

Tesis Doctoral

# Análisis de nuevos marcadores moleculares en Leucemia Linfocítica Crónica

Travella, Ana Carolina

2012

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Travella, Ana Carolina. (2012). Análisis de nuevos marcadores moleculares en Leucemia Linfocítica Crónica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Travella, Ana Carolina. "Análisis de nuevos marcadores moleculares en Leucemia Linfocítica Crónica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

***“Análisis de nuevos marcadores moleculares en Leucemia Linfocítica Crónica”***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en  
el área de Química Biológica

**Lic. Ana Carolina Travella**

Director de tesis: Dra. Irma Slavutsky

Consejero de Estudios: Dra. Elba Vazquez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina  
Experimental (IMEX)/ CONICET – Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires, 2012

## Resumen:

### ANÁLISIS DE NUEVOS MARCADORES MOLECULARES EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

La leucemia linfocítica crónica (LLC) constituye la leucemia más frecuente en occidente, caracterizada por presentar un curso clínico variable, siendo de interés la búsqueda de nuevos marcadores. En este trabajo se estudiaron 223 pacientes con LLC mediante análisis citogenético, citomolecular y molecular. Los estudios citogenéticos y citomoleculares permitieron identificar 35 alteraciones estructurales no descritas previamente en la literatura, siendo el cromosoma 8 el más frecuentemente implicado. El análisis del estado mutacional y los rearrreglos del gen *IGVH* (immunoglobulin heavy chain variable gene), permitió caracterizar a nuestra población de pacientes con LLC, mostrando una distribución similar a la de los países Occidentales (*IGVH3>IGVH1>IGVH4*) con diferencias respecto de Asia y Brasil, sustentando variaciones en el background genético y/o en factores ambientales entre poblaciones. La evaluación de los niveles de expresión de los genes *SEPT-10*, *MCL-1*, *LPL*, *ADAM-29* y *CLLU-1*, mostró gran heterogeneidad que refleja la variabilidad característica de la LLC, y permitió establecer la asociación de la expresión *LPL* y *ADAM-29* con las características citogenéticas de los pacientes, aspecto no explorado previamente. Estos estudios resaltan la importancia de profundizar la caracterización biológica y la comprensión de los mecanismos patogénicos de esta enfermedad tendiente a definir nuevos grupos de riesgo específicos.

**Palabras clave:** leucemia linfocítica crónica, marcadores pronóstico, citogenética, FISH, *IGVH*, expresión génica

**Abstract:**

**New molecular markers in chronic lymphocytic leukemia**

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most frequent form of leukemia in Western world, characterized by a highly variable clinical course, being necessary the search for new prognostic markers. In this study, we described cytogenetic, citomolecular and molecular analysis of 223 CLL patients. Cytogenetic and citomolecular results showed 35 new structural abnormalities not previously described in the literature, being chromosome 8 the most frequently involved. The mutational status of the *IGVH* (immunoglobulin heavy chain variable genes) gene in our cohort showed a family distribution similar to that observed in Western countries (*IGVH3*>*IGVH1*>*IGVH4*) and different to CLL patients from Asia and Brazil, that may reflect variations in the genetic background and/or environmental factors of their populations. Expression profiles of *SEPT-10*, *MCL-1*, *LPL*, *ADAM-29* and *CLLU-1* genes showed great heterogeneity that may reflect characteristic variability of CLL patients, and showed association between *LPL* and *ADAM-29* with cytogenetic features in our cohort, data not previously described in the literature. This results remarks the importance of biological characterization and understanding of pathogenic mechanisms of this disease in order to define specific risk groups.

**Key words:** chronic lymphocytic leukemia, prognostic factors, cytogenetics, FISH, *IGVH*, gene expression

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que contribuyeron, de una u otra forma, para la realización de este trabajo.

A la Dra. Irma Slavustky, por su valiosa dirección y su invaluable dedicación y esfuerzo que contribuyeron a mi formación, tanto a nivel profesional como personal.

A la Dra. Irene Larripa y al Departamento de Genética de la Academia Nacional de Medicina, por permitirme realizar este trabajo y por brindarme los recursos y equipos necesarios.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por mi formación durante los años de carrera y Postgrado. En especial al Departamento de Química Biológica, a la Secretaría de QB, en especial a Ayelén, y a la Dra. Elba Vazquez, mi consejera de estudios, quienes siempre se hallaron predispuestos a responder todas las consultas y resolver todos los problemas surgidos en el proceso.

Al Dr. Fernando Bezares, del Hospital Alvarez, quién realizó el diagnóstico de la mayoría de los pacientes evaluados y cordialmente remitió las muestras y los datos clínicos de los mismos. Sin su colaboración, buena predisposición y ayuda no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A la Dra. Carmen Stanganelli del Departamento de Medicina Nuclear de la Academia Nacional de Medicina quien representó una ayuda invaluable en la puesta a punto de la técnica de mutaciones, siempre con buena voluntad y una sonrisa.

A la Dra. Marina Gutierrez quien con dedicación y paciencia me ayudo en los primeros pasos de la técnica de PCR en tiempo real y además colaboró en la obtención de los controles normales.

Al Dr. Pablo Opezzo y al Instituto Pasteur de Montevideo, por recibirme amablemente en su laboratorio, capacitarme en la detección de mutaciones y responder a todas mis preguntas. A Pilar, Fernanda y Agustín por haberme hecho sentir por un tiempo parte del grupo.

A todos mis compañeros del laboratorio: Mariana, Vir, Marcelo, Lili, Fer, Caro, Yesi, Cristian, Gustavo, Marcela, Ariela, Nati, Analia, Jorge, Graciela, Carlos, Martin, Vero, Leandro, Patricia, Ale, Mica, Estela, Miguel, Susi y Liliana. En especial a July, Pame y Flavia, por ser amigas además de compañeras de trabajo, por escucharme, entenderme y alentarme.

A mis amigos, los de ayer, los de hoy y los de siempre, por acompañarme en este camino y por estar siempre, con buenos consejos y a pesar de la distancia.

A mi familia. A Mamá y Papá, por ser quienes son y apoyarme siempre. A mis hermanos Pablo, Mariano y Sebi, porque los adoro, gracias por escucharme siempre. A Gaby y Carla, mis hermanas adoptivas, las quiero. A Luli y Fede que son todo. A mi abuela Inés, por estar siempre. A mis abuelos. A todos por escucharme, alentarme y apoyarme incondicionalmente en todo.

A Fer, por estar siempre a mi lado. En las buenas y en las malas. Por su apoyo, compañía, paciencia y amor incondicional sin los cuales nada de esto hubiera sido posible. Te amo.

Agradezco también al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca doctoral que me permitió desarrollar esta tesis.

*A mis padres, por ser mi ejemplo a seguir en la vida y por acompañarme siempre.*  
*A Fer, con quien día a día comparto la vida y me enseño que con amor todo se logra.*

<b><u>Índice</u></b>	<b><u>Pag.</u></b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>9</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>12</b>
1.1. Características generales de la leucemia linfocítica crónica	12
1.2. Origen del linfocito B de la LLC	16
1.3. Biología de la LLC	19
1.4. Factores pronóstico	23
1.5. Estudios citogenéticos y citomoleculares en LLC	28
1.5.1. Análisis cromosómicos en neoplasias linfoides	28
1.5.2. Estudios de citogenética convencional en LLC	29
1.5.3. Estudios citomoleculares en LLC	30
1.6. Análisis moleculares en LLC	36
1.6.1. Perfil mutacional de <i>IGVH</i>	36
1.6.2. Nuevos marcadores moleculares	41
<b>2. Objetivos</b>	<b>49</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>51</b>
3. 1. Población estudiada	51
3. 2. Metodología	51
3.2.1. Cultivo de sangre periférica (SP)	51
3.2.2 Técnicas citogenéticas	53
3.2.2.1. Tinción con colorante Wright	53
3.2.2.2. Técnica de bandeó G	53
3.2.3. Evaluación microscópica	54
3.2.4. Técnicas citomoleculares	55
3.2.4.1. Hibridación in-situ con fluorescencia (FISH)	55
3.3. Estudios moleculares	60
3.3.1. Separación de células mononucleares de SP por Ficoll-Hypaque	60
3.3.2. Extracción de ARN total	61
3.3.3. Cuantificación espectrofotométrica del ARN	61
3.3.4. Reacción de retrotranscripción inversa (RT-PCR)	62
3.3.5. Análisis del estado mutacional de <i>IGVH</i>	62
3.3.6. PCR en tiempo real (QRT-PCR)	69
3.4. Análisis estadístico	74



<b>4. Resultados</b>	<b>77</b>
<b>Capítulo I: Estudios citogenéticos y citomoleculares</b>	
4.1. Estudios citogenéticos y citomoleculares	77
4.1.1. Análisis de cariotipos complejos	79
4.1.2. Análisis de cariotipos simples	86
4.1.3. Alteraciones estructurales recurrentes	87
4.1.4. Alteraciones numéricas	89
4.1.5. Correlación con parámetros clínicos	90
4.1.6. Discusión	93
<b>Capítulo II: Análisis del estado mutacional de los genes <i>IGVH</i></b>	
4.2. Análisis del estado mutacional de los genes <i>IGVH</i>	98
4.2.1 Correlación entre el estado mutacional de <i>IGVH</i> y las alteraciones genómicas	102
4.2.2 Análisis de los rearrreglos <i>IGHV-D-J</i>	104
4.2.2.1. Distribución de familias y genes VH	104
4.2.2.2. Distribución de familias y genes DH	105
4.2.2.3. Distribución de segmentos y genes JH	106
4.2.3 Análisis de longitud de HCDR3 y presencia de estereotipos	107
4.2.4 Comparación de nuestros datos con los reportados previamente	108
4.2.5. Discusión	113
<b>Capítulo III: Análisis de expresión génica</b>	
4.3. Análisis de expresión génica	119
4.3.1. Perfiles de expresión génica	125
4.3.2. Correlación con los parámetros clínicos	127
4.3.2.1 Distribución de pacientes en función de los niveles de expresión génica	127
4.3.2.2. Distribución de niveles de expresión en función de los parámetros clínicos	129
4.3.3. Correlación con características citogenéticas y de FISH	131
4.3.4. Correlación con perfil mutacional de genes <i>IGVH</i>	134
4.3.5. Discusión	136
<b>5. Conclusiones</b>	<b>142</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>145</b>

## Abreviaturas:

**13q14x1:** deleción monoalélica de 13q14

**13q14x2:** deleción bialélica de 13q14

**4T:** buffer 4X SSC/ 0,05/ Tween-20

**aa:** aminoácidos

**ADAM-29:** *desintegrin and metallopeptidase domain 29*

**ADNdc:** ácido desoxirribonucleico doble cadena

**AE:** alteraciones estructurales

**AEN:** anomalías estructurales nuevas

**AER:** alteraciones estructurales recurrentes

**Ag:** antígeno

**AID:** *activation-induced cytidine deaminase*

**AN:** anomalías numéricas

**APC:** células presentadoras de antígeno

**APRIL:** *A proliferation-inducing ligand*

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATM:** *ataxia telangiectasia mutated*

**BAFF:** *B-cell inducing factor of the tumor necrosis factor family*

**BCL2:** *B-cell leukemia/lymphoma 2*

**BCR:** receptor de células B

**BH:** dominio *BCL-2 homology*

**BMSC:** *bone marrow stromal cells*

**Btk:** *Bruton's tyrosine kinase*

**C:** grupo control

**CA:** cariotipo anormal

**CC:** cariotipo complejo

**CD23<sub>s</sub>:** CD23 soluble

**CD38:** *cluster of differentiation 38*

**CD40L:** CD40 ligando

**CDRs:** *complementarity determining regions*

**CG:** centro germinal

**CGH:** *comparative genomic hybridization*

**CI:** proceso de conmutación isotípica

**CLU-1:** *chronic lymphocytic leukemia up-regulated gene 1*

**CN:** cariotipo normal

**cp:** cariotipo compuesto

**Cyt C:** citocromo C

**D:** dominio de diversidad

**DEPC:** dietilpirocarbonato

**EDTA:** Etilen-diamin-tetra acetato de sodio

**FANCC:** *Fanconi anemia, complementation group C*

**FDC:** células foliculares dendríticas

**FISH:** *Fluorescence in situ hybridization*

**GAPDH:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

**GTP:** *guanosine triphosphate*

**Hb:** hemoglobina

**HCDR3:** *heavy-chain complementarity-determining región 3*

**HMS:** proceso de hipermutación somática

**Ig:** inmunoglobulinas

**IGH@:** locus del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas

**IGVH:** *immunoglobulin heavy variable region*

**IL-2:** interleukina-2

**ISCN:** *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*

**J:** segmento de unión

**LDH:** lactato deshidrogenasa

**LLC:** leucemia linfocítica crónica

**LLP:** linfoma de linfocitos pequeños

**LPL:** *lipoprotein lipase*

**LPS:** Lipopolisacarido

**M:** mutado

**MAS:** *mean alignment score*

**MBL:** *monoclonal B lymphocytosis*

**MCL-1:** *myeloid cell leukemia sequence 1*

**MDR:** *minimally deleted región*

**M-FISH:** Multicolor FISH

**MO:** medula osea

**MSC:** *mesenchymal stromal cells*

**NAHR:** *non-allelic homologous recombination*

**ND:** sin datos

**NFD:** solución antifade

**NK:** *natural killer*

**NLC:** células *nurse-like*

**NM:** no mutado

**PBS:** *phosphate-buffered saline*

**PI3K $\delta$ :** *phosphoinositide 3-kinase delta*

**PL:** prolinfocitos  
**Pq:** plaquetas  
**PW:** *Pokeweed mitogen*  
**QRT-PCR:** *quantitative real time-polymerase chain reaction*  
**RB-1:** *retinoblastoma gene 1*  
**ROC:** *Receiver Operating Characteristic*  
**SEPT-10:** *Septin 10*  
**SFB:** Suero Fetal Bovino  
**SLT:** sobrevida libre de tratamiento  
**SP:** sangre periférica  
 **$\beta_2$ M:**  *$\beta_2$ -microglobulina*  
**SV:** sobrevida  
**Syk:** *spleen tyrosine kinase*  
**TD:** respuesta inmune T-dependiente  
**TDL:** tiempo de duplicación linfocitaria  
**TI:** respuesta inmune T-independiente  
**TK:** *timidina-quinasa*

**Tm:** temperatura de *melting*  
**TNB:** TRIS-NaCl-Buffer  
**TNF- $\alpha$ :** *tumor necrosis factor  $\alpha$*   
**TNFRSF10A/B:** *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL-R1/2)*  
**TNT:** buffer Tris- NaCl- Tween  
**TP53:** *tumor protein p53*  
**t-test:** test *t* de Student  
**V:** región variable  
**VH:** segmento V de cadena pesada  
**VL:** segmento V de cadena liviana  
**WBC:** recuento de glóbulos blancos  
**WES:** *whole exome sequencing*  
**WGS:** *whole genome sequencing*  
**WHO:** *world health organization*  
**XPA:** *Xeroderma pigmentosum group A*  
**ZAP-70:**  *$\zeta$ -chain associated protein kinase 70kDa*

## **1. Introducción**

## 1. Introducción

### 1.1. Características generales de la leucemia linfocítica crónica

La Leucemia Linfática Crónica (LLC) es la neoplasia a células B más frecuente en el adulto, caracterizada por la presencia de linfocitos B monoclonales pequeños, redondos, ligeramente irregulares en la sangre periférica (SP), médula ósea (MO), bazo y ganglios linfáticos, asociados con prolinfocitos y paraimmunoblastos que forman centros proliferantes pseudofoliculares (pseudofoliculos) (Hallek et al, 2008). Esta acumulación progresiva de linfocitos monoclonales con un fenotipo B maduro es el resultado de un balance entre disminución de la apoptosis y un aumento de la proliferación de estas células. El cuadro clínico presenta linfocitosis en SP ( $>5 \times 10^9/L$ ), linfadenopatías, adenomegalias, hepato-esplenomegalia, infecciones recurrentes, falla medular, anemia y plaquetopenia en las formas más avanzadas y usualmente fenómenos autoinmunes asociados (anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica autoinmune) (Chiorazzi et al, 2005; Zens et al, 2009). Cuando la enfermedad involucra SP y MO, recibe el nombre de LLC, mientras que si ocurre infiltración de nódulos linfáticos u otros tejidos por células B con morfología e inmunofenotipo de LLC pero sin manifestaciones leucémicas, recibe el nombre de linfoma de linfocitos pequeños (LLP). Ambas son consideradas por la *World Health Organization* (WHO) (Müller-Hermelink et al, 2008) como manifestaciones diferentes de una misma entidad (LLC/LLP) tomando como base las características citológicas, histopatológicas, inmunofenotípicas y citogenéticas.

La LLC presenta una mayor incidencia en hombres, con una relación hombre:mujer de 1,7:1. Afecta principalmente a personas mayores de 60-65 años, incrementándose hacia la séptima década de vida, con una edad media al diagnóstico de 70 años en hombres y de 74 años en mujeres (Müller-Hermelink et al, 2008; Zens et al, 2009). A pesar de ser rara su aparición en menores de 50 años, actualmente hay un mayor porcentaje de casos con diagnóstico temprano (aproximadamente un 20%), que por lo general constituyen un hallazgo en un hemograma de rutina en pacientes totalmente asintomáticos (Dighiero & Hamblin, 2008).

En cuanto a los criterios para definir el diagnóstico, los mismos incluyen: 1) recuento de linfocitos de morfología característica mayor a  $5 \times 10^9/L$ , linfadenopatía o esplenomegalia; y 2) inmunofenotipo común que incluye co-expresión de CD5/CD19/CD23, bajos niveles de CD20 y CD79b en comparación con los hallados en células B normales, y ausencia de expresión de FMC7 (Dighiero, 2005; Hallek et al, 2008; Marquez et al, 2011). El estudio del clon leucémico por citometría de flujo se basa en un panel que incluye: CD19+, CD5+, CD20+ (débil), CD22+ (débil), CD79b+ (débil), CD23+, CD43+ (débil), CD11c+ (débil), CD200+, sIg  $\kappa/\lambda$ + (débil); y ausencia de expresión de sIgM, FMC7,

CD10 y CD103, que permite confirmar el diagnóstico y excluir otros desórdenes linfoproliferativos a células B.

