leukemias. In *Clinical pediatric oncology*, (eds. Fernbach D. J. and Vietti T.) C.V. Mosby, St. Louis. 1988
12. Division of Cancer Prevention and Control & Division of Cancer Treatment 1987 Annual Cancer Statistics Review Including Cancer Trends:1950-1985. In *NIH Publication No. 88-2789*, (ed. NIH), pp. I.i-VI.37., Bethesda, MD. 1987
13. Borella L. & Sen L. Are T-cell malignancies more frequent in younger children? *Pediatrics* 57, 162. 1976.
14. Sullivan J. L. Epstein-Barr virus and lymphoproliferative disorders. *Cell* 64, 337. 1988.
15. Campana D. Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by an overexpression of the bcl-2 protein. *Blood* 81, 1025. 1993.
16. Crist W. M., Campana D., & Pui Ching-H. Acute Lymphoblastic Leukemia. In *Clinical Immunology, Principles and Practice* Vol. II, (eds. Rich R. R., Fleisher T. A., *et al.*), pp. 1708-1729. Mosby, St. Louis, Missouri. 1996
17. Harris L. J. Leukaemia and pregnancy. *Cancer Med Assoc J* 68, 234. 1953.
18. Bene M. C., Castoldi G., *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leuk* 9, 1783. 1995.
19. Carroll A. J., Christ W. M., *et al.* Pre-B cell leukemia associated with chromosomal translocation 1:19. *Blood* 63, 721. 1984.
20. Sen L. & Borella L. Clinical significance of lymphoblasts with T markers in childhood acute leukemia. *N*

Engl J Med 292, 828. 1975.

21. Williams D. L., Tsiatis A., *et al.* Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 60, 864. 1982.
22. Keneko Y., Rowley J. D., *et al.* Correlation of karyotype with clinical features in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res.* 42, 2918. 1982.
23. Prigogina E. L., Fleischmann E. W., *et al.* Chromosomes in acute leukemia. *Hum. Genet.* 53, 5. 1979.
24. van der Berghe H., David G., *et al.* A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Hum. Genet.* 46, 179. 1979.
25. Parkin J. L., Arthur D. C., *et al.* Acute leukemia associated with the t(4;11) chromosome rearrangements: ultrastructural and immunologic characteristics. *Blood* 60, 1321. 1982.
26. Strong R. C., Korsmeyer S. J., *et al.* Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B-lineage and monocytic characteristics. *Blood* 65, 21. 1985.
27. Williams D. L., Look A., *et al.* New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 36, 101. 1984.
28. Michael P. M., Levin M. D., *et al.* Translocation 1;19-a new cytogenetic abnormality in acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 12, 333. 1984.
29. Shima E. A., Le Beau M. M., *et al.* T-cell receptor genes move immediately downstream of *c-myc* in a chromosomal 8;14 translocation in a cell line from a human T-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3439. 1986.
30. Croce C. M., Isobe M., *et al.* The gene for the α -chain of the human T cell receptor is on a region of chromosome 14 involved in translocations and in inversions in T cell neoplasms. *Science* 227, 1044. 1985.
31. Kowalczyk J. & Sandberg A. A. A Possible Subgroup of ALL with 9p-. *Cancer Genet. Cytogenet.* 9, 383. 1983.
32. Chilcote R. R., Brown E., & Rowley J. D. Lymphoblastic Leukemia with Lymphomatous features associated with abnormalities of the short arm of chromosome 9. *N Engl J Med* 313, 286. 1985.
33. Rowley J. D. & Testa J. R. Chromosome abnormalities in malignant hematologic diseases. *Adv. Cancer Res.* 36, 103. 1982.
34. Rowley J. D. Mapping of human chromosomal regions related to neoplasia: evidence from chromosomes 1 and 17. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5729. 1977.
35. Vainchenker W., Villeval J. L., *et al.* Immunophenotype of leukemic blasts with small peroxidase-positive granules detected by electron microscopy. *Leuk* 2, 274. 1988.
36. Matutes E., Pombo de Oliveira M., *et al.* The role of ultrastructural cytochemistry and monoclonal antibodies in clarifying the nature of undifferentiated cells in acute leukaemia. *Br. J. Haematol* 69, 205. 1988.
37. Chen S. J., Flandrin G., *et al.* Philadelphia-positive acute leukemia: lineage promiscuity and inconsistently rearranged breakpoint cluster region. *Leuk* 2, 261. 1988.
38. Carbonell F., Swansbury J., *et al.* Cytogenetic findings in acute biphenotypic leukaemia. *Leuk* 10, 1283. 1996.