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

Desde el punto de vista epidemiológico, la LLC es la leucemia más frecuente en Occidente, correspondiendo aproximadamente al 30% del total de las leucemias, con una incidencia de 4-6,5/100.000 habitantes por año (Smith et al, 2011; Marcos-Gragera et al, 2011; Shenoy et al, 2011). La incidencia en las poblaciones asiáticas y afroamericanas es significativamente menor (~10% de las leucemias) con respecto a la del mundo occidental y se mantiene incluso ante los movimientos migratorios, alejando así la hipótesis de factores ambientales predisponentes (Chang et al, 2006; Dores et al, 2007). Al presente es muy poca la información respecto de la incidencia de LLC en los países de América Latina, existiendo un solo reporte de México y países del norte de la cadena Andina, con alto componente de poblaciones indígenas, en los que se observa una frecuencia llamativamente baja (Ruiz-Argüelles et al, 1999).

Si bien no se describió un patrón genético hereditario característico se sabe que la LLC, al igual que otras neoplasias linfoides, tiene mayor frecuencia que la esperada en familiares de primer orden (Mauro et al, 2006; Sellick et al, 2006; Houlston & Catovsky, 2008; Goldin et al, 2009), observándose que el 6% de los pacientes evaluados poseían antecedentes de LLC en su historia familiar, mientras que otro 5% tenían casos de síndromes linfoproliferativos (Yuille et al, 2000; Rawstron et al, 2002; Houlston et al, 2003). Además, se observa el fenómeno de anticipación, definido como la presentación de la enfermedad en familiares directos con diagnóstico más temprano en las sucesivas generaciones y con un curso clínico que suele ser más agresivo (Yuille et

al, 2000; Caporaso et al, 2004). Al presente se desconoce el mecanismo molecular implicado en este fenómeno, no habiéndose observado la expansión de secuencias trinucleotídicas característica de las enfermedades neurodegenerativas (Auer et al, 2007). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos el diagnóstico de LLC no implica un riesgo aumentado para la descendencia de padecer la enfermedad u otros síndromes linfoproliferativos. Asimismo, estudios recientes han identificado numerosos genes o locus de riesgo que podrían estar asociados a la agregación familiar (2q13, 2q37.1, 6p21.3, 6p25.3, 11q24.1, 13q21.33-q22.2, 15q23 y 19q13.32) (Ng et al, 2007; Di Bernardo et al, 2008; Slager, et al, 2011). No obstante, las dificultades para identificar una mutación específica sugieren posiblemente el aporte de múltiples genes (Goldin & Slager, 2007) o bien la presencia de polimorfismos en genes predisponentes a LLC familiar (Rudd, 2006; Auer et al, 2007).

Inicialmente, la LLC fue considerada una enfermedad homogénea, de células B inmaduras, inmuno-incompetentes, con bajo índice de replicación, que se acumulaban debido a inhibición o falla del proceso de apoptosis. En las últimas décadas, esta información se ha ido transformando y en la actualidad es considerada una entidad de linfocitos B maduros estimulados por presencia antigénica, que pueden morir por apoptosis o evitarla a través de la intersección de señales externas (Chiorazzi et al, 2005). Estas células neoplásicas serían renovadas sólo por células precursoras proliferantes. En la Tabla 1 se comparan los ítems más importantes de ambos puntos de vista.

Tabla 1: Comparación de los puntos de vista históricos y actuales en LLC.

Punto de vista histórico	Punto de vista actual
Enfermedad clínicamente heterogénea con célula de origen homogénea	Enfermedad clínicamente heterogénea originada de linfocitos B con diferente estado de maduración, activación y subgrupo celular
Enfermedad derivada de linfocitos B “naïve”	Enfermedad derivada de linfocitos B post contacto antigénico y con diferente nivel de mutaciones en los genes de las inmunoglobulinas
La acumulación de células neoplásicas ocurre a causa de un defecto inherente a la apoptosis que involucra al total de las células leucémicas	La acumulación de células neoplásicas ocurre a través de señales de supervivencia originadas en el microambiente y captadas por un subgrupo de células neoplásicas a través de diferentes receptores (ejemplo: BCR y receptores de citoquinas)
La LLC es una enfermedad de acumulación celular	La LLC es una enfermedad de acumulación celular asociada a un mayor índice de proliferación que la reconocida previamente.
Los marcadores pronósticos identifican pacientes en varios niveles de riesgo (bajo, intermedio y alto) con una reconocida heterogeneidad en su evolución clínica	Nuevos marcadores moleculares y proteicos identifican pacientes dentro de los niveles de riesgo bajo e intermedio, que presentan distinto curso clínico
La terapia está basada en la observación clínica y usa métodos de prueba y error	Nuevos descubrimientos proveen información sobre posibles blancos para el desarrollo de agentes terapéuticos más efectivos

(Adaptado de Chiorazzi et al, 2005).



## 1.2. Origen del linfocito B de la LLC

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

Al presente existen numerosos aspectos sin resolver en la LLC, entre los cuales sin duda adquiere relevancia conocer el origen del linfocito B característico de esta patología, así como su contrapartida normal, habiéndose desarrollado diferentes hipótesis al respecto (Figura 1).

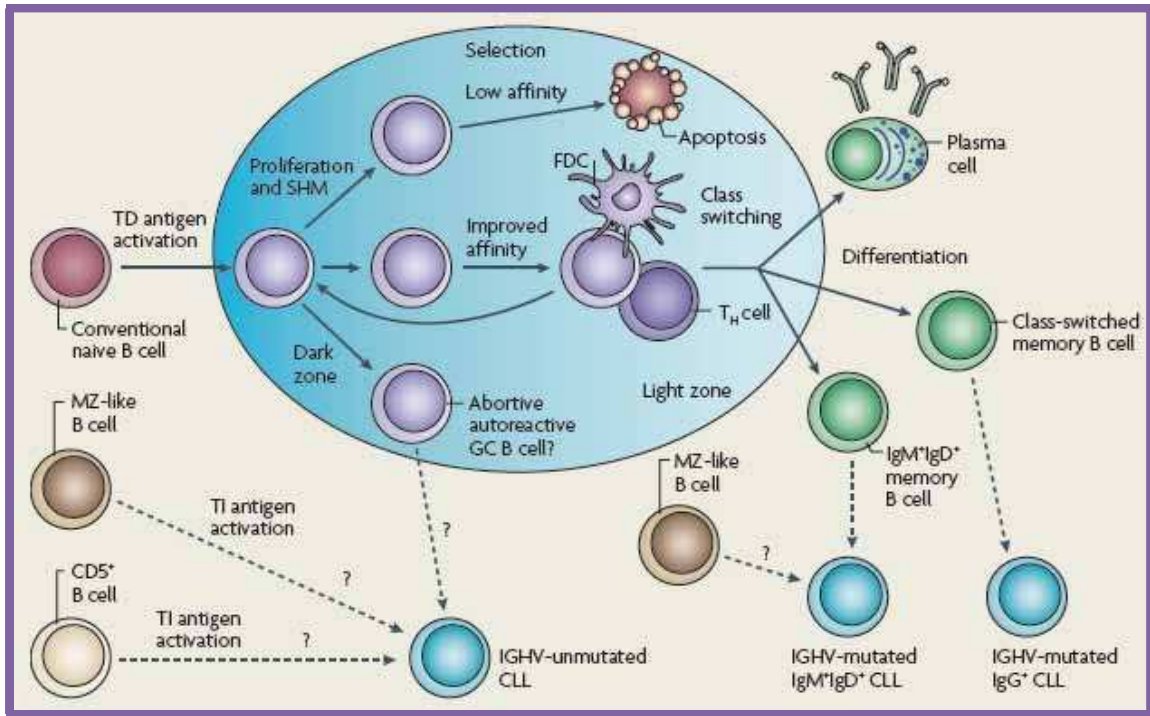


Figura 1: Reacciones en el CG y contrapartida celular normal de la célula leucémica. Las evidencias más firmes sugieren que las formas de LLC mutadas derivan de células B de memoria post-CG, aunque también se discute la derivación a partir de células B que acumulan mutaciones a través de una respuesta T independiente. Con respecto a las LLC no mutadas, parecerían derivar de células B activadas por reconocimiento antigénico, no siendo claro aún si se trata de células B naïve CD5+ o células B de la zona marginal. A su vez, también sigue siendo tema de estudio si esta activación surge a través de una respuesta T independiente o T dependiente, involucrando una célula B autorreactiva (Zenz et al, 2010a).

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

Otra hipótesis propone que ambas sub-poblaciones (LLC M y no mutadas (NM)) han tenido contacto previo con un Ag, posiblemente un auto-Ag, el cual fue reconocido por el BCR con una afinidad reducida (Stevenson & Caligaris-Cappio, 2004; Thorselius et al, 2006; Stamatopoulos et al, 2007). En el caso de las LLC M este modelo propone que estas células serían linfocitos B de memoria que luego de la maduración fueron anergizadas, explicando la sub-expresión del BCR, mientras que en el caso de las células de LLC NM, luego de la unión del auto-Ag al BCR, el mismo sería incapaz de inducir el proceso de HMS. El sesgo en la expresión de ciertos genes en las formas NM (ej: *IGVH1-69*, *IGVH4-39*) con una expresión muy conservada de aminoácidos en el HCDR3 (*heavy-chain*

*complementarity-determining región 3*) sustenta esta hipótesis contemplándose un proceso de selección antigénica (Zenz et al, 2010a).

Una tercera hipótesis (Chiorazzi & Ferrarini, 2011; Garcia-Muñoz et al, 2012) sugiere que ambas subpoblaciones leucémicas, derivan de células de la zona marginal de los folículos linfoides, basado en el fenotipo particular de las células de LLC y la presencia de un mecanismo inmunológico alternativo a la clásica respuesta TD y TI (Weill et al, 2009). En este modelo la presencia de la HMS y de conmutación isotípica (CI) (mecanismo responsable de cambiar la región efectora de las Igs para permitir el correcto procesamiento antigénico), tendrían lugar de una forma “no clásica” es decir por un camino alternativo al del CG luego de haberse encontrado con su Ag. En los últimos años han surgido evidencias adicionales que sugieren la presencia de una respuesta inmunitaria independiente del CG, en donde eventos como HMS, CI y la expresión de AID (*activation-induced cytidine deaminase*), podrían ser mediados también por la presencia de receptores tipo “Toll” en una respuesta de inmunidad innata (Weller et al, 2005; Richard et al, 2008).

Finalmente, estudios recientes (Dühren-von Minden et al, 2012) sugieren una nueva hipótesis para el origen de la LLC. Estos autores plantean que la presencia de BCRs estereotipados, casi idénticos, en diferentes pacientes indicaría que el reconocimiento de Ag específicos estaría involucrado en la patogénesis de la LLC. Aproximadamente el 20/-30/ de los pacientes con LLC presentan receptores pertenecientes a determinados estereotipos basados en la secuencia de la región HCDR3, y alrededor del 1/ portan secuencias aminoacídicas de *IGVH (immunoglobulin heavy variable región)* casi idénticas (Ghiotto et al, 2004; Widhopf et al, 2004; Stamatopoulos et al, 2007). A diferencia de otras neoplasias a células B, los autores demuestran que los BCRs derivados de las células leucémicas inducen señalización autónoma Ag-independiente, a través de la región HCDR3 y un epítipo interno del BCR responsable de estas señales. Posiblemente, solo ciertas secuencias HCDR3 posean esta capacidad señalizadora explicando el sesgo en el repertorio de BCRs en LLC. En consecuencia, la presencia de distintos epítopos intrínsecos explicarían estas similitudes en los receptores, los cuales se seleccionarían por su habilidad de interacción con el HCDR3.

A pesar de las hipótesis propuestas y las diferencias en la supervivencia (SV) de los pacientes en los diferentes subtipos o acorde al estado mutacional, todas las formas de LLC parecieran compartir un perfil de expresión génica similar, lo que sugeriría un origen celular común y/o mecanismos de transformación posteriores independientes del estado mutacional (Rosenwald et al, 2001; Klein et al, 2001; Linet et al, 2007).

### 1.3. Biología de la LLC

La sub-expresión del BCR en el linfocito B de la LLC constituye una de las principales características de esta patología. Este receptor está constituido por una Ig de superficie asociada con el heterodímero Ig $\alpha$  (CD79a)/Ig $\beta$  (CD79b). Inicialmente, se propuso que la presencia de mutaciones puntuales en la molécula Ig $\beta$  constituía la principal causa de expresión anómala del BCR (Thompson et al, 1997; Payelle-Brogard et al, 1999), resultados que no fueron confirmados. Otros estudios muestran expresión normal de los distintos componentes del BCR (Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ ) tanto a nivel transcripcional como proteico (Alfarano et al, 1999), asociando la sub-expresión a defectos en el plegamiento y glicosilación de la cadena Ig $\alpha$ , que bloquearía su salida del retículo-endoplásmico, impidiendo de esta manera el correcto ensamblado y transporte del receptor hacia la membrana (Payelle-Brogard et al, 2003; Vuillier et al, 2005).

Por otra parte, las células de LLC en conjunto con las células estromales y de la matriz celular constituyen el “microambiente” de la LLC, tanto en MO como en tejido linfoide. La estimulación antigénica, a través del BCR, y la interacción con células accesorias y citoquinas en este microambiente específico serían un factor promotor importante en las etapas iniciales de la enfermedad (Ghia et al, 2008; Zenz et al, 2010a; Burger et al, 2009; Burger et al, 2011). Estas interacciones afectan la supervivencia y proliferación de las células leucémicas confiriendo resistencia a drogas, y posiblemente sean responsables de la enfermedad residual post-tratamiento. A nivel histopatológico, la LLC presenta focos de células proliferantes acumuladas en los pseudofolículos (Caligaris-Cappio et al, 2003). Señales recibidas por contacto directo con otras células o por medio de factores solubles, simultáneas o no a la activación del BCR, pueden estimular la proliferación y rescatar de la apoptosis al clon leucémico *in vitro* y probablemente *in vivo*. Estas estructuras incluyen tanto células T CD4+ como distintas células presentadoras de Ag (APC) (Ghia et al, 2002; Stevenson & Caligaris-Cappio, 2004), lo que sugiere que algunos de los mecanismos requeridos para la expansión de células B normales post contacto antigénico en el CG también podrían estar operando en la patogénesis de la LLC. Aún así se desconocen los procesos involucrados en el desarrollo y mantenimiento de estos pseudofolículos. La quemoquina CXCL13, secretada por células foliculares dendríticas (FDC) y células *nurse-like* (NLC), juega un rol importante como quemoattractante de células leucémicas así como en el desarrollo de folículos normales (Burkle et al, 2007). A su vez, las células de LLC, luego de la estimulación vía BCR o por contacto con NLC, secretan quemoquinas (CCL22, CCL3 y CCL4) que atraen otros tipos celulares como células T y monocitos (Ghia et al, 2002; Burger et al, 2009; Quiroga et al, 2009), indicando que este microambiente es creado y mantenido a través de una interacción dinámica entre células leucémicas y normales. Todos los tipos celulares y

citoquinas presentes en el mismo tendrían un rol crítico estimulando la proliferación e inhibiendo la apoptosis de las células B malignas (Chiorazzi et al, 2005). A su vez, la generación de un balance entre señales pro- y anti-apoptóticas, por ejemplo mediante *up*-regulación de genes anti-apoptóticos (como *BCL-2*, *Survivina* y *MCL-1*) favorece la supervivencia de células LLC (Hui et al, 2006). En la Figura 2 se muestran las principales interacciones celulares y moleculares que tienen lugar en el microambiente pseudofolicular, de importancia en la supervivencia y proliferación de las células leucémicas (Burger et al, 2009; Burger et al, 2011).

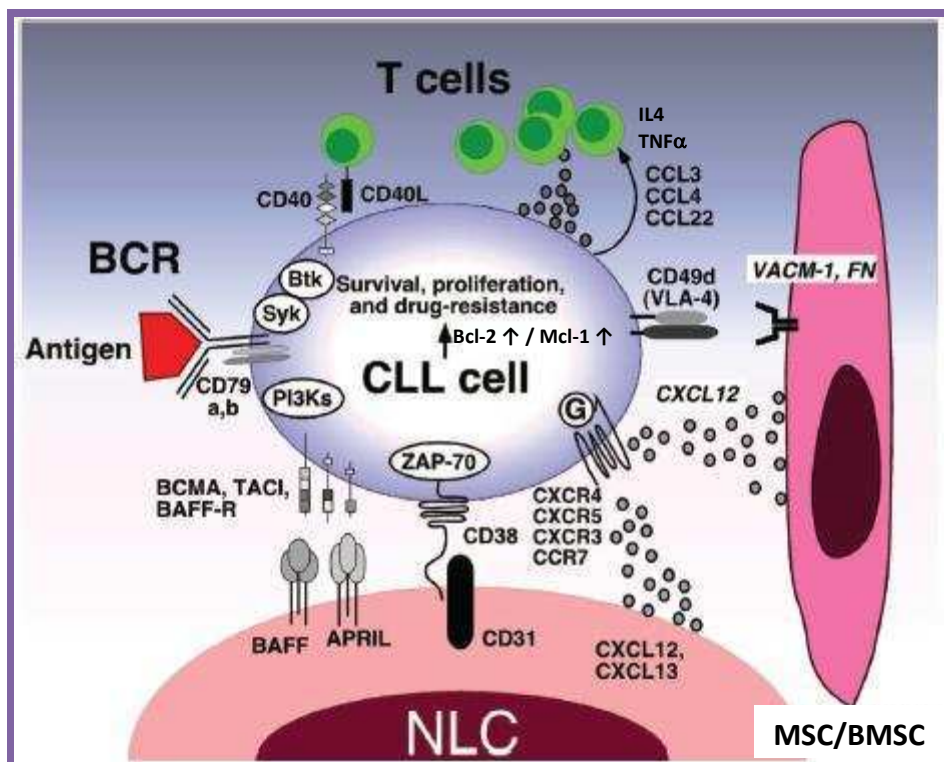


Figura 2: Interacciones moleculares entre células de LLC y células estromales en el microambiente de la médula ósea y/o tejido linfóide importantes para la supervivencia y proliferación de células leucémicas, migración y formación de pseudofoliculos. El contacto entre las células de LLC y las accesorias es establecido y mantenido a través de receptores de quemoquinas y moléculas de adhesión expresadas por las células leucémicas (Modificado de Burger et al, 2009; Burger et al, 2011).

En este microambiente el BCR juega un rol clave en el mantenimiento y expansión del clon leucémico, activado por contacto con auto-Ag o Ag microbianos (Chiorazzi et al, 2005; Chu et al, 2008; CATERA et al, 2008) junto con otras señales coestimuladoras, involucrando quinasas específicas *downstream* tales como Syk (*spleen tyrosine kinase*), Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) y PI3Kδ (*phosphoinositide 3-kinase delta*). A su vez, la expresión de receptores de quemoquinas como CXCR4 y CXCR5, junto con moléculas de adhesión (VLA-4 y otras), regulan el tráfico celular y el *homing* de células de LLC por medio de gradientes tisulares de sus respectivos ligandos. Miembros de la familia TNF tales como CD40L, BAFF (*B-cell inducing factor of the tumor necrosis factor family*) y APRIL (*A*

*proliferation-inducing ligand*) activan a las células leucémicas a través de sus correspondientes receptores. Las NLC atraen a las células de LLC mediante la secreción de CXCL12 (Burger et al, 2000) y CXCL13 (Burkle et al, 2007), y las protegen de sufrir apoptosis, espontánea o inducida por drogas, a través de la expresión de varias moléculas: CXCL12, BAFF, APRIL, el ligando inductor de proliferación CD31, vimentina y plexina-B1, vías involucradas en el *crossstalk* del microambiente de la LLC (Burger et al, 2000; Nishio et al, 2005; Deaglio et al, 2005; Burger et al, 2011). Asimismo, las MSC (*mesenchymal stromal cells*) y las BMSC (*bone marrow stromal cells*) poseen alta afinidad por las células de LLC promoviendo su supervivencia por contacto directo y estimulando su migración. Esta unión es dependiente de la expresión de CXCR4 y VLA-4 por parte de las células leucémicas (Burger et al, 1999; Burger et al, 2011). Interesantemente, la expresión de la integrina VLA-4 en las células de LLC posee impacto pronóstico, indicando la importancia de estas interacciones *in-vivo* (Gattei et al, 2008). Las FDC también están presentes en el tejido linfóide y pueden ayudar a la proliferación leucémica. El *crossstalk* entre las células de LLC y las estromales es bidireccional provocando activación de ambos tipos celulares, siendo crítico el eje CXCR4-CXCL12 (Burger et al, 2011). En cuanto a las células T, pueden estimular la progresión de la LLC, evitando el efecto antitumoral desatado por otras células T específicas. Funcionalmente, estimulan la proliferación mediante la secreción de citoquinas (como IL-4) o TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) (Chiorazzi et al, 2005). En los pseudofolículos, una proporción importante de células T expresan CD40L el cual puede unirse al CD40 en las células de LLC y evitar la apoptosis (Kitada et al, 1999; Stevenson & Caligaris-Cappio, 2004). Esta activación vía CD40 induce *up*-regulación de CD80 y CD54 en las células leucémicas causando un *feedback* de estimulación hacia las células T (Ranheim & Kipps, 1993). En estas estructuras pseudofoliculares las células T CD4+ activadas co-localizan con las células de LLC CD38+ proliferantes (Burger et al, 2011).

A su vez, la baja expresión del BCR está relacionada con una menor actividad de tirosinquinasa, lo cual lleva a defectos en la movilización del Ca<sup>2+</sup> intracelular y a la fosforilación de tirosinas. En la mayoría de las LLC con peor pronóstico se observa una mejor respuesta vía el BCR que en los pacientes con enfermedad indolente (Lanham et al, 2003). Recientemente se ha observado que esta respuesta efectiva a la estimulación vía BCR también se encuentra relacionada con elevados niveles de expresión de ZAP-70 ( *$\zeta$ -chain associated protein kinase 70kDa*), una tirosina-quinasa asociada a receptor, presente en células T y NK (*natural killer*) pero ausente en células B normales circulantes, que se encuentra sobreexpresada en pacientes con LLC progresiva. Esta quinasa puede modular la señalización a través del BCR, en células LLC post- estimulación antigénica (Chen et al, 2002), actuando indirectamente en las vías de señalización que se activan en este proceso. La expresión de ZAP-70 puede determinar parcialmente la capacidad de respuesta de estas células a la

estimulación antigénica mediante un aumento en la fosforilación de tirosinas y alteración del flujo de  $Ca^{2+}$ . Respecto al mecanismo/s involucrado/s en el impacto pronóstico adverso de su expresión en LLC, se sabe que las células ZAP-70+ poseen una capacidad aumentada de respuesta a señales inducidas por estimulación antigénica vía BCR, y en particular, la expresión de ZAP-70 y la estimulación sostenida del BCR han sido asociadas con una activación prolongada de las kinasas Akt y ERK, eventos requeridos para la inducción de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1, Bcl-xl y XIAP (Chen et al, 2005; Richardson et al, 2006; Efremov et al, 2007; Gobessi et al, 2007; Dighiero & Hamblin, 2008; Dal-Bo et al, 2009).

Otra de las características del linfocito B de la LLC es la expresión clonal de sus Igs, a través de un rearrreglo único de los genes *VH* y *VL*. Si bien el fenotipo de las células tumorales (IgM+, IgD+, CD5+) sugería fuertemente que las mismas deberían corresponder a una población B naïve de células de la zona del manto sin un proceso activo de HMS, responsable de aumentar la afinidad por el antígeno mejorando así su reconocimiento, se demostró que por lo menos el 50% de los pacientes presentaban mutaciones en los genes variables de sus Igs (Fais et al, 1998). Si bien no está totalmente claro el tipo de interacción entre el microambiente y las células leucémicas, una hipótesis sugeriría que las mismas son más eficientes en aquellos clones LLC con genes *IGVH* M, que representarían variantes dependientes del microambiente, mientras que las formas NM serían variantes más estrictamente dependientes de las alteraciones genéticas (Caligaris-Cappio, 2003; Zenz et al, 2010a). En este sentido, otra de las moléculas importantes en la biología del linfocito B y de importancia en la LLC es AID. Esta enzima de expresión exclusiva en el linfocito B, es indispensable en los procesos de HMS y CI, y se ha encontrado sobre-expresada en pacientes LLC con genes *IGVH* NM y con alta progresión tumoral (Oppezco et al, 2003; McCarthy et al, 2003; Oppezco et al, 2005). Además de ésta, datos recientes proponen otras dos funciones adicionales para AID de gran importancia en el área tumoral y de la inmunología: a) la capacidad de demetilar islas CpG a nivel del ADN genómico con la consecuente implicancia en la regulación génica (Agarwal & Daley, 2010; Popp et al, 2010); y b) su requerimiento para el control de células B autorreactivas (Kuraoka et al, 2011; Meyers et al, 2011).

Otra molécula expresada por algunas células leucémicas es CD38 (*cluster of differentiation 38*), cuya expresión se observa durante el desarrollo del linfocito B cuando las interacciones célula-célula son cruciales así como al momento de la interacción con otras células accesorias en el CG (Malavasi et al, 1994). CD38 actúa tanto como una enzima de superficie y como receptor, mediante la unión a su ligando CD31, induciendo señales de activación y diferenciación en linfocitos T, B y células NK (Ibrahim et al, 2003). En la LLC, su expresión predomina entre los pacientes con genes

*IgVH* NM y ZAP-70+, asociados a un pronóstico desfavorable. Las observaciones sobre su relevancia pronóstica permitieron determinar que tanto la proliferación como la supervivencia de las células de LLC son favorecidas a través de interacciones entre CD38 y su ligando CD31, expresado en las células accesorias presentes en el microambiente (Deaglio et al, 2005; Deaglio et al, 2007). Estas interacciones ocurren mayoritariamente en los centros proliferantes de órganos linfoides periféricos y/o en la MO dada la elevada expresión de CD38 en las células leucémicas, a diferencia de los bajos niveles observados en linfocitos circulantes (Ghia et al, 2002; Jaksic et al, 2004; Patten et al, 2008). En ambos compartimentos se provee accesibilidad a CD31, debido a su alta expresión en MSC, BMSC y NLC (Burger et al, 2000; Tsukada et al, 2002; Caligaris-Cappio, 2003). A su vez, las células LLC CD38+ que co-expresan ZAP-70, caracterizadas por la migración mediada por CXCL21, presentan fosforilación en tirosinas activadoras de la molécula ZAP-70 luego de la unión de CD38 con su ligando (Richardson et al, 2006; Deaglio et al, 2007), siendo ésta una molécula clave en la intersección de señales migratorias recibidas a través del receptor de CXCL12 (Ottoson et al, 2001; Tichioni et al, 2002; Dighiero & Hamblin, 2008; Dal-Bo et al, 2009).

#### **1.4. Factores pronóstico**

Sabemos que la LLC se caracteriza por una gran heterogeneidad clínica, situación que ha motivado un gran interés en definir parámetros que permitan predecir el curso de la enfermedad. Al presente existen diferentes factores pronóstico de esta patología que pueden dividirse en dos grandes grupos: clásicos y biológicos (Moreno & Montserrat, 2008).

##### **Factores pronóstico clásicos:**

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

Existen actualmente dos sistemas de **estadificación clínica** aceptados para la LLC: el sistema establecido por Rai et al (1975), el cual originalmente proponía cinco estadios (0, I, II, III, IV) basados en la presencia de linfocitosis, esplenomegalia y hepatomegalia, niveles de hemoglobina (Hb) y recuento plaquetario, que fue reducido en 1987 a tres grupos de riesgo: bajo (estadio 0), intermedio (estadios I y II) y alto (estadios III y IV) (Rai & Montserrat, 1987), en tanto que el sistema de Binet et al (1981) distingue tres estadios (A, B, C) acorde al número de áreas linfoides involucradas y la presencia de anemia y/o trombocitopenia. Ambos sistemas se basan en exámenes físicos y pruebas de laboratorio



estándar. En la Tabla 2 se detallan ambas clasificaciones así como la correlación entre las mismas.

Tabla 2: Cuadro comparativo de los estadios clínicos de Rai y de Binet para LLC

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

\*Áreas involucradas: nódulos linfáticos cervicales, axilares e inguinales, bazo e hígado; Hb: hemoglobina; SP: sangre periférica; MO: médula ósea; SV: sobrevida; Linfocitosis: recuento de linfocitos  $>5 \times 10^9/L$ ; Anemia: niveles de Hb <11 g/dL; Trombocitopenia: recuento de plaquetas (Pq)  $<100 \times 10^9/L$ ; Linfoadenop: linfoadenopatía; Esplenomeg: esplenomegalia.

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

Desde el punto de vista **morfológico**, actualmente se consideran dos subtipos de LLC: *típica* ( $>90\%$  de linfocitos de tamaño pequeño y mediano, cromatina compacta, ausencia de nucléolo y citoplasma escaso); y *atípica* ( $>10\%$  de prolinfocitos o  $>15\%$  de células plasmacitoides) con estadios clínicos más avanzados y menor sobrevida libre de tratamiento (SLT) (Müller-Hermelink et al, 2008). Respecto a la proliferación linfocitaria, el método mayormente utilizado para su evaluación es el análisis del **tiempo de duplicación linfocitaria** (TDL), definido como el tiempo necesario para duplicar la cantidad de linfocitos en SP. Este parámetro es independiente del estadio clínico, posee valor pronóstico por sí mismo y puede indicar inicio de tratamiento. Mientras que un TDL  $\leq 12$  meses identifica pacientes con mal pronóstico, un valor de TDL  $>12$  meses se asocia con un pronóstico favorable con mayor SLT (Montserrat et al, 1986; Molica et al, 1990; Molica & Alberti, 1987). Su principal desventaja es la de ser un dato retrospectivo, pudiendo demorar la decisión de iniciar tratamiento en pacientes con enfermedad agresiva.

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

En cuanto a los factores biológicos, los mismos comprenden una variedad de determinaciones que permiten definir con mayor precisión la evolución clínica de los pacientes.

**Factores pronóstico biológicos:**

- Marcadores séricos: CD23<sub>s</sub> (*CD23 soluble*),  $\beta_2M$  ( $\beta_2$ -microglobulina), TK (*timidina-quinasa*)
- Mutaciones en *IGVH*
- Alteraciones genómicas: citogenética convencional y FISH (*Fluorescence in situ hybridization*)
- Expresión de ZAP-70 y CD38
- Marcadores moleculares

El uso de **marcadores séricos** como factores pronóstico puede predecir SV o SLT. El **CD23<sub>s</sub>** es un fragmento del antígeno de membrana CD23 con función de citoquina, funcionalmente relevante en la LLC pero con valor pronóstico no del todo definido. Los niveles de CD23<sub>s</sub> tendrían implicancias en la SV global y SLT en estadios tempranos de la enfermedad, encontrándose altos niveles de CD23<sub>s</sub> asociados a mayor actividad tumoral, infiltración medular difusa, TDL < 12 meses y progresión (Seiler et al, 2006). La  **$\beta_2M$**  es una proteína extracelular que se une en forma no covalente al *Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I*. Sus niveles en suero tendrían valor pronóstico, sobre todo en estadios tempranos de la enfermedad, e incluso serían predictivos de respuesta a tratamiento (Knauf et al, 1997; Keating et al, 1998). La enzima **TK** participa en la ruta para la síntesis de ADN y refleja la capacidad de división celular, encontrándose presente en células en división y ausente en células en reposo. Sus niveles en suero serían un importante marcador de actividad proliferante, capaz de detectar pacientes en riesgo de rápida progresión, sobre todo en estadios tempranos. Algunos trabajos utilizan su valor pronóstico en combinación con otros parámetros para definir pacientes en estadios iniciales como candidatos para iniciar tratamiento, no habiéndose reportado resultados definitivos (Hallek et al, 1999; Magnac et al, 2003). De todas maneras, en la gran mayoría de los casos, ninguno de estos parámetros son concluyentes al momento de considerar una estrategia

terapéutica.

La presencia de mutaciones en los genes **IGVH** es considerado uno de los principales factores pronóstico en la biología de la LLC, sobre todo en estadios tempranos. Estudios de Damle et al (1999) y Hamblin et al (1999) mostraron que el análisis de la presencia de mutaciones en los genes **IGVH** permite dividir a la LLC en M y NM acorde a la homología con la línea germinal. A pesar de ser considerado el principal factor pronóstico en la biología de la LLC, diferentes estudios han mostrado heterogeneidad dentro de ambos grupos (Oscier et al, 2002; Tobin et al, 2002), situación puesta de manifiesto con el surgimiento de los nuevos marcadores moleculares que permiten discriminar dentro de los pacientes previamente clasificados en función de **IGVH** (Heintel et al, 2005; Josefsson et al, 2007; Kaderi et al, 2010). Este punto será analizado ampliamente más adelante.

Como se mencionó previamente, la proteína **ZAP-70** participa en la transducción de señales generadas a través del BCR permitiendo la supervivencia y/o proliferación del clon neoplásico (Nolz et al, 2005). Diferentes estudios retrospectivos en pacientes con LLC mostraron asociación entre el aumento de expresión de ZAP-70, tomando como punto de corte  $>20\%$  de células positivas por citometría de flujo, la ausencia de mutaciones en los genes **IGVH** y un pronóstico desfavorable (Rosenwald et al, 2001; Krober et al, 2006). No obstante al presente existen dificultades metodológicas y una amplia disparidad de resultados, siendo controversial su valor como marcador pronóstico. La expresión de **CD38**, proteína de membrana que marca activación y maduración celular y participa en señalización, se ha encontrado asociada a morfología linfocitaria atípica, infiltración medular no difusa, elevada linfocitosis en SP, grupos de riesgo por FISH, altos niveles de  $\beta 2M$  y pronóstico adverso (Ibrahim et al, 2001; Chevallier et al, 2002; Thornton et al, 2004). Diferentes estudios analizaron la correlación entre CD38 y el estatus mutacional de **IGVH**, observándose discordancias probablemente relacionadas con la variación en su expresión a lo largo del curso clínico (Damle et al, 1999; Hamblin et al, 1999; Hamblin et al, 2008). Actualmente este parámetro es considerado un factor de valor pronóstico independiente, existiendo controversias respecto de la determinación del punto de corte por citometría de flujo (entre  $7-30\%$ ) (Montillo et al, 2005; Moreno & Montserrat, 2008; Boonstra et al, 2006), y presentando la desventaja de su variación a lo largo de la enfermedad.

Otro de los factores biológicos importantes es el análisis de las **alteraciones genéticas**. En la LLC, su estudio se ha visto dificultado por el bajo índice mitótico *in-vitro* de las células leucémicas y la baja calidad de metafases en cultivo, aún en presencia de mitógenos específicos. En los últimos años, la introducción de la técnica de FISH como complemento de la citogenética convencional ha permitido mejorar la detección de rearrreglos genómicos clonales en esta patología así como evaluar

su importancia como factores de valor pronóstico independiente. Ambas técnicas serán analizadas y discutidas en extenso más adelante.

Respecto a los **marcadores moleculares**, actualmente existe una amplia variedad en estudio, basados en el análisis de perfiles de expresión génica característicos de la LLC, donde se destacan genes diferencialmente expresados en pacientes con enfermedad estable (LLC M) o progresiva (LLC NM) (Rosenwald et al, 2001; Klein et al, 2001). Entre estos cabe mencionar los niveles de expresión de los genes: **LPL** (*lipoprotein lipase*) (Heintel et al, 2005), **SEPT-10** (*Septin 10*) (Bilban et al, 2006) y **ADAM-29** (*desintegrin and metalloproteinase domain 29*) (Opezzo et al, 2005), así como el cociente de expresión *LPL/ADAM29*. Asimismo, un estudio reciente (Buhl et al, 2006a) mediante otra metodología experimental, identificó un nuevo gen, **CLU-1** (*chronic lymphocytic leukemia up-regulated gene 1*), sobreexpresado exclusivamente en células de LLC. Por otra parte, la definición de la LLC como una patología caracterizada por defectos intrínsecos en la maquinaria reguladora de la apoptosis (Gandhi et al, 2008), determinó el estudio de diferentes genes relacionados con este mecanismo, como es el caso de **MCL-1** (*myeloid cell leukemia sequence 1*) (Pepper et al, 2008; Veronese et al, 2008). Estos factores serán discutidos ampliamente más adelante.