39. Morris T. C. M., McNeill T. A., *et al.* Inhibition of normal in vitro-colony forming cells by cells from leukaemic patients. *Br. J. Cancer* 31, 641. 1975.
40. Watson J. D., Hopkins N. H., *et al.* The generation of immunological specificity. In *Molecular Biology of the Gene*, (ed. Gillen J. R.), p. 832. Menlo Park, CA. 1988
41. Strominger J. L. Developmental biology of T cell receptors. *Science* 244, 943. 1989.
42. Lieber M. R. The mechanism of V(D)J recombination: a balance of diversity, specificity, and stability. *Cell* 70, 873. 1992.
43. Waldmann T. A., Davis M. M., *et al.* Rearrangements of genes for the antigen receptor on T cells as markers of lineage and clonality in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 313, 776. 1985.
44. Griffin J., Ritz J., *et al.* Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells. *J. Clin. Invest.* 68, 932. 1981.
45. McCaffrey R., Harrison R. A., *et al.* Terminal deoxynucleotidyl transferase activity in human leukemic cells and in normal human thymocytes. *N Engl J Med* 292, 775. 1975.
46. Kalwinsky D. K., Weatherred W. H., *et al.* Clinical utility of initial terminaldeoxynucleotidyl transferase determinations in childhood acute leukemias. *Cancer Res.* 41, 2877. 1981.
47. Bloomfield C. D. Glucocorticoid receptors in leukemia and lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2, 323. 1984.
48. Reinherz E. L. & Schlossman S. F. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 19, 821. 1980.
49. Reinherz E. L., Kung P. C., *et al.* Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1588. 1980.
50. Koehler M., Behm F., *et al.* Transitional pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood is associated with favorable prognostic clinical features and an excellent outcome: a Pediatric Oncology Group study. *Leuk* 7, 2064. 1993.
51. Harris H., Miller O. J., *et al.* Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature* 223, 363. 1969.
52. Weinberg R. A. The Molecular Basis of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Ann N Y Acad Sci* 758, 331. 1995.
53. Knudson A. G. J. Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 820. 1971.
54. Fearon E. R., Cho K. R., *et al.* Identification of a Chromosome 18q Gene that is Altered in Colorectal Cancers. *Science* 247, 49. 1989.
55. Weinberg R. A. Tumor Suppressor Genes. *Science* 254, 1138. 1991.
56. Harris C. C. p53: At the Crossroads of Molecular Carcinogenesis and Risk Assessment. *Science* 262, 1980. 1993.
57. Owerbach D., Rutter W. J., *et al.* Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3123. 1981.
58. Shows T. B., Sakaguchi A. Y., *et al.* Clustering of leukocyte and fibroblast interferon genes of human chromosome 9. *Science* 218, 373. 1982.
59. Lawn R. M., Gross M., *et al.* DNA sequence of a major human leukocyte interferon gene. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA* 78, 5435. 1981.
60. Isaacs D., Clarke J. R., *et al.* Deficient production of leucocyte interferon (interferon- α) in vitro and in vivo in children with recurrent respiratory tract infections. *Lancet* II, 950. 1981.
 61. Virelizier J. L., Lenoir G., & Griscelli C. Persistent Epstein-Barr virus infection in a child with hypergammaglobulinaemia and immunoblastic proliferation associated with a selective defect in interferon secretion. *Lancet* II, 231. 1978.
 62. Trent J. M., Osson S., & Lawn R. M. Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7809. 1982.
 63. Díaz M. O., Le Beau M. M., *et al.* Interferon and *c-ets 1* genes in the translocation (9;11)(p22;q23) in human acute monocytic leukemia. *Science* 231, 265. 1986.
 64. Ohlsson M., Feder J., *et al.* Close linkage of alpha and beta interferons and infrequent duplication of beta interferon in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4473. 1985.
 65. Fountain J. W., Karayiorgou M., *et al.* Genetic and physical map of the interferon region on chromosome 9p. *Genomics* 14, 105. 1992.
 66. Olopade O. I., Bohlander S. K., *et al.* Mapping of the Shortest Region of Overlap of Deletions of the Short Arm of Chromosome 9 Associated with Human Neoplasia. *Genomics* 14, 437. 1992.
 67. Diaz M. O., Bohlander S. K., & Allen G. Nomenclature of the human interferon genes. *J. Interferon Cytokine Res* 16, 179. 1996.
 68. Wilson V., Jeffreys A. J., *et al.* A comparison of vertebrate interferon genes families detected by hybridization with human interferon DNA. *J. Mol. Biol.* 166, 457. 1983.
 69. Pestka S., Langer J. A., *et al.* Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 727. 1987.
 70. Weissmann C. & Weber H. The Interferon Genes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 33, 251. 1986.
 71. Kontsek P., Borecky L., *et al.* Antigenic link between human interferons-alpha and -beta: The common epitope I. *J. Interferon Res.* 10, 119. 1990.
 72. Durum S. K. & Muegge K. Cytokines linking immune and inflammatory systems: IL-1, TNF, IL-6, IFN- $\alpha\beta$ and TGF- β . In *Clinical Immunology. Principles and Practice* Vol. 1, (eds. Rich R. R., Fleisher T. A., *et al.*), pp. 350-362. Mosby, St. Louis, Missouri. 1996
 73. Miyamoto M., Fujita T., *et al.* Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- β gene regulatory elements. *Cell* 54, 903. 1988.
 74. Harada H., Fuyita T., *et al.* Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58, 729. 1989.
 75. Sehgal P. B., Zilberstein A., *et al.* Human chromosome 7 carries the beta-2 interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5219. 1986.
 76. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 253. 1990.
 77. Taniguchi T., Mantei N., *et al.* Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. *Nature* 285, 547. 1980.
 78. Ayala F. J. Filogenias y macromoléculas. In *Evolución*, pp. 262-311. Ediciones Omega, Barcelona. 1980
 79. Miyata T., Hayashida H., *et al.* Evolution of Interferon Genes. *Interferon* 6, 1. 1985.