Existen asimismo otros marcadores moleculares actualmente en estudio, entre los que encontramos el análisis del **perfil de microRNAs**, una clase importante de pequeñas moléculas de ARN no codificante que pueden regular la expresión de múltiples genes (Bartel, 2004; Kim, 2005; Carthew & Sontheimer, 2009). Su estudio en LLC ha permitido encontrar asociación entre la desregulación en la expresión de algunas familias de miRNAs (miR-146a/b5p, miR-148a, miR-151-3p, miR-15a, miR-155, miR-16-1, miR-181b, miR-195, miR-21, miR-29a/b/c, miR-331, miR-34a, miR-640, entre otros) y la presencia de alteraciones genómicas asociadas a la LLC, así como su correlación con otros parámetros biológicos de relevancia pronóstica, particularmente el estado mutacional de *IGVH*, sugiriendo su implicancia tanto en el inicio como en la progresión de la patología (Fulci et al, 2007; Zanette et al, 2007; Calin et al, 2008; Visone et al, 2009; Pekarsky & Croce, 2010; Visone et al, 2011). Por otra parte, estudios de Zucchetto et al (2005) permitieron determinar la coexpresión de CD38 con la molécula de adhesión **CD49d** en células de LLC. Si bien este marcador presenta expresión variable en estas células, permite discriminar dos grupos de pacientes con pronóstico diferente, aunque su empleo como factor pronóstico necesita mayor profundización (Gattei et al, 2008). Estudios recientes sugieren la expresión de **CD69**, una proteína integral de membrana expresada en células hematopoyéticas, como un marcador de significado pronóstico en LLC capaz de predecir SV, encontrándose asociado con la expresión de CD38, CD49d, ZAP-70, estatus mutacional de *IGVH*, estadios clínicos avanzados, presencia de linfadenopatias y bajo TDL, características de una

enfermedad agresiva y una mala evolución clínica (D'Arena et al, 2001; Del Poeta et al, 2012). Por otra parte, también se ha considerado la determinación de la **longitud telomérica** y **actividad de telomerasa (hTERT)** en células de LLC, habiéndose observado que los telómeros más cortos y el aumento de actividad de *hTERT* estaban relacionados a un curso clínico desfavorable, *IGVH* no mutado, sobreexpresión de ZAP-70 y CD38, y presencia de rearrreglos genómicos (Damle et al, 2004; Grabowski et al, 2005; Roos et al, 2008). Cabe resaltar que todos estos parámetros siguen siendo actualmente tema de estudio a fin de definir su real implicancia en el inicio y la evolución de la LLC.

Finalmente resulta importante mencionar el empleo de metodologías más complejas que permiten delinear aspectos más específicos de esta patología. Entre ellos, los estudios empleando *arrays* de genoma completo y técnicas de secuenciación WGS (*whole genome sequencing*) y WES (*whole exome sequencing*), han mostrado que la presencia de CNAs (*copy number alterations*) (deleciones o amplificaciones de material génico) o de disomía uniparental, así como la longitud y número de CNAs en el genoma, correlacionan con progresión de la enfermedad, evolución clonal y enfermedad refractaria (Gunnarsson et al, 2011; Ouillette et al, 2011). Otros análisis de WGS y WES reportan la presencia de un amplio espectro de mutaciones en LLC, reflejando la heterogeneidad tanto clínica como biológica de esta patología (Puente et al, 2011; Quesada et al, 2011; Fabbri et al, 2011; Rossi et al, 2012). Es de esperar que estos avances en las técnicas genómicas permitirán en un futuro próximo identificar marcadores genéticos cuya presencia pueda orientar en forma más específica a la elección del tratamiento (Clifford & Schuh, 2012).

## **1.5. Estudios citogenéticos y citomoleculares en LLC**

### **1.5.1. Análisis cromosómicos en neoplasias linfoides**

El análisis de alteraciones genéticas en neoplasias linfoides ha contribuido a la identificación de genes involucrados en la iniciación y progresión de estas entidades y constituye una de las herramientas más útiles para la evaluación de su caracterización biológica. Estas alteraciones pueden subdividirse en primarias y secundarias (Heim & Mitelman, 1995). Las anomalías primarias se encuentran frecuentemente como cambios cariotípicos únicos asociadas a tumores específicos, y su denominación se refiere no sólo al hecho de ser la primer aberración observada en estas células, sino que también reflejan un rol causal en la tumorigénesis y son esenciales en el establecimiento de la patología. En cambio, las alteraciones secundarias, como su nombre lo indica, no se encuentran solas y se desarrollan en células que poseen una alteración primaria previa. Aunque son menos específicas que las anomalías primarias, no son al azar, parecerían tener un perfil relativamente específico para

cada tipo tumoral y se considera que otorgan ventajas selectivas y proliferativas a las células neoplásicas (Beá & Campo, 2008; Ferreira et al, 2008). El espectro de estas alteraciones es complejo e incluye una amplia variedad de ganancias, pérdidas y rearrreglos cromosómicos que involucran diferentes regiones del genoma y que implican la expresión diferencial de genes con probable significado clínico, cuyo análisis podría contribuir a definir formas estables o progresivas de estas entidades, fundamentalmente en estadios tempranos de las mismas (Beá & Campo, 2008; Ferreira et al, 2008). Asimismo, en la mayoría de los subtipos histológicos de las neoplasias linfoides, el aumento en el número de alteraciones secundarias se encuentra asociado al pronóstico de la enfermedad, sustentando el valor de las mismas en la evolución tumoral (Beá et al, 2004; Salaverría et al, 2007).

### **1.5.2. Estudios de citogenética convencional en LLC**

Como se mencionó previamente, el estudio de la LLC por citogenética convencional se ha visto dificultado durante muchos años debido al bajo índice mitótico *in-vitro* de las células leucémicas así como a la sub-óptima calidad de las metafases obtenidas en cultivo, aún en presencia de mitógenos específicos para células B. En los últimos años se han incorporado nuevas metodologías, que incluyen el empleo de oligonucleótidos CpG (CpG-ODN) e interleukina-2 (IL-2) (CpG-ODN/IL-2) y la estimulación con CD40L, que han hecho factible incrementar el número de metafases y el porcentaje de pacientes con alteraciones cromosómicas (Dicker et al, 2006; Mayr et al, 2006).

Los estudios citogenéticos iniciales en LLC permitieron identificar anomalías cromosómicas clonales en aproximadamente el 40-50% de los casos, siendo la trisomía 12 la primer alteración recurrente detectada en esta entidad, con una incidencia que varía entre 6% y más del 30% en diferentes series de Europa y USA (Juliusson et al, 1990; Juliusson et al, 1991; Glassman et al, 2005; Reddy et al, 2006). La misma constituye una alteración secundaria, ya que en estudios combinados de citogenética e inmunología se observó que está presente sólo en una parte de las células neoplásicas (Crossen & Horn, 1987; Que et al, 1993; Athanasiadou et al, 2006). Esta anomalía es la de más frecuente observación por bandedo cromosómico, seguida con mucho menor incidencia por: deleciones o traslocaciones que involucran 13q14, deleciones de 11q, 6q y 17p, y traslocaciones con punto de ruptura en 14q32 (Haferlach et al, 2007; Cavazzini et al, 2008).

Si bien esta patología, a diferencia de otras neoplasias linfoides a células B, no se encuentra asociada a traslocaciones específicas, diferentes estudios han encontrado asociación entre rearrreglos estructurales y/o cariotipos complejos con progresión de la enfermedad, menor SLT e inclusive menor respuesta a la quimioterapia (Mayr et al, 2006; Shanafelt et al, 2006; Van Den Neste et al,

2007; Rigolin et al, 2012). Asimismo, durante largo tiempo, la LLC fue considerada una enfermedad genéticamente estable. Sin embargo, trabajos posteriores han mostrado la presencia de evolución clonal en el 10-20% de los pacientes, fenómeno que se caracteriza por la aparición de nuevas alteraciones citogenéticas y se asocia a un curso clínico agresivo (Chena et al, 2002; Shanafelt et al, 2006; Stilgenbauer et al, 2007; Berkova et al, 2009; Cavazzini et al, 2012; Janssens et al, 2012).

### **1.5.3. Estudios citomoleculares en LLC**

La introducción de las técnicas de FISH, que combinan la citogenética con la resolución de los métodos de biología molecular, ha tenido un gran impacto en el estudio de la LLC mejorando notablemente la detección de alteraciones, e incrementando al 82% el porcentaje de casos con rearrreglos genómicos (Döhner et al, 2000). Esta metodología posee la ventaja de detectar la presencia de alteraciones genéticas tanto en metafases como sobre núcleos interfásicos (citogenética de interfase) no siendo necesaria una población celular en división activa, y permite observar pérdidas de material genético en órdenes de magnitud de aproximadamente 100kb, presentando un alto nivel de resolución y sensibilidad. A su vez, la posibilidad de analizar núcleos interfásicos, hace factible la determinación precisa de alteraciones clonales en un gran número de células, posibilitando la evaluación de la verdadera incidencia de las mismas. Asimismo, el empleo de diferentes tipos de sondas permite la identificación de alteraciones cromosómicas de difícil interpretación, así como deleciones y amplificaciones génicas (Popescu & Zimonjic, 1997). Estos estudios mostraron como anomalía más frecuente la deleción 13q, seguida de la trisomía 12, deleciones de 11q, 17p y 6q, y traslocaciones a nivel de 14q32, observándose un 18-20% de casos sin alteraciones (Tabla 3). Estas anomalías fueron asimismo asociadas a diferentes características morfológicas y evolución clínica, estableciéndose un modelo jerárquico de riesgo citogenético donde las deleciones 17p y 11q constituyen las alteraciones de mayor agresividad y la deleción 13q como única anomalía, tiene el mejor pronóstico.

Tabla 3: Frecuencia y significado clínico de los rearrreglos genómicos más frecuentes en LLC

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

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

Las alteraciones del **cromosoma 13** fueron reportadas por primera vez por Fitchett et al (1987). Estas anomalías incluyen en su mayoría a la banda 13q14 tanto en deleciones como en translocaciones. La deleción monoalélica de 13q14 (13q14x1), observada en aproximadamente el 50% de los pacientes por FISH (Döhner et al, 2000), implica la pérdida de una región crítica de aproximadamente 350 kb, siendo el locus D13S319 el más frecuentemente afectado y, por lo tanto, de elección para su análisis. Mediante estudios de mapeo empleando YACs, diferentes autores intentaron delimitar un área mínima en la cual se producen la mayor parte de las deleciones, definiéndose una región de menos de 700 kb denominada MDR (*minimally deleted region*) y ubicada telomérica al gen *RB-1* (*retinoblastoma gene 1*), entre los marcadores D13S319 y D13S25 (Kalachikov et al, 1997; Kitamura et al, 2000; Migliazza et al, 2001). Distintos análisis observaron la presencia de un subgrupo de pacientes (35-45%) en los cuales la deleción 13q14 constituye la única alteración presente, confirmando pronóstico favorable con mayor SV respecto de aquellos casos con cariotipo normal y sin alteraciones por FISH (Döhner et al, 2000; Krober et al, 2002; Shanafelt et al, 2006; Haferlach et al, 2007). Estudios recientes han logrado detectar la presencia de un cluster de miRNAs en la región 13q14, constituido por los genes *miR-15a* y *miR-16-1*, y demostrado que ambos genes se



encuentran deletados o con una importante disminución de su expresión en la mayoría de los pacientes con LLC, indicando la implicancia de los mismos como genes blanco de la deleción (Calin et al, 2002; Cimmino et al, 2005; Linsley et al, 2007; Raveche et al, 2007; Calin et al, 2008; Klein et al, 2010). Dichos miRNAs actúan regulando negativamente la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular y la apoptosis como: *BCL-2*, *MCL-1*, *ETS-1* y *JUN* (Cimmino et al, 2005; Calin et al, 2005; Calin et al, 2007; Fulci et al, 2007; Ouillette et al, 2008). De todas maneras, la presencia de deleción 13q14 no siempre se encuentra acompañada por sub-expresión de estos miR15a/miR16-1, reflejando la heterogeneidad característica de la patología (Fulci et al, 2007; Ouillette et al, 2008). Asimismo, se pudo observar que un subgrupo de pacientes (5-15%) puede presentar pérdida de los dos alelos (13q14x2) o tener los dos clones concomitantes (13q14x1/13q14x2). Sin embargo, las implicancias pronósticas de la deleción bialélica de 13q14 son aún controversiales. Estudios iniciales de nuestro grupo (Chena et al, 2008) y otros autores (Hernandez et al, 2009) sugieren una mayor agresividad clínica en pacientes portadores de esta alteración, con menor SLT, menor TDL y estadios Rai avanzados, probablemente como consecuencia de evolución clonal y/o debido a la completa inactivación de esta región crítica por mecanismos más complejos, mientras que otros estudios no encuentran diferencias en el pronóstico de ambos grupos de pacientes (13q14x1 vs. 13q14x2) (Van Dyke et al, 2010; Garg et al, 2012). Asimismo, reportes recientes sugieren la importancia de la determinación del porcentaje de células leucémicas portadoras de esta anomalía, indicando que aquellos clones con un porcentaje de deleción 13q14 mayor al 80% poseen un pronóstico desfavorable, independientemente de encontrarse como única anomalía (Hernandez et al, 2009; Van Dyke et al, 2010). A su vez, Parker et al (2011) han observado que la amplitud de la región de deleción también tendría implicancias pronósticas, situación relacionada a que grandes pérdidas estarían afectando a múltiples genes.

En cuanto a la **trisomía 12**, la utilización de sondas específicas para la región centromérica de este cromosoma, permite detectar esta alteración por FISH sobre núcleos en interfase, siendo de mucha utilidad en los casos con escasas células en división o con clones de baja expresión. Con esta metodología su detección se encuentra entre un 15-25% de los casos (Anastasi et al, 1992; Escudier et al, 1993; Coignet et al, 1993; Döhner et al, 2000; Aoun et al, 2004; Glassman et al, 2005; Chena et al, 2008). Si bien se desconoce el rol patogénico o el mecanismo por el cual esta trisomía puede contribuir a la transformación maligna o a la progresión de la enfermedad, diferentes estudios con metodologías moleculares indican que el cromosoma 12 extra se originaría a partir de una duplicación de uno de los cromosomas 12 con retención del otro homólogo (Mecucci et al, 1988; Einhorn et al, 1989). Como se mencionó previamente, análisis moleculares permitieron identificar el gen *CLU1* (Buhl et al, 2006a), ubicado a nivel de 12q22, como el primer gen específicamente sobre-

expresado en células de LLC. Algunos estudios muestran que la trisomía 12 se encuentra asociada con morfología atípica de la enfermedad, incremento en la proporción de prolinfocitos (CLL/PL), mayor actividad proliferativa y un curso clínico más agresivo (Knauf et al, 1995; Matutes, 1996; Tefferi et al, 1997; Mittal et al, 2007; AbdelSalam et al, 2008), mientras que otros reportes no encuentran asociación entre esta alteración y la morfología, ni le asignan significado pronóstico (Geisler et al, 1997; Stilgenbauer et al, 2002). Por el momento, la presencia de trisomía 12 es considerada de pronóstico intermedio (Haferlach et al, 2007; Pfeifer et al, 2007), con una sobrevida media de 7-8 años (Brynes et al, 1995; Athanasiadou et al, 2006).

El 10-20% de los pacientes con LLC pueden presentar **delección de 11q**, alteración que con frecuencia es de aparición tardía y se encuentra acompañada por otras anomalías cromosómicas, reflejando evolución cariotípica. El grupo británico de Neilson et al (1997) confirmó la observación publicada por Fegan et al (1995), donde las deleciones en el brazo largo del cromosoma 11, particularmente en 11q23, identifican a un grupo de pacientes con pronóstico desfavorable, enfermedad más agresiva y SV más corta que aquellos casos con cariotipo normal. Esta delección se observa más frecuentemente en individuos menores de 55 años y está asociada a un cuadro clínico con extensas adenopatías, enfermedad progresiva, corta SV global y SLT (Döhner et al, 1997; Starostik et al, 1998). El grupo alemán de Döhner et al (1997) mapeó la delección 11q por FISH con clones YACs, definiendo una región crítica de 2-3 Mb para esta anomalía entre 11q22.3-q23.1. Esta región contiene varios genes entre los que se encuentra el gen *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*) (11q22.3), considerado crítico en esta alteración. Este gen codifica para una proteína serina-treonina quinasa, cuya actividad es inducida por roturas de doble cadena en el ADN. *ATM* protege la integridad del genoma induciendo la detención del ciclo celular, mantiene la estabilidad telomérica, activa los mecanismos de reparación del ADN y regula la apoptosis mediada por *TP53* (*tumor protein p53*) (Kastan & Lim, 2000). La disminución de la expresión de *ATM* determina pérdida del control del ciclo celular y disfunción de *TP53* (Bullrich et al, 1999; Boulton et al, 2001; Stankovic et al, 2002; Austen et al, 2005). También se detectó la existencia de un subgrupo de pacientes con delección de 11q22.3 y con presencia de una mutación en el alelo de *ATM* restante, lo cual lleva a la inactivación total del gen, situación asociada a expansión clonal y progresión de la enfermedad (Austen et al, 2007).

Sin duda, las **deleciones de 17p13.1**, que implican la pérdida del gen *TP53*, constituyen el factor pronóstico más significativo en LLC, demostrado en estudios multivariados tanto prospectivos como retrospectivos y en estadios iniciales y avanzados de la enfermedad. El gen *TP53* participa en el control del crecimiento celular, la diferenciación y la muerte celular programada siendo uno de los

genes más frecuentemente mutados en cánceres humanos. *TP53* regula los mecanismos de estrés extracelular, activación oncogénica y daño al ADN, y permite que la célula reaccione adecuadamente frente a estos estímulos dada su participación en el control del crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis, siendo uno de los genes más frecuentemente mutados en cánceres humanos. La incidencia de las alteraciones de *TP53* varía con el estadio de la enfermedad y las técnicas utilizadas para su estudio. En la LLC, las alteraciones de *TP53* ocurren en aproximadamente el 4/-10/ de los casos al diagnóstico, alcanzando al 40-50/ en pacientes refractarios, siendo consideradas un importante mecanismo de resistencia al tratamiento (Shanafelt et al, 2006; Shanafelt et al, 2008; Stilgenbauer et al, 2007; Zenz et al, 2008; Dicker et al, 2009). Estudios recientes han permitido determinar que la resistencia al tratamiento en pacientes con delección 17p13 se encuentra relacionada con el porcentaje de células portadoras de esta alteración. Mientras que aquellos clones con un porcentaje de delección mayor al 20/ se relacionan con un pronóstico desfavorable y resistencia al tratamiento, los pacientes con delección entre 5-20/ presentan tasas de respuesta y SV similar a los casos que no tienen esta anomalía (Catovsky et al, 2007; Tam et al, 2009). A su vez, alrededor del 80/ de los pacientes con delección de *TP53* poseen una mutación en el alelo restante, llevando a la inactivación completa del gen, en tanto que sólo el 4,5/ de los casos tiene mutación como único evento (Zenz et al, 2008; Zenz et al, 2010b). El análisis de la SV en pacientes con delección/mutación, mutación sola o delección sola ha mostrado ser muy corta en todos los grupos (Zenz et al, 2008; Dicker et al, 2009; Rossi et al, 2009), indicando la importancia de su estudio en esta patología (Oscier, 1994; Catovsky, 1997; Gonzalez et al, 2011).