80. Gillespie D. & Carter W. Concerted evolution of human interferon alpha. *J. Interferon Res.* 3, 83. 1983.
81. Dover G., Brown S., *et al.* The dynamics of genome evolution and species differentiation. In *Genome evolution*, The systematics association special volume ed. Vol. 20, (ed. Dover & Flavell), pp. 343-372. Academic Press, London. 1982
82. Jeffreys A. J. Evolution of globin genes. In *Genome Evolution* Vol. 20, (ed. Dover & Flavell), pp. 157-176. Academic Press, London. 1982
83. De Grado W. F., Wasserman Z. R., & Chowdhry V. Sequence and structural homologies among type I and type II interferons. *Nature* 300, 379. 1982.
84. Epstein L. B. Interferon-Gamma: success, structure and speculation. *Nature* 295, 453. 1982.
85. Nagata S., Mantei N., & Weissmann C. The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes of human interferon-alpha. *Nature* 287, 401. 1980.
86. Chen B. D. & Najor F. Macrophage activation by interferon α and β is associated with a loss of proliferative capacity. *Cell Immunol* 106, 343. 1987.
87. Sztejn M. B., Steeg P. S., *et al.* Regulation of human peripheral blood monocyte DR antigen expression in vitro by linfokines and recombinant interferon. *J. Clin. Invest.* 73, 556. 1984.
88. Rhodes J., Ivanyi P., & Cozens P. Antigen presentation by human monocytes: effects of modifying MHC class II antigen expression and IL-1 production by using recombinant interferons and corticosteroids. *Eur. J. Immunol.* 16, 370. 1988.
89. Fersch D., Schoenberg D. R., *et al.* Induction of macrophage Ia antigen expression by rIFN-gamma and down-regulation by IFN-alpha/beta and dexamethasone are mediated by changes in steady-state levels of Ia mRNA. *J. Immunol.* 139, 244. 1987.
90. Cederblad B., Riesenfeld T., & Alm G.-V. Deficient Herpes Simplex Virus-induced interferon- α production by blood leukocytes of preterm and term newborn infants. *Pediatr. Res.* 27, 7. 1990.
91. Hayden F. G. Interferons. In *Principles and practice of infectious diseases*, (eds. Mandel G. L., Dpuglas R. G. J., and Bennet J. E.) Churchill Livingstone, New York. 1989
92. Bowden R. A., Dobbs S., *et al.* Comparison of interleukin 2 and gamma interferon production by peripheral blood mononuclear cells in response to cytomegalovirus after marrow transplantation. *Transplantation* 50, 38. 1990.
93. Watting D., Guschin D., *et al.* Complementation by the protein kinase Jak2 of a mutant cell line defective in interferon- τ signal transduction pathway. *Nature* 366, 166. 1993.
94. Sen G. C. & Lengyel P. The Interferon System: A bird's eye view of its Biochemistry. *J. Biol. Chem.* 267, 5017. 1992.
95. Revel M. Genetic and functional diversity of interferons in man. In *Interferon* Vol. 5, pp. 205-239. Academic Press, London. 1983
96. Hiscott J., Cantell K., & Weissmann C. Differential expression of human interferon genes. *Nucleic Acid Res.* 12, 3727. 1984.
97. Goren T., Fischer D. G., & Rubinstein M. Human monocytes and lymphocytes produce different mixtures of alpha-interfeon subtypes. *J. Interferon Res.* 6, 323. 1986.
98. Rubinstein M. Multiple Interferon subtypes: The Phenomenon and its Relevance. *J. Interferon Res.* 7, 545.

- 1987.
99. Tovey M. G., Streuli M., *et al.* Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5038. 1987.
 100. Duc-Goiran P., Robert-Galliot B., *et al.* Unusual apparently constitutive interferons and antagonist in human placental blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5010. 1985.
 101. Preble O. T., Black R. J., *et al.* Systemic Lupus Erythematosus: Presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* **216**, 429. 1982.
 102. Capobianchi M. R., De Marco F., *et al.* Acid-labile human interferon alpha production by peripheral blood mononuclear cells stimulated by HIV-infected cells. *Arch. Virol.* **99**, 9. 1988.
 103. Dianzani F., Dolei A., & Di Marco P. A new type of human Interferon produced by peripheral blood mononuclear cells treated with inhibitors of transcription. *J. Interferon Res.* **6**, 43. 1986.
 104. Weissenbach J., Chernajovsky Y., *et al.* Two interferon mRNA in human fibroblasts: In vitro translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7152. 1980.
 105. May L. T., Landsberger M., *et al.* Significance of similarities in patterns: an application to beta interferon-related DNA on human chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 4090. 1985.
 106. Sagar A. D., May L. T., & Sehgal P. B. Rearrangement and amplification of human interferon-beta-related DNA. *Genome Rearrang.* **253**. 1985.
 107. Naylor S. L., Sakaguchi A. Y., *et al.* Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J. Exp. Med.* **157**, 1020. 1983.
 108. Gray P. W. & Goeddel D. V. Structure of the Human Immune Interferon gene. *Nature* **298**, 859. 1982.
 109. Rinderknecht E., O'Connor B. H., & Rodriguez H. Natural Human Interferon-Gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J. Biol. Chem.* **259**, 6790. 1984.
 110. Pestka S., Kelder B., *et al.* Molecular weight of the functional unit of human leukocyte, fibroblast, and immune interferons. *J. Biol. Chem.* **258**, 9706. 1983.
 111. Sherr C. J. & Roberts J. M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Dev* **9**, 1149. 1995.
 112. Uchida T., Kinoshita T., *et al.* *CDKN2 (MTS1/p16^{INK4})* gene alterations in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma* **24**, 449. 1997.
 113. Xiong Y., Hannon G. J., *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701. 1993.
 114. Polyak K., Lee M. H., *et al.* Cloning of *p27^{kip1}* a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 59. 1994.
 115. Lee M. H., Reynisdottir I., & Massague J. Cloning of *p57^{KIP2}*, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes & Dev* **9**, 639. 1995.
 116. Serrano M., Hannon G. J., & Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704. 1993.
 117. Hannon G. J. & Beach D. *p15^{INK4B}* is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature* **371**, 257. 1994.
 118. Guan K. L., Jenkins C. W., *et al.* Growth suppression by p18, a p16^{INK4}/MTS1- and p15^{INK4B}/MTS2-related

- CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes & Dev* 8, 2939. 1994.
119. Hirai H., Roussel M. F., *et al.* Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2672. 1995.
 120. Meyerson M. & Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2077. 1994.
 121. Hall M., Bates S., & Peters G. Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene* 11, 1581. 1995.
 122. Kamb A., Gruis N. A., *et al.* A Cell Cycle Regulator Potentially Involved in Genesis of Many Tumor Types. *Science* 264, 436. 1994.
 123. Nobori T., Miura K., *et al.* Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368, 753. 1994.
 124. Tam S. W., Shay J. W., & Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4}. *Cancer Res.* 54, 5816. 1994.
 125. Stone S., Jiang P., *et al.* Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res.* 55, 2988. 1995.
 126. Mao L., Merlo A., *et al.* A novel p16^{INK4A} transcript. *Cancer Res.* 55, 2995. 1995.
 127. Hirama T. & Koeffler H. P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86, 841. 1995.
 128. Fueyo J., Gomez-Manzano C., *et al.* Adenovirus-mediated p16/CDKN2 gene transfer induces growth arrest and modifies the transformed phenotype of glioma cells. *Oncogene* 12, 103. 1996.
 129. Okamoto A., Hussain P. S., *et al.* Mutations in the p16^{INK4}/MTS1/CDKN2, p15^{INK4B}/MTS2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res.* 55, 1448. 1995.
 130. Takeuchi S., Bartram C. R., *et al.* Analysis of a Family of CDK Inhibitors: p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 Genes in ALL of Childhood. *Blood* 86, 755. 1995.
 131. Shiohara M., el-Deiry W. S., *et al.* Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 84, 3781. 1994.
 132. Ponce-Castaneda M. V., Lee Mong-H., *et al.* p27^{Kip1}: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res.* 55, 1211. 1995.
 133. Otterson G. A., Kratzke R. A., *et al.* Absence of p16^{INK4} protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype Rb. *Oncogene* 9, 3375. 1994.
 134. Schmidt E. E., Ichimura K., *et al.* CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res.* 54, 6321. 1994.
 135. Knudson A. G. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10914. 1993.
 136. Hussussian C. J., Struewing J. P., *et al.* Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature genetics* 8, 15. 1994.
 137. Zuo L., Weger J., *et al.* Germline mutations in the p16^{INK4A} binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature genetics* 12, 97. 1996.
 138. Reed J. A., Loganzo F. J., *et al.* Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor

- suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res.* 55, 2713. 1995.
139. Nishikawa R., Furnari F. B., *et al.* Loss of $p16^{INK4}$ expression is frequent in high grade gliomas. *Cancer Res.* 55, 1941. 1995.
 140. Tenam M., Benedetti S., & Finicchiario G. Deletion and transfection analysis of the $p15/MTS2$ gene in malignant gliomas. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 195. 1995.
 141. Glendening J. M., Flores J. F., *et al.* Homozygous loss of the $p15^{INK4B}$ gene (and not the $p16^{INK4}$ gene) during tumor progression in a sporadic melanoma patient. *Cancer Res.* 55, 5531. 1995.
 142. Heyman M., Rasool O., *et al.* Exclusive $p15^{INK4B}$ gene deletions in acute lymphocytic leukemia include the E1 beta exon of the $p16^{INK4}$ gene. *Blood* 87, 1657. 1996.
 143. Weinberg R. A. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J. Clin.* 44, 160. 1994.
 144. Cairns P., Polascik T. J., *et al.* Frequency of homozygous deletion at $p16/CDKN2$ in primary human tumours. *Nature genetics* 11, 210. 1995.
 145. Merlo A., Herman J. G., *et al.* 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor $p16/CDKN2/MTS1$ in human cancers. *Nature Medicine* 1, 686. 1995.
 146. Mori T., Miura K., *et al.* Frequent somatic mutation of the $MTS1/CDK41$ gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 54, 3396. 1994.
 147. Ogawa S., Hangaishi A., *et al.* Loss of the Cyclin-Dependent Kinase 4-Inhibitor ($p16:MTS1$) Gene Is Frequent in and Highly Specific to Lymphoid Tumors in Primary Human Hematopoietic Malignancies. *Blood* 86, 1548. 1995.
 148. Okuda T., Shurtleff S. A., *et al.* Frequent Deletion of $p16INK4A/MTS1$ and $p15INK4B/MTS2$ in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 85, 2321. 1995.
 149. Cayuela J. M., Madani A., *et al.* Multiple tumor-suppressor gene 1 inactivation is the most frequent genetic alteration in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 87, 2180. 1996.
 150. Fizzotti M., Cimino G., *et al.* Detection of Homozygous Deletions of the Cyclin-Dependent Kinase 4 Inhibitor ($p16$) Gene in Acute Lymphoblastic Leukemia and Association With Adverse Prognostic Features. *Blood* 85, 2685. 1995.
 151. Imamura J., Miyoshi I., & Koefler H. P. $p53$ in hematologic malignancies. *Blood* 84, 2412. 1994.
 152. Stranks G., Height S. E., *et al.* Deletions and Rearrangements of $CDKN2$ in Lymphoid Malignancy. *Blood* 85, 893. 1995.
 153. Hatta Y., Hiramata T., *et al.* Homozygous Deletions of the $p15 (MTS2)$ and $p16 (CDKN2/MTS1)$ Genes in Adult T-Cell Leukemia. *Blood* 85, 2699. 1995.
 154. Sill H., Goldman J. M., & Cross N. C. P. Homozygous Deletions of the $p16$ Tumor-Suppressor Gene Are Associated With Lymphoid Transformation of Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* 85, 2013. 1995.
 155. Serra A., Gottardi E., *et al.* Involvement of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor ($CDKN2$) gene in the pathogenesis of lymphoid blast crisis of chronic myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol* 91, 625. 1995.
 156. Otsuki T., Clark H. M., *et al.* Involvement of $CDKN2 (p16INK4A/MTS1)$ and $p15INK4B/MTS2$ in Human Leukemias and Lymphomas. *Cancer Res.* 55, 1436. 1995.

157. Haidar M. A., Cao Xiao-B., *et al.* $p16^{\text{ink4A}}$ and $p15^{\text{ink4B}}$ Gene Deletions in Primary Leukemias. *Blood* **86**, 311. 1995.
158. Quesnel B., Preudhomme C., *et al.* $p16$ Gene Homozygous Deletions in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **85**, 657. 1995.
159. Croce C. M., Shander M., *et al.* Chromosomal location of the genes for human immunoglobulin heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3416. 1979.
160. Smith M., Krinsky A., *et al.* Confirmation of the assignment of genes for human immunoglobulin heavy chains to chromosome 14 by analyses of Ig synthesis by man-mouse hybridomas. *Eur. J. Immunol.* **11**, 852. 1981.
161. Davis M. M., Calame K., *et al.* An immunoglobulin heavy-chain gene is formed by at least two recombinational events. *Nature* **283**, 733. 1980.
162. Klein G. The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. *Nature* **294**, 313. 1981.
163. Lenoir G. M., Preud'homme J. L., *et al.* Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. *Nature* **298**, 474. 1982.
164. Hofker M. H., Walter M. A., & Cox D. W. Complete physical map of the human immunoglobulin heavy chain constant region gene complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5567. 1989.
165. Bottaro A., de Marchi M., *et al.* Pulsed-field gel analysis of human immunoglobulin heavy-chain constant region gene deletions reveals the extent of unmapped regions within the locus. *Genomics* **4**, 505. 1989.
166. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575. 1983.
167. Coleclough C. Chance, necessity and antibody gene dynamics. *Nature* **303**, 23. 1983.
168. Yanagi Y., Yoshikai Y., *et al.* A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* **308**, 145. 1984.
169. Siu G., Clark S. P., *et al.* The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. *Cell* **37**, 393. 1984.
170. Sim G. K., Yague Y., *et al.* Primary structure of human T-cell receptor alpha-chain. *Nature* **312**, 771. 1984.
171. Waldmann T. A., Korsmeyer S. J., *et al.* NIH conference. Molecular genetic analysis of human lymphoid neoplasms. Immunoglobulin genes and the *c-myc* oncogene. *Annals of Internal Medicine* **102**, 497. 1985.
172. Yoshikai Y., Anatoniou D., *et al.* Sequence and expression of transcripts of the human T-cell receptor beta-chain genes. *Nature* **312**, 521. 1984.
173. Sims J. E., Tunnacliffe A., *et al.* Complexity of human T-cell antigen receptor beta-chain constant- and variable-region genes. *Nature* **312**, 541. 1984.
174. Toyonaga B., Yanagi Y., *et al.* Rearrangements of T-cell receptor gene *YT35* in human DNA from thymic leukaemia T-cell lines and functional T-cell clones. *Nature* **311**, 385. 1984.
175. Yanagi Y., Chan A., *et al.* Analysis of cDNA clones specific for human T cells and the alpha and beta chains of the T-cell receptor heterodimer from a human T-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3430. 1985.
176. Korsmeyer S. J., Arnold A., *et al.* Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell precursor origins. *J. Clin. Invest.* **71**, 301. 1983.