Las **alteraciones de 6q** son encontradas en el 4-6% de los casos (Oscier, 1999). Los puntos de ruptura se presentan principalmente en 6q15, 6q21 y 6q25, siendo en su mayoría deleciones. Algunos estudios han descrito la presencia de deleciones en 6q como una anomalía secundaria, asociada a enfermedad progresiva, con alto recuento linfocitario, morfología atípica, CD38+ y presencia de linfadenopatías, habiéndose sugerido también que esta alteración podría representar una entidad citogenética y clínico-biológica con un perfil hematológico característico, asignándole un pronóstico intermedio (Stilgenbauer et al, 1999; Stilgenbauer et al, 2002; Cúneo et al, 2004; Wang et al, 2011), no siendo claro aún su real significado clínico.

Otras alteraciones de interés clínico son las deleciones y translocaciones que involucran a **14q** observadas en el 10/ de los pacientes (Döhner et al, 2000; Dicker et al, 2006). El valor pronóstico de las anomalías que comprometen a 14q es de difícil evaluación debido a que estos cambios suelen ocurrir en cariotipos complejos. El empleo de técnicas moleculares y citomoleculares ha permitido detectar translocaciones que involucran la banda 14q32, lugar donde se ubica el gen de

la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH@*), críticas en la patogénesis de diferentes síndromes linfoproliferativos, pero de muy baja frecuencia en la LLC (2-4%). Entre ellas encontramos la t(14;18)(q32;q21) y sus variantes en la que participa el gen *BCL-2* observada en 1-2% de los casos, usualmente con punto de ruptura hacia 5' del gen (Adachi et al, 1990; Nguyen-Khac et al, 2011). Trabajos recientes sugieren que estas translocaciones representan una de las más frecuentes alteraciones adquiridas durante el proceso de evolución clonal e identifican a un subgrupo de pacientes con pronóstico adverso (Cavazzini et al, 2008; Cavazzini et al, 2012) en tanto que otros autores no le confieren significado clínico (Put et al, 2009). La t(14;19)(q32;q13) que involucra al gen *BCL-3*, se la detecta solo en el 0,5% de los pacientes, presenta pronóstico desfavorable y podría identificar a un subgrupo de pacientes con LLC con características clínico-patológicas y genéticas particulares (Huh et al, 2011; Nguyen-Khac et al, 2011). Aparte de los mencionados, también pueden involucrarse en muy baja frecuencia otros genes como: *BCL11A* (2p12), *CCND3* (6p21) y *CDK6* (7q21), encontrándose todas estas alteraciones asociadas a un pronóstico desfavorable.

Otros tipos de anomalías halladas son: +3, +8, +18 y +19 observadas en menos del 5% de los pacientes (Döhner et al, 2000; Aoun et al, 2004; Sellmann et al, 2007). Estas alteraciones no poseen implicancias pronósticas por sí mismas. El 15% de los pacientes que desarrollan alteraciones cromosómicas adicionales, no presentan cambios en los parámetros clínicos o de laboratorio. El 8% - 10% de las LLC citogenéticamente anormales no posee ninguno de los rearrreglos nombrados, presentando en su mayoría cariotipos complejos o translocaciones poco frecuentes, indicadores de un peor pronóstico (Mayr et al, 2006; Dicker et al, 2006).

En resumen, la combinación de los datos citogenéticos y citomoleculares en LLC, permite la clasificación de la LLC en diferentes grupos de riesgo citogenético basados en la presencia de los distintos rearrreglos genómicos (Tabla 4):

Tabla 4: Grupos de riesgo citogenético

Grupos pronóstico	Rearreglos genómicos
Desfavorable	del(17p13) (>20/ ) del (11q22) cariotipos complejos con 3 o más alteraciones
Intermedio	trisomía 12 del(6q) 13q14x2 (controvertido) cariotipos con 1 o 2 alteraciones
Favorable	13q14x1 como única anomalía (<80/ ) cariotipo normal ausencia de alteraciones por FISH

## 1.6. Análisis moleculares en LLC

### 1.6.1. Perfil mutacional de *IGVH*

Como se mencionó anteriormente, el análisis del perfil mutacional de los genes *IGVH* constituye uno de los principales factores pronóstico en la biología de la LLC, sobre todo en estadios tempranos de la enfermedad. Dos grupos (Damle et al, 1999; Hamblin et al, 1999) demostraron independientemente que el nivel de mutaciones presentes en los genes *VH* permite dividir a la LLC en dos grandes grupos acorde al porcentaje de homología respecto de la línea germinal. Aquellos casos con  $\geq 98\%$  de homología son considerados NM, se asocian con peor evolución clínica, estadios avanzados, morfología atípica, rearrreglos genómicos de mal pronóstico, evolución clonal y resistencia al tratamiento; mientras que los casos con homología  $< 98\%$  son considerados M y presentan, en términos generales, mejor pronóstico (Hamblin et al, 1999; Damle et al, 1999). El establecimiento del punto de corte es arbitrario, teniendo en cuenta que este valor excluye posibles variantes polimórficas. Existen trabajos actuales que proponen una subdivisión más amplia para los casos M y NM: casos *completamente NM* (100% homología), *mínimamente M* (99-99,9%), *borderline* (98-98,9%), *M entre 96-97,9%* y *M con <96% homología* (Murray et al, 2008; Cahill et al, 2012), cuya utilidad clínica en la LLC se encuentra en evaluación.

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

unión de estos segmentos, la introducción de mutaciones somáticas a través del proceso de HMS en el CG, genera una gran variedad en el repertorio de BCRs. Estas regiones reciben el nombre de CDRs (*complementarity determining regions*), siendo la tercer región hipervariable en la cadena pesada (HCDR3) el producto de la unión V-D-J y la de mayor importancia en la generación de diversidad y especificidad antigénica en las Igs (Pristch et al, 1999) (Figura 3a).

Aunque la definición de LLC M y NM recae en la presencia/ausencia de mutaciones somáticas clonales en las células leucémicas de un determinado paciente, también se han reportado divergencias dentro de un mismo clon (Gurrieri et al, 2002). Sin embargo, los niveles de hipermutaciones activas son en general bajos y esta divergencia intraclonal puede deberse a la estimulación antigénica que induce activación de la enzima AID. Se ha visto expresión de AID en un subgrupo de casos de LLC con genes *IGVH* NM y CI activa (Oppezzo et al, 2003), los cuales se asocian con progresión, presencia de rearrreglos genómicos y menor SV (Albesiano et al, 2003; Heintel et al, 2004; Palacios et al, 2010; Hancer et al, 2011).

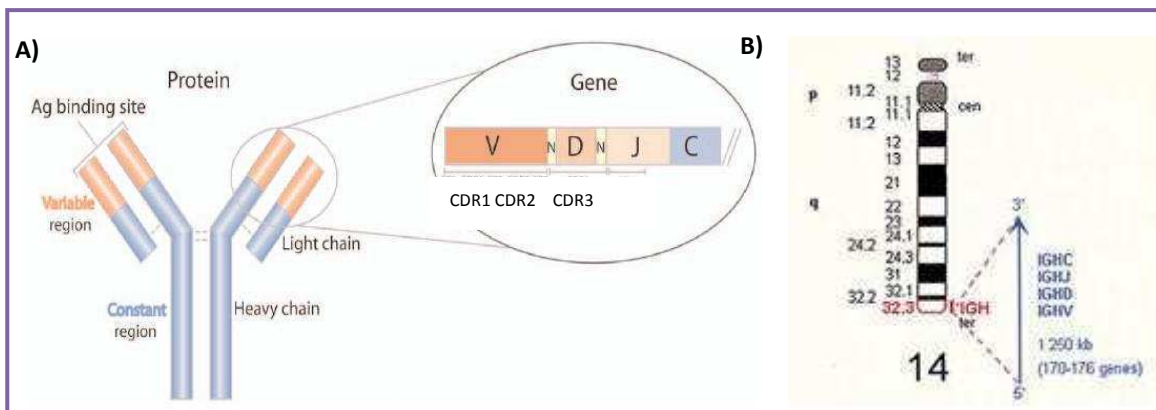


Figura 3: A) Estructura de una molécula de inmunoglobulina (Ig), compuesta por dos cadenas polipeptídicas idénticas pesadas (*H*; *heavy*) y dos livianas (*L*; *light*). Los primeros 110aa aproximadamente, constituyen la región variable (V) requerida para el reconocimiento antigénico. La región constante (C) posee actividad biológica. Se muestra la estructura génica codificante de la región VH. Las regiones CDRs (*complementarity-determining regions*) poseen la mayor diversidad, involucradas en el reconocimiento antigénico, siendo la región HCDR3 la de mayor variabilidad. D: *diversidad*; J: *unión* (adaptado de Walsh & Rosenquist, 2005). B) Localización cromosómica del locus IGH@ humano en el brazo largo del cromosoma 14 (14q32.33). El locus contiene los diferentes segmentos VH, DH, JH y segmentos constantes (C); con un total de 170-176 genes en un área aproximada de 1250Kb. El repertorio funcional es de aproximadamente 76-84 genes por genoma haploide (Lefranc, 2001).

Tal como mencionamos previamente, el locus de genes *IGH@* se encuentra localizado a nivel de 14q32.33, en un área aproximada de 1250Kb, y contiene los diferentes segmentos V, D y J, sujetos a reordenamientos en el proceso de desarrollo y diferenciación linfóide. Existen entre 123 y 129 segmentos *VH*, 26 segmentos *DH* y 6 segmentos *JH* organizados en sentido 5'→3' desde el telómero

hacia la región centromérica (Lefranc, 2001) (Figura 3b). Entre ellos, existen 42-55 segmentos VH capaces de producir rearrreglos funcionales, agrupados en 7 familias (VH1-VH7) (Figura 4). La familia VH3 es la más extensa seguida de VH4 y VH1, con 64, 32 y 19 miembros, respectivamente. Por el contrario, las familias VH2 (4 miembros), VH5 (2), VH6 y VH7 (1 cada una) (Duke et al, 2003), son de tamaño reducido. A su vez, en células B normales, los segmentos más frecuentemente utilizados en los diferentes rearrreglos son los pertenecientes a las familias VH3 (30-50% ), VH4 (20-30% ) y VH1 (10-20% ) (Pritsch et al, 1999; Duke et al, 2003; Ghia et al, 2005; Mauerer et al, 2005).

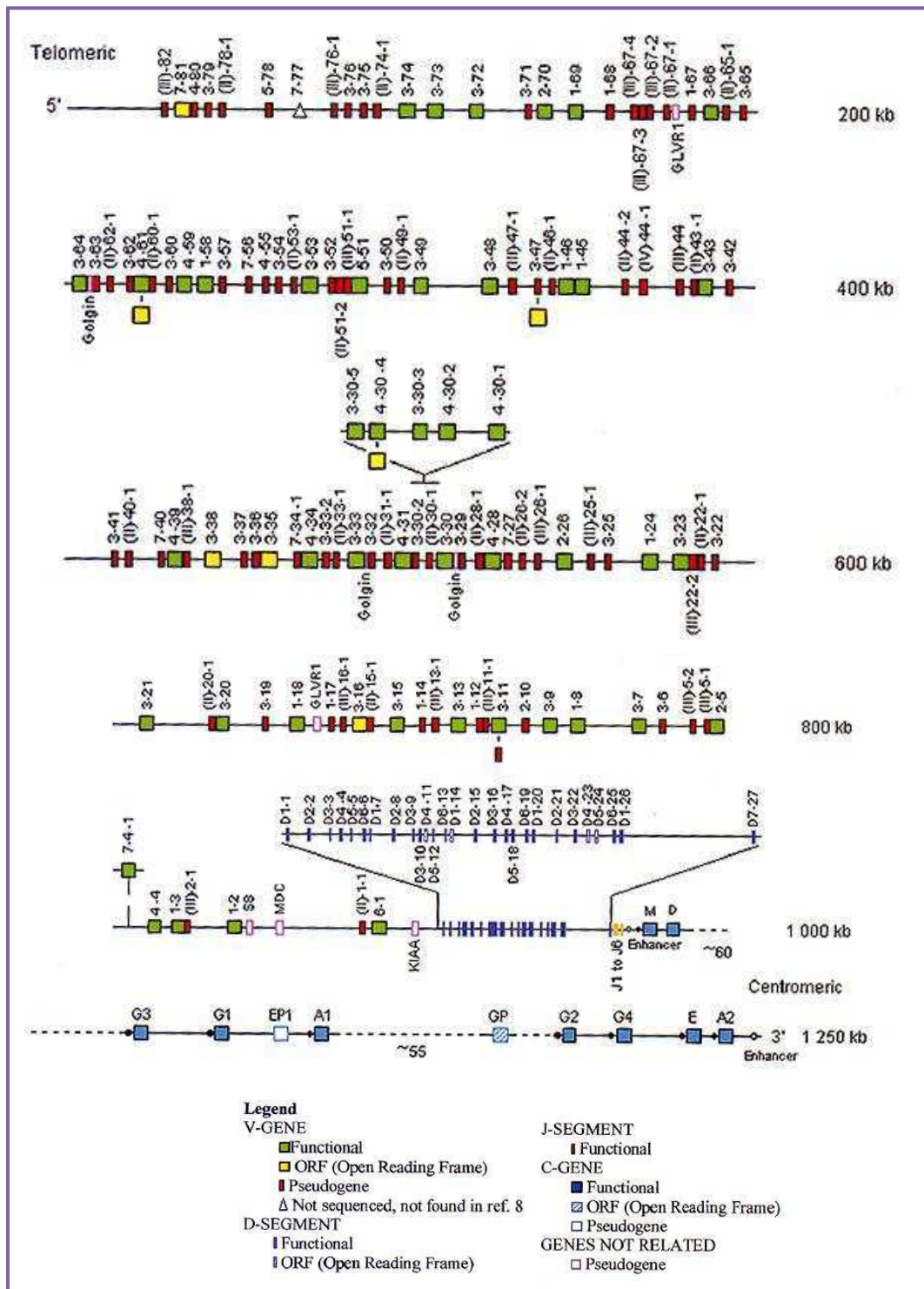


Figura 4: Representación del locus IGH@ humano en 14q32.33, mostrando los diferentes segmentos de cada familia VH. Los números romanos designan pseudogenes, no asignados a subgrupos de genes funcionales (Lefranc, 2001).

En particular, el repertorio *IGHV* encontrado en LLC es sesgado, siendo los genes pertenecientes a las familias *VH3>VH1>VH4* los más frecuentemente hallados en los pacientes. A su vez, se ha visto que las mutaciones somáticas no se distribuyen de manera uniforme entre las



diferentes familias, observándose mayor proporción de *VH3* y *VH4* entre los casos M y de *VH1* entre los NM (Fais et al, 1998; Mauerer et al, 2005). Esta jerarquía en el uso de las diferentes familias puede reflejar diferencias en el tipo de Ag involucrado en la transformación leucémica y/o en el estadio de maduración en el cual se llevó a cabo la misma (Stilgenbauer et al, 2002). Asimismo, además de la sobre-representación de *VH3* y *VH4* entre los casos M y de *VH1* en los NM, existen diferencias entre ambos subgrupos en el uso de los segmentos *JH* y *DH*, así como en la estructura de la región HCDR3, particularmente en su longitud.

El análisis de estas secuencias permitió también observar un repertorio sesgado en el uso de genes *VH* en los clones LLC, en comparación con células B normales, hallándose una mayor representación de los segmentos *IGHV1-69*, *IGHV4-34*, *IGHV3-23* e *IGHV3-21* con frecuencias que varían entre las diferentes cohortes analizadas (Bomben et al, 2007; Marincevic et al, 2010). Asimismo, distintos estudios revelaron el uso preferencial de los segmentos pertenecientes a la familia *VH1*, siendo *VH1-69* el mayormente utilizado en LLC (12-21/ ) en comparación con células B normales (1,6/ ), habiéndose asociado el uso de este segmento casi exclusivamente a pacientes NM (Potter et al, 2003; Murray et al, 2008). Por otra parte, el gen *IGHV3-21* es considerado un factor pronóstico desfavorable independientemente del estado mutacional, explicando en parte la presencia de pacientes M con mala evolución clínica (Tobin et al, 2002; Lin et al, 2003; Ghia et al, 2005).

A su vez, se ha observado expresión diferencial de algunos genes *IGHV* en diferentes regiones geográficas. Mientras en países occidentales, los segmentos más frecuentemente utilizados son *IGHV1-69*, *IGHV3-7*, *IGHV4-34* e *IGHV3-23* (Hamblin et al, 1999; Potter et al, 2003; Donisi et al, 2006; Bomben et al, 2007; Bomben et al, 2009), se ha detectado una frecuencia muy baja de casos *IGHV1-69* en países asiáticos (Koiso et al, 2006; Irons et al, 2009; Hojjat-Farsangi et al, 2009). Asimismo, se ha encontrado una mayor representación de *IGHV3-21* en países del norte de Europa en comparación con países de la región Mediterránea (Ghia et al, 2008; Cahill et al, 2012). Por el contrario, existe muy poca información sobre la distribución de genes *IGHV* en pacientes con LLC de América Latina (Pimentel et al, 2008; Bianchi et al, 2010; Marquez et al, 2012).

Como se mencionó anteriormente, el segmento HCDR3 es creado *de novo* a través del proceso de recombinación VDJ, a diferencia de los segmentos HCDR1 y 2, los cuales son codificados íntegramente por el gen *IGHV* correspondiente (Maizels, 2005). Diferentes trabajos han observado la presencia de rearrreglos IGH e IGL específicos y no al azar en LLC tanto M como NM, los cuales poseían BCRs con secuencias HCDR3 casi idénticas (“*estereotipadas*”) (Ghiotto et al, 2004; Widhopf et al, 2004; Messmer et al, 2004; Tobin et al, 2004; Stamatopoulos et al, 2007). La expresión de estos

receptores estereotipados ha sido reportada más frecuentemente en casos con IGVH NM (Messmer et al, 2004; Stamatopoulos et al, 2007) que presentan características moleculares y clínicas determinadas (Murray et al, 2008). En este contexto, estudios previos demostraron la utilización sesgada del segmento *VH1-69* en casos NM, en combinación con los genes *DH3-3* y *JH6*, y con secuencias aminoacídicas HCDR3 más largas y altamente conservadas (Widhopf & Kipps, 2001; Potter et al, 2003). Estas similitudes halladas entre los BCR de pacientes no relacionados, así como geográficamente distantes, estarían indicando la implicancia de un componente antigénico en la patogénesis de la LLC, ya sea a través de Ag específicos o epitopes estructuralmente similares (Mauerer et al, 2005; Stamatopoulos et al, 2007). Sin embargo, a pesar de las asociaciones descritas entre receptores estereotipados, la presencia de alteraciones genómicas (Athanasiadou et al, 2008; Marincecic et al, 2010; Maura et al, 2011) y características clínicas específicas (Ghia et al, 2005; Stamatopoulos et al, 2007; Bomben et al, 2007; Rossi et al, 2009), este campo es aún motivo de amplio estudio para lograr definir su significado en el pronóstico de la patología.