177. Arnold A., Cossman J., *et al.* Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 309, 1593. 1983.
178. Korsmeyer S. J. & Waldmann T. A. Immunoglobulin genes: rearrangement and translocation in human lymphoid malignancy. *J Clin Immunol* 4, 1. 1984.
179. Flug F., Pelicci P. C., *et al.* T-cell receptor gene rearrangements as markers of lineage and clonality in T-cell neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3460. 1985.
180. Kitchingman G. R., Rovigatti U., *et al.* Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 65, 725. 1985.
181. Rovigatti U., Mirro J. J., *et al.* Heavy chain immunoglobulin gene rearrangement in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 63, 1023. 1984.
182. O'Connor N. T., Wainscoat J. S., *et al.* Rearrangement of the T-cell-receptor beta-chain gene in the diagnosis of lymphoproliferative disorders. *Lancet* 1, 1295. 1985.
183. Hirsch-Ginsberg C., Huh Y. O., *et al.* Advances in the diagnosis of Acute Leukemia. *Hem/Onc Clin of NA* 7, 1. 1993.
184. Taylor J. J., Rowe D., *et al.* Detection of T-Cell Receptor γ Chain V Gene Rearrangements Using the PCR: Application to the Study of Clonal Disease Cells in ALL. *Blood* 77, 1989. 1991.
185. Saito H., Kranz D. M., *et al.* A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 312, 36. 1984.
186. Brenner M. B., McLean J., *et al.* Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322, 145. 1986.
187. Bank I., DePinho R. A., *et al.* A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature* 322. 1986.
188. Weiss A., Newton M., & Crommie D. Expression of T3 in association with a molecule distinct from the T-cell antigen receptor heterodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83. 1986.
189. Rabbitts T. H., Lefranc M. P., *et al.* The chromosomal location of T-cell receptor genes and a T cell rearranging gene: possible correlation with specific translocations in human T cell. *EMBO J.* 4, 1461. 1985.
190. Murre C., Waldmann R. A., *et al.* Human gamma-chain genes are rearranged in leukaemic T cells and map to the short arm of chromosome 7. *Nature* 316, 549. 1985.
191. Bensmana M., Mattei M. G., & Lefranc M. P. Localization of the human T-cell receptor gamma locus (TCRG) to 7p14---p15 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 56, 31. 1991.
192. Lefranc M. P. & Rabbitts T. H. Two tandemly organized human genes encoding the T-Cell γ constant-region sequences show multiple rearrangement in different T-cell types. *Nature* 316, 464. 1985.
193. Lefranc M. P., Forster A., *et al.* Diversity and rearrangement of the human T-cell γ genes: Nine germline variable genes belonging to two subgroups. *Cell* 45, 237. 1986.
194. Brenner M. B., McLean J., *et al.* Two forms of the T-cell receptor gamma protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 325, 689. 1987.
195. Borst J., van de Griend R. J., *et al.* A T-cell receptor gamma/CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. *Nature* 325, 638. 1987.
196. Strauss W. M., Quertermous T., & Seidman J. G. Measuring the human T cell receptor gamma-chain locus.