### 1.6.2. Nuevos marcadores moleculares

El análisis de los perfiles de expresión génica ha introducido un nuevo aspecto en la comprensión de la biología y el comportamiento clínico de la LLC (Rosenwald et al, 2001; Klein et al, 2001; Vasconcelos et al, 2005), permitiendo la identificación de numerosos genes con potencial valor pronóstico y/o terapéutico. La sobreexpresión específica de éstos en las células leucémicas, su baja o nula expresión en células B normales así como los resultados similares en linfocitos totales y purificados de LLC, los ubican como parámetros de interés para el estudio de esta patología. Entre ellos encontramos los genes ***LPL***, ***SEPT-10***, ***MCL-1***, ***ADAM-29*** y ***CLLU-1*** (Opezzo et al, 2005; Bilban et al, 2006; Buhl et al, 2006a; Van Bockstaele et al, 2007; Pepper et al, 2008; Veronese et al, 2008).

El gen que codifica para la proteína **LPL** se ubica en 8p22, en un área aproximada de 30Kb, posee 10 exones que dan lugar a varias isoformas proteicas, mediante el mecanismo de *exon-shuffling*, y una isla CpG (CpG112) en la región promotora ubicada en el 5'UTR (Figura 5) (Holmes et al, 2011).

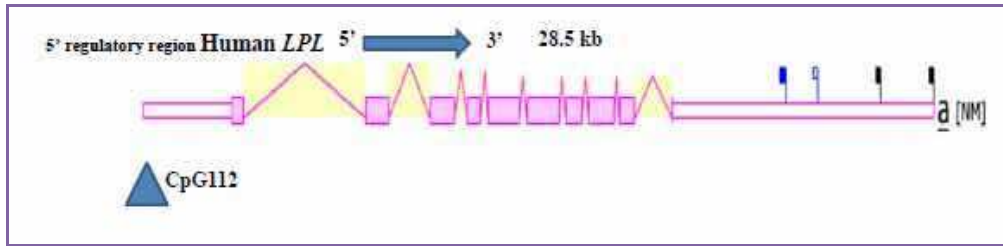


Figura 5: Estructura del gen *LPL* humano. Se muestran los exones (rosa) y la isla CpG112 en el 5'UTR. En la región 3'UTR se muestra un sitio de unión para miR29 (azul) (adaptado de Holmes et al, 2011).

La proteína LPL se organiza en una estructura homodimérica y juega un rol central en el metabolismo lipídico. Contribuye a la degradación de lipoproteínas vasculares catalizando la hidrólisis del componente triacilglicerol de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (Mead et al, 2002) y facilita la internalización mediada por receptores específicos de estas lipoproteínas en corazón, músculo y tejido adiposo. Además de su función catalítica, actúa como “puente” entre lipoproteínas y otras proteínas de la superficie celular, aumentando el contacto entre monocitos y la superficie de las células endoteliales a través de su interacción con proteoglicanos de heparan sulfato, cofactores esenciales en procesos de adhesión celular (Kolset & Salmivirta, 1999). Esta proteína se encuentra normalmente expresada en varios tejidos, incluyendo tejido adiposo, músculo cardíaco y esquelético, cerebro, pulmón, glándula mamaria, células endoteliales y macrófagos, mientras que posee niveles casi indetectables en linfocitos T y B normales purificados (Holmes et al, 2011). Se encuentra anclada en la superficie de las células endoteliales y en las de LLC y está regulada por citoquinas, incluyendo TNF- $\alpha$  (Wu et al, 2004). Si bien se desconoce su función en la patología y el mecanismo molecular encargado de regular su expresión, se ha asociado a LPL con mecanismos que podrían tener influencias tanto en la biología como en el pronóstico de la LLC. Estudios recientes de Moreno et al (2012) demuestran que la proliferación tumoral se encuentra asociada a demetilación en la isla CpG112 y la subsecuente expresión de LPL, indicando un potencial rol como blanco terapéutico para el gen *LPL* en esta patología (Moreno et al, 2012). A su vez, Pallasch et al (2008) han relacionado la expresión de *LPL* con las vías de degradación de ácidos grasos, observando alteración del metabolismo lipídico en las células de LLC, que podría ser funcionalmente relevante en la agresividad clínica de esta patología, mientras que Heintel et al (2005) consideran que su expresión podría ser un factor crítico para la proliferación y la supervivencia de las células leucémicas. Existen evidencias que indican que la evolución de la LLC resulta de un delicado balance entre células proliferantes presentes en el microambiente tisular y células circulantes resistentes a la apoptosis (Caligaris-Cappio, 2003). Este equilibrio es mantenido por la expresión de determinadas moléculas en la superficie celular de las células de LLC y su modulación en respuesta a señales del microambiente (Burger et al, 2010). La expresión de LPL en pacientes de mal pronóstico, con genes *IGVH* NM, podría

estar asociada a la capacidad migratoria del *pool* de células tumorales proliferantes, a través de la función de “puente” entre lipoproteínas y proteoglicanos. A su vez, LPL podría actuar en el *crossstalk* con células accesorias del microambiente tisular. Su expresión junto con integrinas (ej. CD49d), moléculas antiapoptóticas (ej. BCL2) y quemoquinas (ej. CCL3, CCL4, CXCL12), implicadas en la activación de las células leucémicas proliferantes, podrían ser las responsables del mantenimiento de esta activación (Burger et al, 2010; Palacios et al, 2010). Asimismo, estudios de Mansouri et al (2010) han observado asociación entre la sobreexpresión de LPL con una baja actividad catalítica de la misma, remarcando la necesidad de mayores análisis que determinen el rol de esta proteína en la patogénesis de la LLC. A pesar de que su función exacta en la patología sigue siendo tema de estudio, diferentes autores consideran a la expresión de *LPL* como un marcador importante de valor pronóstico adverso en LLC (Heintel et al, 2005; Nüchel et al, 2006; Van't Veer et al, 2006; Van Bockstaele et al, 2007; Kaderi et al, 2011).

El gen **SEPT-10** se encuentra ubicado en el cromosoma 2, a nivel de 2q13. Pertenece a una familia evolutivamente conservada que posee 14 miembros en diversas localizaciones cromosómicas agrupadas en 4 grandes grupos de acuerdo a su secuencia aminoacídica (Nakahira et al, 2010). Esta familia agrupa diferentes genes que codifican para proteínas de unión a GTP (*guanosine triphosphate*) y formadoras de filamentos, implicadas en la determinación de la polaridad celular, reorganización del citoesqueleto, dinámica de membranas, tráfico de vesículas y exocitosis (Hall et al, 2005). Sus pesos moleculares varían entre 30-65 KDa y presentan alta identidad de secuencia en su dominio central. Cada uno de los miembros de la familia de *Septinas* posee a su vez variantes de *splicing* que dan lugar a varias isoformas, que comparten la región central que posee el sitio conservado de unión a GTP. Este dominio central se encuentra flanqueado por dominios carboxilo- y amino-terminales que difieren entre las distintas *septinas* pero que generalmente contienen regiones mediadoras de interacciones proteína-proteína. El dominio de unión a GTP también contiene una región responsable de unión a fosfolípidos que media interacción con la membrana. Estas proteínas interactúan predominantemente entre ellas, excepto SEPT-10, y se involucran en diversos procesos como citoquinesis, dinámica de membranas, cascadas de transducción de señales, eventos de señalización, control del ciclo celular, etc (Nakahira et al, 2010). En particular, SEPT-10 se la ha asociado con procesos de división celular y regulación del ciclo junto con SEPT-1, -6 y -8 (Nakahira et al, 2010). Su expresión se ha visto alterada en diferentes neoplasias, enfermedades neurodegenerativas e infecciones. Interactúa indirectamente con LPL por unión a la actina del citoesqueleto, participando en el reordenamiento de proteoglicanos (receptores de LPL) en la superficie celular. Estudios de microarrays y de PCR cuantitativa (QRT-PCR) permitieron determinar la expresión específica de ambos genes en células de LLC, con alta expresión del mismo en pacientes

con *IGVH* NM, niveles elevados de *LPL* y menor *SLT*, sugiriendo su asociación con un pronóstico adverso (Bilban et al, 2006; van't Veer et al, 2006; Benedetti et al, 2008).

Simultáneamente, el estudio de los perfiles de expresión génica de la LLC, permitió la identificación del gen ***ADAM-29***, localizado en 4q34 (Figura 6), que estaría asociado a buena evolución clínica (Oppezzo et al, 2005). El mismo codifica para una proteína miembro de la familia de disintegrinas y metaloproteasas de transmembrana, las cuales median interacciones célula-célula y/o célula-matriz así como también participan en la proteólisis de diferentes moléculas de superficie (Primakoff et al, 2000). A diferencia de otras proteínas de la misma familia, su expresión se encuentra normalmente restringida a tejido testicular. En particular, se han encontrado mutaciones en este gen en células de melanoma, causando defectos en la adhesión de las mismas a proteínas de la matriz extracelular y facilitando su capacidad de migración (Wei et al, 2011). El análisis por QRT-PCR de su expresión en LLC mostró resultados similares en linfocitos, tanto totales como purificados, con ausencia de expresión en células B normales, lo que indicaría que la sobreexpresión es específica de las células leucémicas (Oppezzo et al, 2005). Aunque también se desconoce su función en ellas, se ha hallado sobreexpresión en pacientes LLC con *IGVH* M relacionándola con buena evolución clínica (Oppezzo et al, 2005). A su vez, se propone el análisis de la relación entre la expresión de *LPL* y *ADAM-29* como un mejor predictor de pronóstico en estos pacientes (Oppezzo et al 2005; Maloum et al, 2009).

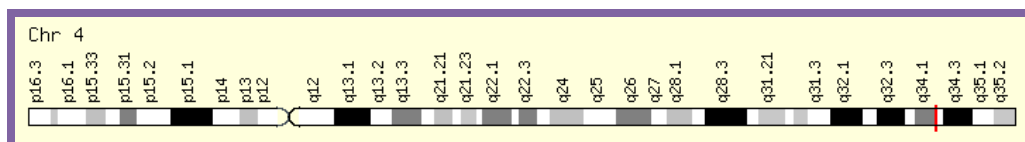


Figura 6: Localización cromosómica del gen *ADAM-29* en la región 4q34 (rojo).

Por otra parte, el empleo de otro abordaje molecular denominado *differential display*, técnica que posee la ventaja de detectar no solo ARNm conocidos sino también ARNm nuevos que podrían estar expresándose en las células leucémicas, permitió el clonado y la identificación del gen ***CLU-1***, ubicado en 12q22 y sobreexpresado específicamente en las células de LLC (Buhl et al, 2006a). El mismo presenta seis diferentes transcritos, no similares a otros genes humanos y al parecer no codificantes, uno de los cuales tendría valor pronóstico en esta patología (Figura 7a) (Buhl et al, 2006a). Si bien se desconoce su función, el modelado tridimensional de estos transcritos ha permitido observar, para dos de ellos, una potencial secuencia codificante de 121 aminoácidos con baja homología pero con estructura similar a la IL-4, y con posible capacidad de unión al receptor de IL-4, eje importante en el microambiente proliferante de las células leucémicas (Figura 7b) (Buhl et al, 2006a). Sus niveles de expresión en células de LLC abarca un amplio rango, mientras que siempre

se expresa en bajos niveles en células B normales y se encuentra ausente en células T y NK (Buhl et al, 2006a; Josefsson et al, 2007). Al no presentar conservación evolutiva hace suponer que no es requerido para el desarrollo de las células B normales (Buhl et al, 2006a). Si bien se desconoce su función en éstas células, su especificidad de tejido podría aportar información extra no ofrecida por otros marcadores (Josefsson et al, 2007). A su vez, el aumento de su expresión se ha encontrado asociado a progresión de la enfermedad y corta SLT (Buhl et al, 2006b; Chen et al, 2007), particularmente en individuos menores de 70 años (Josefsson et al, 2007). A pesar de encontrarse ubicado en el cromosoma 12, no se ha reportado un aumento significativo en pacientes con trisomía 12, indicando que su sobreexpresión no se encontraría ligada a un aumento de dosis génica (Buhl et al, 2006a). A su vez, dado que los niveles de transcrito se mantienen constantes en células leucémicas de pacientes con LLC que no han recibido tratamiento, un estudio reciente propone el análisis de los niveles de expresión de *CLLU1* para la detección de enfermedad residual post-tratamiento (Buhl et al, 2011).

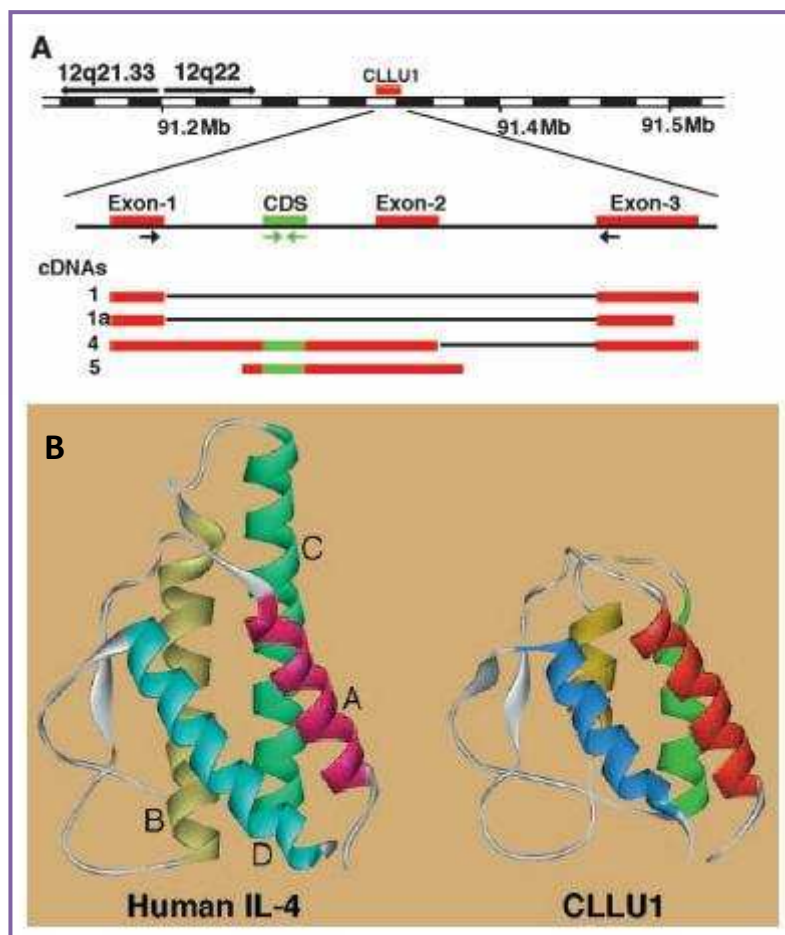


Figura 7: a) Esquema del locus 12q22 donde se ubica *CLLU1* y su estructura génica. Se muestran los primers utilizados en la técnica de *differential display* que permitieron la identificación de los seis transcritos, se muestran además cuatro de estos transcritos siendo el cDNA1 el más frecuentemente expresado en los pacientes (adaptado de Buhl et al, 2006b); b) Estructura tridimensional de IL-4 (izquierda) y *CLLU1* (derecha), mostrando la estructura de 4  $\alpha$ -hélices compartidas (A-D) (adaptado de Buhl et al, 2006a).

Como se mencionó previamente, existen evidencias que asocian la evolución de la LLC como resultado de un balance entre células proliferantes situadas en los pseudofoliculos y células circulantes en estado quiescente (Caligaris-Cappio et al, 2003). Este equilibrio es mantenido por la expresión de moléculas específicas, defectos en la maquinaria reguladora de la apoptosis y/o su modulación en respuesta a la desregulación de señales de supervivencia del microambiente (Gandhi et al, 2008; Burger et al, 2010). Por este motivo, resulta de interés el estudio de los genes reguladores de la apoptosis, fenómeno crucial en el desarrollo y homeostasis de tejidos así como en la oncogénesis. Este proceso involucra el control de genes regulatorios específicos y un balance entre la expresión de proteínas anti- y pro-apoptóticas que participan en el mismo. Entre estos genes se encuentran los pertenecientes a la familia BCL2 (B-cell leukemia/lymphoma 2), que incluye genes pro-apoptóticos como *BAX* y *BAK*, y anti-apoptóticos como *BCL-2*, *BCL-XL* y ***MCL-1***, que controlan la liberación de citocromo C (Cyt C) desde la mitocondria en la vía intrínseca de la apoptosis y se caracterizan por poseer al menos un dominio BH (*BCL-2 homology*). Las proteínas anti-apoptóticas poseen cuatro dominios BH e interaccionan con otras de la misma familia para prevenir la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, la consecuente liberación de Cyt-C y la activación de caspasas. Las pro-apoptóticas se dividen en dos grupos: el primero incluye las proteínas Bax y Bak que poseen tres dominios (BH1-3), mientras que el segundo (Bim, Bad, Bid, Noxa y Puma) solo mantiene homología con el dominio BH3, conocidas como *BH3-only*. Se cree que estas últimas se activan en respuesta a estímulos de muerte causando activación de Bax y Bak, permeabilización de membrana mitocondrial, liberación de Cyt-C y activación de caspasas (Buggins & Pepper, 2010).

El gen ***MCL-1***, ubicado en la región 1q21, se destaca por ser esencial para el desarrollo temprano e implantación embrionaria; supervivencia y auto-renovación de progenitores hematopoyéticos y linfoides; desarrollo y mantenimiento de linfocitos B y T maduros, tanto normales como malignos y función efectora de macrófagos (Opferman et al, 2003; Germain & Duronio, 2007; Campbell et al, 2010). Codifica para una proteína anti-apoptótica y se encuentra dinámicamente regulado, a nivel del ARNm y proteico, en respuesta a cambios en el microambiente (Figura 8). *MCL-1* bloquea directa o indirectamente la activación de proteínas pro-apoptóticas de la misma familia, como *BAX* y *BAK* (Germain & Duronio, 2007), actuando como un importante regulador del proceso de apoptosis en células de origen hematopoyético, incluyendo las células de LLC (Awan et al, 2009), modulando la respuesta a los distintos agentes terapéuticos. Distintos autores han asociado altos niveles de expresión de este gen con la dificultad de lograr una respuesta completa a agentes quimioterapéuticos (clorambucil, fludarabina y rituximab) tanto *in-vitro* como *in-vivo* (Longo et al, 2008; Véronèse et al, 2008; Awan et al, 2009), sugiriéndose como posible target terapéutico. Por otra parte, distintos estudios muestran resultados contradictorios al evaluar la asociación entre la

expresión de *MCL-1* y diferentes marcadores pronóstico de la LLC como los estadios clínicos, la expresión de ZAP-70, CD38 y también el estado mutacional *IGVH* (Pepper et al, 2008; Véronèse et al, 2008).

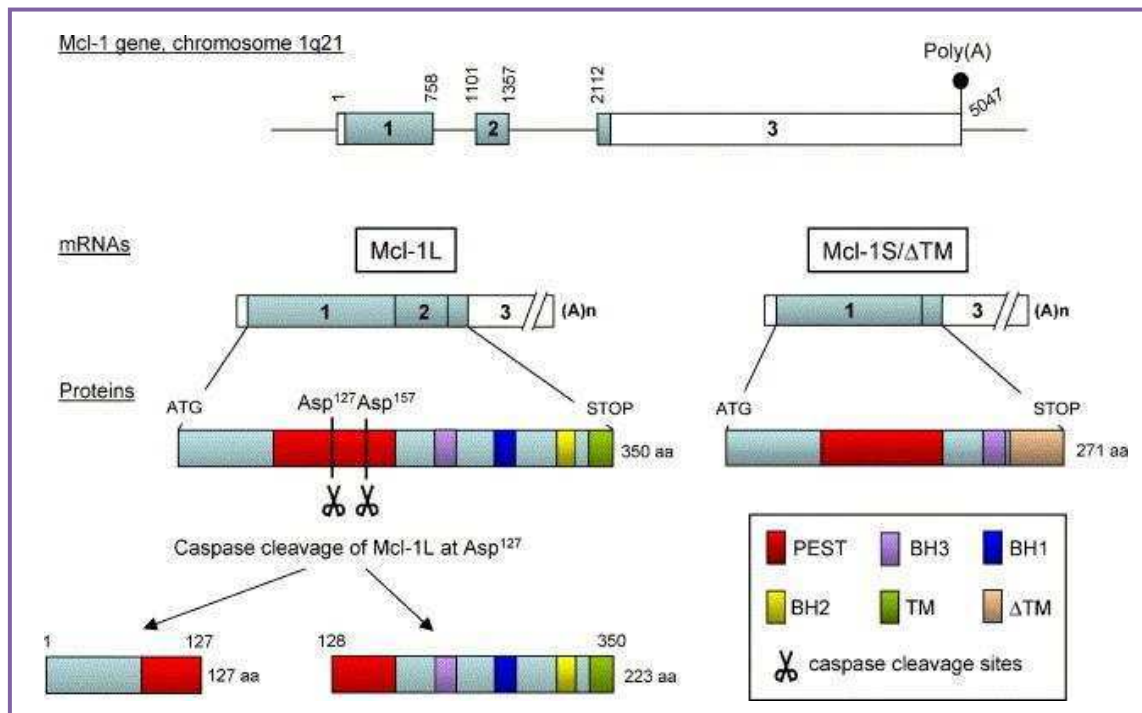


Figura 8: Organización molecular del gen *MCL-1* en el locus 1q21. Posee tres exones codificantes y al menos 2 sitios de poliadenilación para el mRNA de *Mcl-1*. Por *splicing* alternativo se originan dos ARNm: *Mcl-1L* (largo) que incluye al exón 2 y *Mcl-1S/ΔTM* (corto) que no incluye el segundo exón. Se muestran los diferentes dominios proteicos: PEST, BH (Bcl-2 homology) y TM (transmembrana); y los sitios de clivaje de caspasas en Asp<sup>127</sup> y Asp<sup>157</sup>. En la isoforma *Mcl-1S/ΔTM* el *splicing* exon1/exon3 causa un cambio de lectura en la traducción de la secuencia del exón 3 que genera la no inclusión del dominio TM (adaptado de Michels et al, 2005).

Si bien la expresión de estos genes ha sido evaluada en función de los diferentes parámetros clínicos, es muy poca y contradictoria la información respecto de su correlación con los rearrreglos genómicos de la LLC (Heintel et al, 2005; Van't Veer et al, 2006; Kaderi et al, 2010) y, a nuestro conocimiento, no existen datos sobre su relación con las alteraciones cariotípicas presentes en esta patología. Los resultados que surjan de efectuar estos estudios ayudarán a definir el valor predictivo de estos marcadores en estadios tempranos de la enfermedad, que permita identificar subgrupos de pacientes con diferente evolución clínica, así como profundizar la caracterización biológica y la comprensión de los mecanismos patogénicos de la LLC.



## **2. Objetivos**

## 2. Objetivos

Teniendo en cuenta lo anteriormente expresado, el objetivo general del presente trabajo de investigación se encuentra dirigido al estudio de marcadores genéticos en leucemia linfocítica crónica tendiente a comprender y definir su participación en el proceso de desarrollo y progresión de la enfermedad, siendo sus objetivos específicos:

- Efectuar la caracterización citogenética y citomolecular de alteraciones genómicas en LLC, tendiente a definir su significado clínico y valor predictivo en estadios iniciales de la enfermedad.
- Evaluar el estado mutacional y los rearrreglos del gen *IGVH*, mediante PCR convencional y secuenciación, a fin de establecer su frecuencia y distribución en nuestra población de pacientes con LLC.
- Cuantificar los niveles de expresión de los genes *SEPT-10*, *MCL-1*, *LPL*, *ADAM-29* y *CLLU-1*, mediante PCR cuantitativa y establecer su correlación con los rearrreglos genómicos de la patología.
- Estimar la utilidad de estos marcadores para redefinir los grupos de riesgo establecidos, contribuyendo a una mejor caracterización biológica de esta entidad.

### **3. Materiales y Métodos**

### 3. Materiales y métodos

#### 3. 1. Población estudiada

En el presente estudio se evaluaron 223 pacientes con LLC. Las muestras fueron obtenidas por el médico hematólogo y derivadas al Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina, previa conformidad y consentimiento informado de los pacientes. Los estudios efectuados en este trabajo fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. Asimismo, para los estudios moleculares de expresión génica se analizaron 10 individuos sanos que constituyeron la población control. En la Tabla 5 se muestra la distribución por edad y sexo de los pacientes estudiados.

Tabla 5: Distribución de casos por edad y sexo

Nº Casos	Edad media (rango) (años)	Sexo	
		M	F
223	63,1 (33-83)	148	75

El diagnóstico y la progresión de la enfermedad en fueron definidos en base a los criterios establecidos por la WHO 2008 (Müller-Hermelink *et al*, 2008; Hallek *et al*, 2008; Marquez *et al*, 2011). Para los estadios clínicos se tuvo en cuenta la clasificación de Rai (Rai *et al.*, 1975). Se consideró enfermedad progresiva a la aparición de síntomas B, linfocitosis progresiva, presencia de linfopatías, hepato- o esplenomegalia, transformación a una histología más agresiva (Síndrome de Richter, leucemia prolinfocítica), ocurrencia de anemia o trombocitopenia, y enfermedad estable a la ausencia de síntomas de progresión.

#### 3. 2. Metodología

##### 3.2.1. Cultivo de sangre periférica (SP)

##### Soluciones utilizadas

- Medio de cultivo F-12: disolver 10,6 g de medio F-12 con 1mM/L de L-glutamina en 1 L de agua bidestilada estéril. Adicionar 1,176 g/L de bicarbonato (NaHCO<sub>3</sub>). Agitar suavemente

hasta disolver y agregar HCl 1N para llevar a pH 6,5. Esterilizar por filtración con filtro Millipore, fraccionar y controlar esterilidad.

- Suero Fetal Bovino (SFB)
- Antibióticos (Solución de gentamicina)
- Pokeweed mitogen (PW)
- Lipopolisacarido (LPS)
- Colchicina: 1 mg de Demecolcin (CIBA) en 100 mL de agua bidestilada (solución madre de 10 µg/mL).
- Solución hipotónica KCl (0,075 M)
- Fijador Metanol: Acido acético glacial (3:1)

### **Procedimiento**

Se efectúan cultivos de SP con estimulación mitogénica partiendo de 5 mL de sangre extraída en jeringa estéril heparinizada.. El cultivo madre se realiza a partir de 6mL de medio F-12 y 2 mL de muestra. Los cultivos se realizan en 8 mL de medio F-12 suplementado con 15/ (2 mL) de SFB, 50 µL de L-glutamina, 2 mL de solución madre y el agregado de 0,2 µl de PWM o LPS e incubación durante 96 hs.

Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionan 100 µl de Colchicina (concentración final 0,1µg/ml) para detener la división celular en metafase, incubando a 37°C durante 50 minutos. Luego se centrifuga 10 min a 600-800 rpm, se descarta el sobrenadante y se someten los cultivos a shock hipotónico adicionando solución de KCl 0,075M, resuspendiendo suavemente y dejando actuar por 40-42 min a 37°C.

La hipotonía se detiene agregando algunas gotas de fijador (metanol: acido acético glacial (3:1)), se centrifuga 10 min a 600-800 rpm, se descarta el sobrenadante y se agrega fijador al pellet de células, se resuspende nuevamente y se mantiene a temperatura ambiente durante 30 min. Se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Se repiten estos lavados hasta que el pellet celular queda limpio y se diluye con fijador a una concentración adecuada. La suspensión celular se utiliza para preparar extendidos sobre portaobjetos limpios y secos, dejando caer la gota de solución a una distancia de 20-30 cm. Se deja secar al aire.

### 3.2.2 Técnicas citogenéticas

#### 3.2.2.1. Tinción con colorante Wright

- Solución stock de colorante Wright (Sigma): 3gr en 1000 mL de metanol

Las tinciones convencionales (estándar) se realizan sumergiendo el preparado en colorante Wright (5mL solución stock + 25mL H<sub>2</sub>O) durante 5 minutos. Se lava con agua corriente, se deja secar a temperatura ambiente y se observa al microscopio.

#### 3.2.2.2. Técnica de bandeo G

##### Soluciones de trabajo

- Solución de tripsina 0,1% :

NaCl 9‰	22,5 ml	
NaHPO <sub>4</sub> 0,11N	22,5 ml	
Solución madre de Tripsina Difco 1%	<u>5,0 ml</u>	
	50,0 ml	pH 7,5

En el momento de utilizar se prepara una solución de tripsina al 0,1% y se sumerge el extendido envejecido a temperatura ambiente por lo menos 5 días o en estufa a 55°C-60°C durante 24 hs, en la solución mantenida a 37°C durante tiempos variables de acuerdo a las características del extendido (aproximadamente 1 segundo por día de envejecimiento). Lavar en solución de NaCl 9‰, para detener la acción de la tripsina, y colorear con solución de Wright durante 5 minutos. Lavar con agua corriente y dejar secar a temperatura ambiente. Observar al microscopio.

Esta técnica permite identificar los pares de cromosomas homólogos de acuerdo al patrón de diferenciación longitudinal de bandas establecido en la *París Conference* (1971) y sus posteriores actualizaciones (ISCN, 2011) (Figura 1b) así como detectar las diferentes anomalías numéricas y estructurales. Un ejemplo de metafase y cariotipo normal con técnica de bandeo G se observan en la Figura 9.

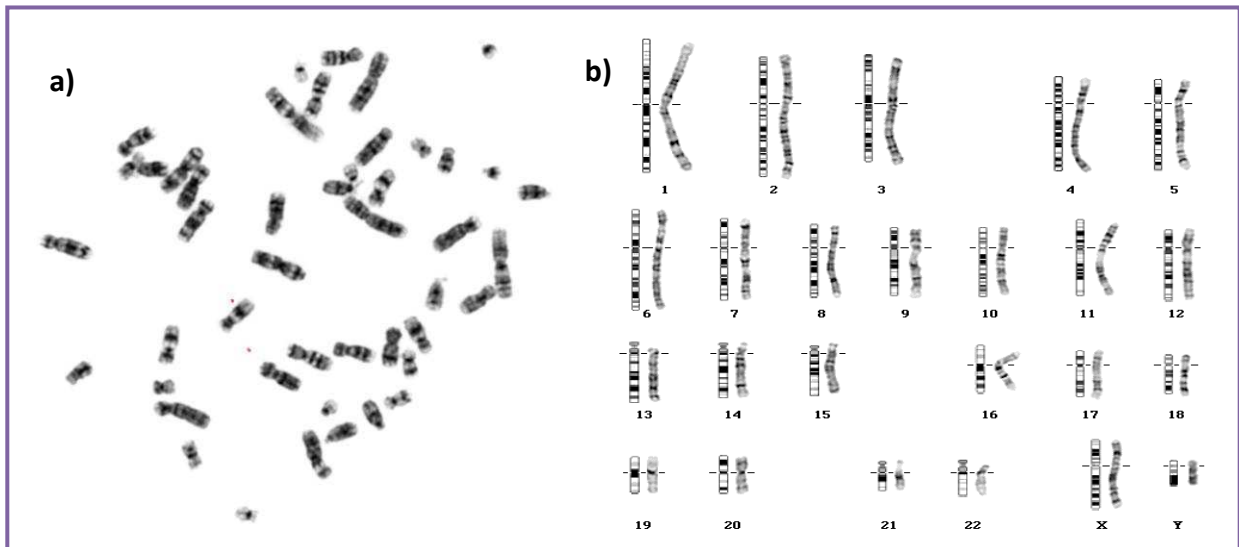


Figura 9: a) Metafase con técnica de bandeo G; b) Cariotipo masculino normal mostrando el patrón de bandas G (izquierda) y el ideograma correspondiente (derecha).

### 3.2.3. Evaluación microscópica

El análisis cromosómico se efectúa mediante la observación directa al microscopio de campo claro de, al menos, 11 metafases con tinción estándar y con técnica de bandeo G, a fin de determinar el número modal y las características citogenéticas del material. En caso de observarse anomalías numéricas y/o estructurales se capturan las metafases y se confeccionan los cariotipos de dichas células empleando el software Cytovision (Applied Imaging). En todos los casos se empleó la nomenclatura establecida en el *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2011).

Se considera cariotipo simple a aquel que presenta 1 o 2 alteraciones cromosómicas, cariotipo complejo cuando se encuentran 3 o más anomalías y cariotipo compuesto (cp) al que se genera a partir de diferentes células que comparten algunas alteraciones citogenéticas clonales.

Un clon es definido como una población celular derivada a partir de una única célula progenitora. Se considera clon a la presencia de dos células con la misma alteración estructural o con cromosomas en exceso, o bien tres si se trata de una pérdida. Un clon puede no ser completamente homogéneo considerándose la presencia de diferentes subclones como producto de la evolución cariotípica clonal.

### 3.2.4. Técnicas citomoleculares

#### 3.2.4.1. Hibridación in-situ con fluorescencia (FISH)

##### Soluciones utilizadas

- PBS (phosphate-buffered saline) 10X: solución stock

ClNa	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g

Ajustar a pH 7,4 con HCl 1N y llevar a 1 L con H<sub>2</sub>O destilada. Autoclavar.

- PBS 1X
- Solución salina de citrato de sodio (SSC) 20X: solución stock

ClNa	175,3 g
Citrato de Na.2 H <sub>2</sub> O	88,24 g

Disolver en 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril, ajustar a pH 7 con HCl 5M y llevar a un volumen final de 1L. Autoclavar.

- 2X SSC
- Pepsina: solución stock 10/ (0,1 g pepsina/ 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). La solución stock se separa en alícuotas de 35 µL y se mantiene a -20°C hasta el momento de su uso.

- HCl 1N
- Cl<sub>2</sub>Mg 1M
- Solución de formaldehído:

PBS 10X	7 mL
Cl <sub>2</sub> Mg 1M	3,5 mL
Formaldehído	1,89 mL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	<u>57,6 mL</u>
	70 mL

- Soluciones de etanol 70/ , 90/ y 100/ : preparar las diluciones de EtOH absoluto con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, en el momento de usarlas.



- NFD (solución antifade)

Leche en polvo descremada      5 g  
 4XSSC                                      100 mL

Reposar la solución durante 15 min y centrifugar a 10.000 rpm. Ajustar a pH 7 separar en alícuotas el sobrenadante y almacenar a -20°C.

- TNB (TRIS-NaCl-Buffer)

TRIS HCl 1M (pH 7)                                      100 mL  
 NaCl 5M (pH 7,5)                                      30 mL  
 H<sub>2</sub>Od c.s.p.    1L

- 4T (4X SSC/ 0,05/ Tween-20):

20X SSC    200 mL  
 Tween-20 0,05/ (500µl Tween-20/ 100mL H<sub>2</sub>Od)      500 µl  
 H<sub>2</sub>Od c.s.p.    1L

- TNT (Tris- NaCl- Tween)

Tris HCl pH 7    100 mL  
 NaCl 5M    30 mL  
 Tween-20 10/ (1 mL Tween-20/ 10 mL H<sub>2</sub>Od)      5 mL

- NaOH 5M

- 0,4XSSC/ 0,3/ Tween-20

20X SCC (pH 5,3)                                      20 mL  
 Tween-20    3 mL  
 H<sub>2</sub>Od    950 mL

Mezclar hasta disolver completamente y ajustar pH a 7-7,5 con NaOH 5M y llevar a 1L con H<sub>2</sub>Od estéril.

- 2XSSC/ 0,1/ Tween-20

20X SCC (pH 5,3)                                      100 mL  
 Tween-20    1 mL  
 H<sub>2</sub>Od    850 mL

Mezclar hasta disolver completamente y ajustar pH a 7-7,5 con NaOH 5M y llevar a 1L con H<sub>2</sub>O estéril.

## **Procedimiento**

Preparación de la muestra: El material a analizar se extiende sobre un portaobjetos limpio y se controla, por contraste de fase con objetivo 10X, que disponga de una concentración aproximada de 100 núcleos por campo. El área a hibridar se marca con lápiz de punta de diamante.

Pre-tratamiento del material extendido: Este paso es opcional y se utiliza con el fin de obtener una mejor calidad del preparado produciendo la degradación de proteínas citoplasmáticas y de ARN en aquellos cultivos que no sean de buena calidad. Realizar un lavado en 2X SSC (dilución 1:10 de la solución stock 20X SSC con H<sub>2</sub>O) y luego en PBS 1X (dilución 1:10 de la solución stock de PBS 10X con H<sub>2</sub>O), ambos durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación. Incubar por 5 minutos en una solución de pepsina al 0,005% (35 µL de solución stock 10% pepsina, 700 µL HCl 1N y 69 mL H<sub>2</sub>O) en baño a 37°C, luego lavar por 5 minutos en PBS 1X a temperatura ambiente. Fijar el material en una solución de formaldehído ácido libre 1% durante 10 minutos y repetir el lavado en PBS. Deshidratar en una serie creciente de etanol 70%, 90% y 100%. Una vez secado al aire, el extendido puede ser procesado o guardado a -20°C.