- Science* 237. 1987.
197. Lefranc M. P., Forster A., & Rabbitts T. H. Genetic polymorphism and exon changes of the constant regions of the human T-cell rearranging gene gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9596. 1986.
 198. Forster A., Huck S., *et al.* New subgroups in the human T cell rearranging V gamma gene locus. *EMBO J.* 6, 1945. 1987.
 199. Querternous T., Strauss W. M., *et al.* Human T-cell gamma chain joining regions and T-cell development. *J. Immunol.* 138, 2687. 1987.
 200. Huck S. & Lefranc M. P. Rearrangements to the JP1, JP and JP2 segments in the human T-cell rearranging gamma gene (TRG gamma) locus. *FEBS Lett.* 224, 291. 1987.
 201. Tighe L., Forster A., *et al.* Unusual forms of T cell gamma mRNA in a human T cell leukemia cell line: implications for gamma gene expression. *Eur J Immunol* 17. 1987.
 202. Lefranc M. P., Chuchana P., *et al.* Molecular mapping of the human T cell receptor gamma (TRG) genes and linkage of the variable and constant regions. *Eur. J. Immunol.* 19, 898. 1989.
 203. Ghanem N., Buresi C., *et al.* Deletion, insertion, and restriction site polymorphism of the T-cell receptor gamma variable locus in French, Lebanese, Tunisian, and black African populations. *Immunogenetics* 30, 350. 1989.
 204. Fox V. L., Strauss W. M., & Seidman J. G. Isolation and restriction map of the V-J interval of the human T cell receptor gamma chain locus. *Genomics* 4, 445. 1989.
 205. Tycko B., Palmer J. D., & Sklar J. T cell receptor gene trans-rearrangements: chimeric gamma-delta genes in normal lymphoid tissues. *Science* 245. 1989.
 206. Welch J. P., Lee C. L., *et al.* Non-random occurrence of 7-14 translocations in human lymphocyte cultures. *Nature* 255, 241. 1975.
 207. Hecht F., McCaw B. K., *et al.* New translocations in human lymphocytes: a mutagen monitoring system. *Environ Health Perspect* 31, 19. 1979.
 208. Dewald G. W., Noonan K. J., *et al.* T-lymphocytes with 7;14 translocations: frequency of occurrence, breakpoints, and clinical and biological significance. *Am. J. Hum. Genet.* 38, 520. 1986.
 209. Stern M. H., Lipkowitz S., *et al.* Inversion of chromosome 7 in ataxia telangiectasia is generated by a rearrangement between T-cell receptor beta and T-cell receptor gamma genes. *Blood* 74. 1989.
 210. Kaufmann S. H. E. Gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2272. 1996.
 211. Boehm T. L., Werle A., *et al.* T cell-receptor gamma chain variable gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemias of T and B lineage. *Eur. J. Immunol.* 17, 1593. 1987.
 212. Gonzalez-Sarmiento R., Greenberg J. M., & Kersey J. H. Usage of gamma chain variable regions in human acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 72, 2038. 1988.
 213. Hara J., Benedict S. H., *et al.* Rearrangement of variable region T cell receptor gamma genes in acute lymphoblastic leukemia. V gamma gene usage differs in mature and immature T cells. *J. Clin. Invest.* 83, 1277. 1989.
 214. d'Auriol L., Macintyre E., *et al.* In vitro amplification of T cell gamma gene rearrangements: a new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *Leuk* 3, 155. 1989.

215. Bourguin A., Tung R., *et al.* Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8536. 1990.
216. Volkenandt M., Wienecke R., *et al.* Conformational polymorphisms of cRNA of T-cell-receptor genes as a clone-specific molecular marker for cutaneous lymphoma. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 514. 1993.
217. Bottaro M., Berti E., *et al.* Heteroduplex analysis of T-cell receptor gamma gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* **83**, 3271. 1994.
218. Kneba M., Bolz I., *et al.* Characterization of clone-specific rearrangement T-cell receptor gamma-chain genes in lymphomas and leukemias by the polymerase chain reaction and DNA sequencing. *Blood* **84**, 574. 1994.
219. Wood G. S., Tung R. M., *et al.* Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sezary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J. Invest. Dermatol.* **103**, 34. 1994.
220. Födinger M., Buchmayer H., *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of T-cell receptor-gamma chain gene rearrangements in patients with lymphoproliferative diseases. *Br. J. Haematol* **94**, 136. 1996.
221. Trainor K. J., Brisco M. J., *et al.* Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* **78**, 192. 1991.
222. Staehelin T., Stähli C., *et al.* A rapid Quantitative Assay of High Sensitivity for Human Leukocyte Interferon with Monoclonal Antibodies. *Meth. Enzymol.* **79**, 589. 1981.
223. Zar J. H. *Biostatistical Analysis*, 3rd ed. Prentice Hall, New Jersey. 1996.
224. Hair J. F., Anderson R. E., *et al.* Multiple discriminant analysis. In *Multivariate data analysis*, 4th ed., (ed. Borkowsky D.), pp. 178-237. Prentice Hall, New Jersey. 1995
225. Saporta G. *Probabilité analyse des données et statistique*. Technip, Paris. 1990.
226. Maniatis T., Fritsch E. F., & Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York. 1982.
227. Raj N. B. K. & Pitha P. Two levels of regulation of beta interferon gene expression in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3923. 1983.
228. Mizoguchi J., Pitha P. M., & Raj N. B. K. Efficient Expression in *Escherichia coli* of Two Species of Human Interferon- α and Their Hybrid Molecules. *DNA* **4**, 221. 1985.
229. Díaz M. O., Rubin C. M., *et al.* Deletions of interferon genes in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **322**, 77. 1990.
230. Grandér D., Heyman M., *et al.* Interferon System in Primary Acute Lymphocytic Leukemia Cells With or Without Deletions of the α - β -Interferon Genes. *Blood* **79**, 2076. 1992.
231. Middleton P. G., Prince R. A., *et al.* Alpha Interferon Gene Deletions in Adults, Children and Infants With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk* **5**, 680. 1991.
232. Hebert J., Cayuela J. M., *et al.* Candidate Tumor-Suppressor Genes *MTS1* (*p16^{INK4A}*) and *MTS2* (*p15^{INK4B}*) Display Frequent Homozygous Deletions in Primary Cells From T- But Not From B-Cell Lineage Acute Lymphoblastic Leukemias. *Blood* **84**, 4038. 1994.
233. Rasool O., Heyman M., *et al.* *p15^{ink4B}* and *p16^{ink4A}* Gene Inactivation In Acute Lymphocytic Leukemia. *Blood* **85**, 3431. 1995.

234. van Dongen J. J. M., Breit T. M., *et al.* Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia by Immunological Marker Analysis and Polymerase Chain Reaction. *Leuk* 6, 47. 1992.
235. Saiki R. K., Scharf S., *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 230, 1350. 1985.
236. Bories J.-C., Guglielmi P., & Sigaux F. In vitro amplification of T-cell rearrangements: A new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *Leuk* 3, 155. 1987.
237. Zoon K. C., Miller D., *et al.* Purification and characterization of multiple components of human lymphoblastoid interferon- α . *J. Biol. Chem.* 267, 15210. 1992.
238. Cross J. C. & Roberts R. M. Constitutive and trophoblast-specific expression of a class of bovine interferon genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3817. 1991.
239. Lutfalla G., Gardiner K., *et al.* The Structure of the Human Interferon α/β Receptor Gene. *J. Biol. Chem.* 267, 2802. 1992.
240. Colamonici O. R., Pfeffer L. M., *et al.* Multichain Structure of the IFN- α Receptor on Hematopoietic Cells. *J. Immunol.* 148, 2126. 1992.
241. Revel M. & Chebath J. Interferon-activated genes. Trends Biochem Sci 11:166-170, 1986. *Trends Biochem* 11, 166. 1986.
242. Marx J. Taking a Direct Path to the Genes. *Science* 257, 744. 1992.
243. Gutterman J. U. Cytokine therapeutics: Lessons from interferon α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1198. 1994.
244. Harada H., Kitagawa M., *et al.* Anti-Oncogenic and Oncogenic Potentials of Interferon Regulatory Factors-1 and -2. *Science* 259, 971. 1993.
245. Willman C. L., Sever C. E., *et al.* Deletion of *IRF-1*, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science* 259, 968. 1993.
246. Mohammed G. S., Taylor C. E., *et al.* Interferon responses of peripheral blood mononuclear cells from normal and leukaemic children. *Br. J. Haematol* 64, 789. 1986.
247. de Vries J. E., Caviles A. P., *et al.* The role of monocytes in human lymphocyte activation by mitogens. *J. Immunol.* 122, 1099. 1979.
248. Yamada M., Wasserman R., *et al.* Minimal Residual Disease in Childhood B-Lineage Lymphoblastic Leukemia. Persistence of leukemic cells during the first 18 months of treatment. *N Engl J Med* 323, 448. 1990.
249. Beishuizen A., Verhoeven Marie-A., *et al.* Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. *Blood* 83, 2238. 1994.
250. Tycko B., Ritz J., *et al.* Changing antigen receptor gene rearrangements in a case of early pre-B cell leukemia: Evidence for a tumor progenitor cell with stem cell features and implications for monitoring minimal residual disease. *Blood* 79, 481. 1992.

"Entro; cambiamos unas cuantas y cordiales palabras y le doy este libro. Si no me engaño, usted no me malquería Lugones, y le hubiera gustado que le gustara algún trabajo mio. Ello no ocurrió nunca, pero esta vez usted vuelve las páginas y lee con aprobación algún verso, acaso porque en él ha reconocido su propia voz, acaso porque la práctica deficiente le importa menos que la sana teoría."

*Jorge Luis Borges (Obras Completas en colaboración, pág.459,
EMECÉ Editores S.A., Buenos Aires, 1991)*

Toda publicación pone a críticos y autores, a maestros y a alumnos, a escritores y lectores frente a frente, y los expone a un nuevo tipo de relación. Las palabras: *colega de la comunidad científica, aceptación, prestigio, espacio propio y reconocimiento*, son caras a un tipo de relación posible, del mismo modo que *momento culminante* es a la definición de este tiempo. Me toca ahora ser Borges, y como él, aspiro a que Lugones sepa valorarme más por el esfuerzo empleado que por el logro obtenido, por lo que dí más que por lo que recibí a cambio...