Preparación de la sonda: Se utilizaron las sondas: α-satélite del cromosoma 12, y de secuencia única: D13S319 (13q14), ATM (11q22.3) y TP53 (17p13) (Vysis-Abbott o Live-LEXEL) (Figuras 10 y 11). La sonda diluida en el buffer correspondiente en un tubo Eppendorf se desnaturaliza a 72°C ± 2°C en baño por 5 minutos, luego se realiza un *spin* para coleccionar el contenido en el fondo del tubo y se mantiene en baño a 37°C hasta el momento del uso.

Hibridación: El material previamente tratado es desnaturalizado en una solución de formamida 70% /2X SSC, en baño a 72°C ± 2°C por 5 minutos y pasado nuevamente por la serie creciente de etanol 70%, 90% y 100%. Una vez seco se agrega la sonda ya desnaturalizada, se coloca un cubreobjetos en el área de hibridación y se sellan los bordes. La hibridación se realiza a 37°C en cámara húmeda por 24 hs.

Lavados y montaje: Para retirar excesos de sonda se efectúa un lavado en solución 0,4X SSC/ 0,3% Tween-20 a 72°C durante 2 minutos y un lavado en solución 2X SSC/ 0,1% Tween-20 a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se deja secar sobre papel absorbente en oscuridad. Se aplican 10 µL de DAPI (4',6-diamino-2-fenil-indol) a una concentración final de 0,3 µg/mL en medio de montaje para fluorescencia, se coloca un cubreobjetos y se observa con microscopio de

epifluorescencia (Olympus BX51) con los filtros apropiados. Para cada sonda se analizan 200-400 núcleos interfásicos y eventuales metafases en casos y controles, evaluando la frecuencia de núcleos con 0, I, II, III, y IV marcas. Se consideró como control a un individuo sano y normal, sin enfermedad aparente. Los puntos de corte fueron calculados en 10 controles normales sumando 3 desvíos estándar (SD) a la media de las células con trisomía o delección ( $\bar{X} + 3SD$ ). En base a estos datos consideramos la presencia de trisomía 12 y deleciones hemicigotas de D13S319, ATM y TP53 cuando los valores eran mayores a 3,02/ , 10,2/ , 7,7/ y 5,1/ , respectivamente.

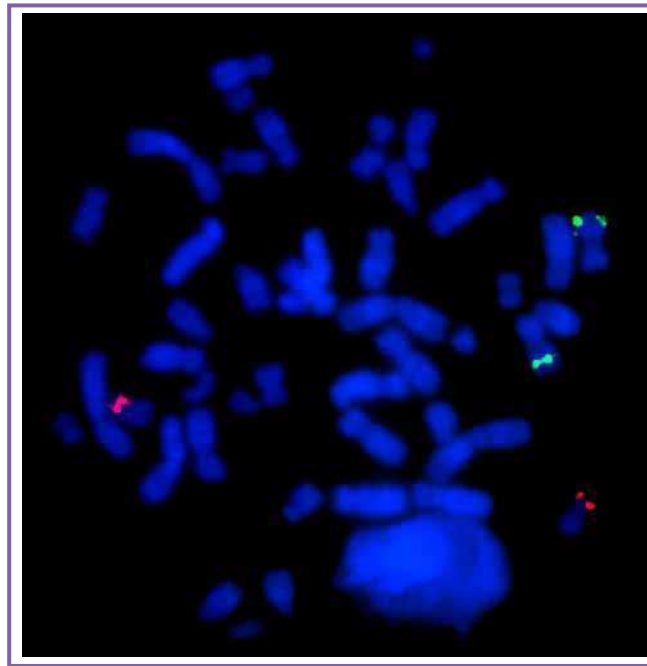


Figura 10: Metafase normal de cultivo de linfocitos de SP hibridada con las sondas LSI TP53 (17p13) (rojo) y LSI ATM (11q22.3) (verde) (Vysis-Abbott), empleando DAPI como contracolorante.

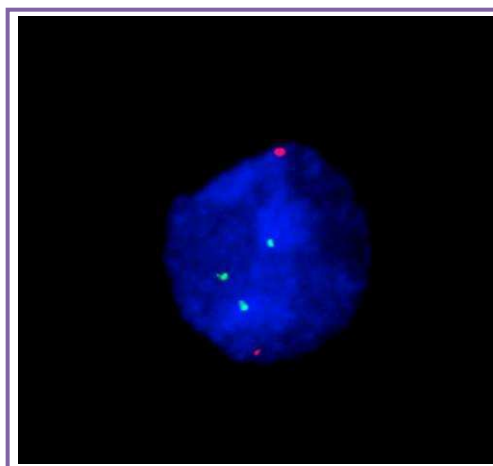


Figura 11: Núcleo interfásico hibridado con sonda para el centrómero del cromosoma 12 (verde) y sonda LSI D13S319 (13q14) (rojo) (Vysis-Abbott), empleando DAPI como contracolorante, mostrando trisomía 12.

Hibridación y amplificación de la señal para sondas indirectas marcadas con biotina (CAMBIO): Se utilizaron sondas biotiniladas de pintado total del cromosoma (Figura 12). En este caso el protocolo empleado es similar al descrito precedentemente con una desnaturalización a 65°C por 10 minutos y posterior amplificación de la señal con avidina marcada con rodamina (rojo). Brevemente, luego de la hibridación, se efectúa una incubación del preparado con 100µL de solución antifade (NFD) a 37°C y una solución de avidina-rodamina (2 µL de rodamina en 600 µl NFD) durante 30 minutos a 37°C. Luego se realizan dos lavados en 4T y 2 lavados en TNT, sumergiendo el preparado a temperatura ambiente. Se incuba con solución de avidina-biotina (5 µL en 500 µL TNB) por 30 minutos en estufa a 37°C. Se lava 3 veces en TNT y se vuelve a incubar con solución de rodamina-avidina por 30 minutos a 37°C. Se realizan 2 lavados en 4T y un lavado en PBS 1X, y se hidrata en una serie de alcoholes 70/ , 90/ y 100/ . Se deja secar y se contracolora con DAPI igual que para el protocolo estándar de FISH. Se evalúan al menos 10 metafases informativas y de buena calidad.

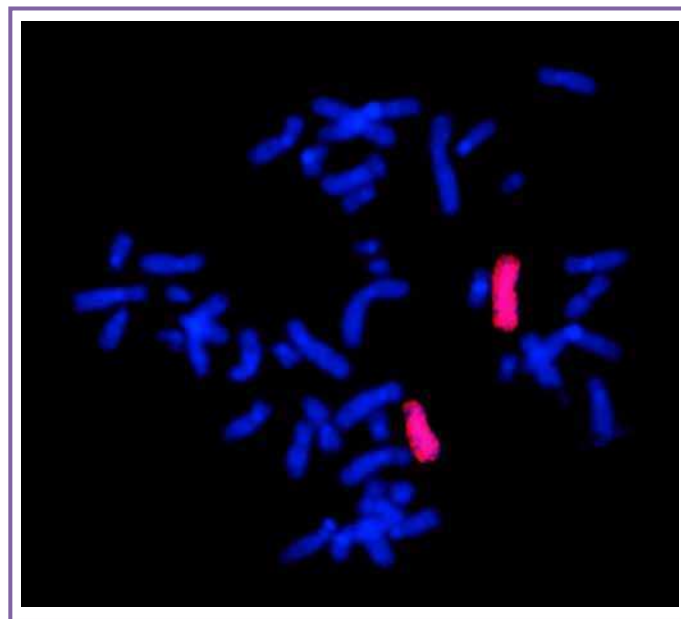


Figura 12: Metafase de cultivo de linfocitos de SP hibridada con la sonda del total del cromosoma 8 (rojo) (CAMBIO) usando DAPI como contracolorante.

Multicolor FISH: Para el estudio de casos con cariotipos complejos se empleó también la técnica de Multicolor FISH. Se procede de la misma que en el protocolo de FISH, pero los preparados llevan un tratamiento previo con RNase (DNase free) (10mg/mL) en 2X SSC durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda, seguido de lavados en 2X SSC a temperatura ambiente y tratamiento con pepsina (100mg/mL) durante 6 minutos a 37°C y luego 2 minutos en PBS 1X. La solución de hibridación contiene 24 sondas, para cada uno de los cromosomas humanos, marcadas con una

combinación de cinco fluorocromos diferentes (Spectrum Aqua, Green, Gold, Red y Fred), cuyas combinaciones permiten identificar cada par en forma específica utilizando un microscopio de fluorescencia con los filtros apropiados y el software de M-FISH de CytoVision (Applied Imagen) (Figura 13). Se evalúan al menos 10 metafases informativas por cada caso.

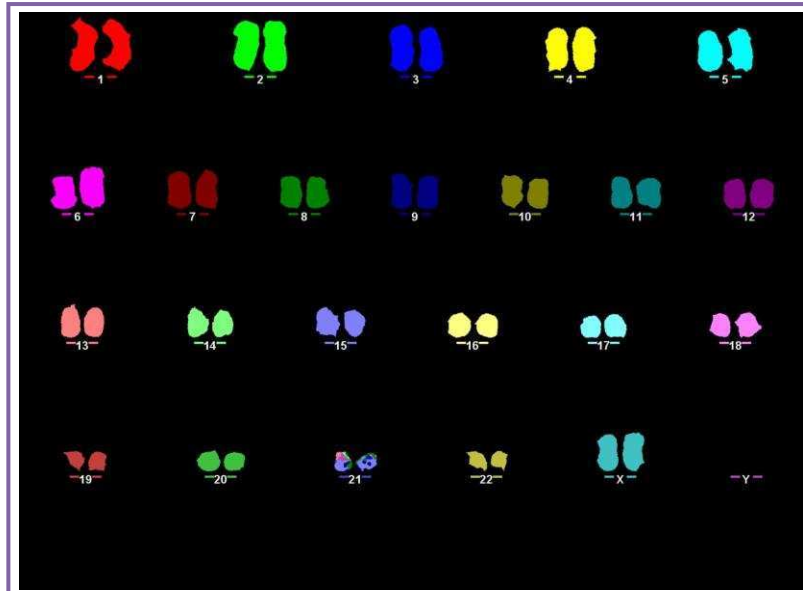


Figura 13: Metafase normal de cultivo de linfocitos de SP hibridada con sondas de Multicolor FISH (Vysis-Abbott).

### 3.3. Estudios moleculares

#### 3.3.1. Separación de células mononucleares de SP por Ficoll-Hypaque

##### Reactivos

- Etilen-diamin-tetra acetato de sodio (EDTA)
- Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare)
- PBS 1X
- Trizol (solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina) (Invitrogen)

##### Procedimiento

Se partió de muestras de SP anticoaguladas con EDTA al 5%. Este método permite separar poblaciones de una suspensión celular acorde al tamaño empleando un medio de alta densidad y centrifugando a baja velocidad. Se diluyen 2mL de muestra de SP con 2mL de PBS 1X estéril y se

mezcla homogeneizando por inversión. Se traspasa cuidadosamente, con pipeta Pasteur estéril, los 4mL de la suspensión celular diluida sobre 3mL de Ficoll en un tubo estéril de 15mL, teniendo especial cuidado de no mezclar ambas fases. Se centrifuga a 2000g por 20 minutos. Se extrae la capa superior (plasma y plaquetas) dejando intacta la interfase de células mononucleares (mayormente linfocitos además de monocitos y trombocitos). Se transfiere muy cuidadosamente la capa interfásica blanca a un tubo Eppendorf estéril y se resuspende agregando PBS 1X. Se centrifuga a 8000g por 5 minutos. Se remueve el sobrenadante y se repiten 2 o 3 lavados con PBS 1X hasta que el pellet se observe limpio. Se resuspende en 1mL de Trizol y se guarda en freezer a -70°C hasta su procesamiento.

### 3.3.2. Extracción de ARN total

#### Reactivos

- Trizol (Invitrogen)
- Cloroformo
- Isopropanol
- Alcohol etílico 75/
- Agua estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1/

#### Procedimiento:

El aislamiento de ARN total se realiza mediante la técnica de trizol/cloroformo. A partir del pellet de glóbulos blancos resuspendido en trizol se efectúa una extracción con 200µl de cloroformo, centrifugando a 12000g por un periodo de 15 minutos en centrifuga refrigerada a 4°C. Luego, se agregan 500 µL de isopropanol a la fase acuosa recuperada, se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifuga a 12000g por 10 minutos a 4°C. El precipitado de ARN obtenido tras este paso es lavado con etanol 75/ , se deja secar a 65°C por 10 minutos y es resuspendido, dependiendo del tamaño, en 30µL-50µL de agua estéril tratada con DEPC al 0,1/ .

### 3.3.3. Cuantificación espectrofotométrica del ARN

El ARN aislado se cuantifica mediante el uso de un espectrofotómetro para valorar la pureza de la muestra. Para esto se deben considerar las absorbancias a longitudes de onda de 260, 280 y 230 nm: Si la relación  $DO_{260}/DO_{230} < 1$  indica que la muestra contiene restos de fenol y la cuantificación no será exacta; si la relación  $DO_{260}/DO_{280} < 1,9$  la muestra se encuentra contaminada con proteínas y la cuantificación no será exacta; mientras que si la relación  $DO_{260}/DO_{280} \geq 1,9$  la

muestra es pura y se puede calcular la concentración de manera exacta. Para esto se utiliza la siguiente relación: 1 unidad de  $DO_{260} = 40\mu\text{g ARN}/\mu\text{L}$

### 3.3.4. Reacción de retrotranscripción inversa (RT-PCR)

#### Reactivos:

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

#### Procedimiento:

La síntesis del ADNc se efectúa mediante RT-PCR en un volumen final de 20 $\mu\text{L}$  empleando por cada muestra una concentración de 3 $\mu\text{g}$  de ARN total. El programa de PCR utilizado consiste en una desnaturalización inicial a 95 $^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, la retrotranscripción a 37 $^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos y finalmente la inactivación de la enzima transcriptasa reversa a 95 $^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Cada reacción se llevó a cabo en un ciclador TPersonal 48 (Biometra) utilizando la siguiente mezcla de reacción: M-MLV RT *Reaction Buffer* 1X, dNTPs 10mM cada uno, *random primers* 250 ng/ $\mu\text{l}$  y 10U M-MLV *Reverse Transcriptase*.

### 3.3.5. Análisis del estado mutacional de IGVH

#### Reactivos

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

Tris Base 890mM	108g
Acido Bórico 890mM	55g
EDTA 0,5M pH8.0	<u>40mL</u>
H <sub>2</sub> Od c.s.p.	1L

- Bromuro de etidio (5 mg/ml)
- Loading Buffer
  - Glicerol 50/
  - Xylene Cyanol 0,25/
  - Azul de Bromofenol 0,25/
- 50bp DNA ladder (Invitrogen)
- Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)

## Procedimiento

Amplificación por PCR: Para el análisis del perfil mutacional de los genes *IGVH* se procedió a amplificar las muestras mediante la técnica de PCR a partir de los ADNc previamente obtenidos. El termociclador utilizado en todos los casos fue el TPersonal 48 (Biometra). Se utilizaron las condiciones y *primers* propuestos por Pritsch et al (1993) y Campbell et al (1992) (Tabla 6). Esta técnica emplea 6 reacciones de PCR por cada muestra con seis *primers* forward (VH1-6), específicos para cada familia VH, y un único primer reverse (JH). Cuando la amplificación con estos sets de *primers* no resulta satisfactoria, se repite la reacción de amplificación de la muestra con un set diferente de *primers* que amplifican secuencias en la región *leader* (LH1-6) y un único primer antisentido C $\mu$ . La reacción de PCR se lleva a cabo en un volumen final de 50 $\mu$ l empleando 1,5 $\mu$ l del ADNc obtenido a partir de 3 $\mu$ g de ARN. La mezcla de reacción para ambas PCRs VH y LH contiene: Buffer PCR 10X, MgCl 50mM, 10mM dNTPs, H<sub>2</sub>O PCR grade, 10  $\mu$ M de cada *primer* y 5U/ $\mu$ L de enzima *Taq* DNA polimerasa. Como control negativo se empleó agua en lugar de ADNc y como control positivo se amplificó un paciente con LLC con segmento VH conocido. La amplificación se realizó empleando el siguiente ciclado: un paso de desnaturalización inicial a 93°C por 3 minutos, seguidos de 33 ciclos a 94°C por 30 segundos, *annealing* a 62°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, una extensión final de 7 minutos a 72°C y enfriamiento a 4°C por 10 minutos.



Tabla 6: Secuencias de los *primers* empleados para la amplificación de genes *IGVH*.

Gen	Primers	Referencia
<b>Forward</b>		
VH1	5'- CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG -3'	Pritsch et al, 1993
VH2	5'- TCCTGCGCTGGTGAAAGCCACACA -3'	Pritsch et al, 1993
VH3	5'- GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA -3'	Pritsch et al, 1993
VH4	5'- TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC -3'	Pritsch et al, 1993
VH5	5'- GAAAAAGCCCCGGGGAGTCTCTGAA -3'	Pritsch et al, 1993
VH6	5'- CCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTG -3'	Pritsch et al, 1993
LH1	5'- CATGGACTGGACCTGG -3'	Campbell et al., 1992
LH2	5'- ATGGACACACTTTGCTCCAC -3'	Campbell et al., 1992
LH3	5'- CCATGGAGTTTGGGCTGAGC -3'	Campbell et al., 1992
LH4	5'- ATGAAACACCTGTGGTTCTTCC -3'	Campbell et al., 1992
LH5	5'- ATGGGGTCAACCGCCATCC -3'	Campbell et al., 1992
LH6	5'- ATGTCTGTCTCCTTCCTCATC -3'	Campbell et al., 1992
<b>Reverse</b>		
JH	5'- CTTACCTGAGGAGACGGTGACC -3'	Pritsch et al, 1993
C $\mu$	5'- CTCTCAGGACTGATGGGAAGCCCCG -3'	Campbell et al., 1992

Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2% (0,8g agarosa en 40mL buffer TBE 0,5X) con bromuro de etidio (5 mg/ml) (2 $\mu$ L muestra + 2 $\mu$ L loading buffer) y visualizados bajo luz UV, para observar la banda correspondiente al segmento VH amplificado. Conjuntamente a la muestra analizada se corren ambos controles, positivo y negativo, además de un marcador de peso molecular (ladder ADN 50pb). En aquellos casos en que se observaran más de un segmento VH-JH amplificado entre 200-500pb (amplificación policlonal) se realiza la segunda amplificación de segmentos LH-C $\mu$  (Figura 14).

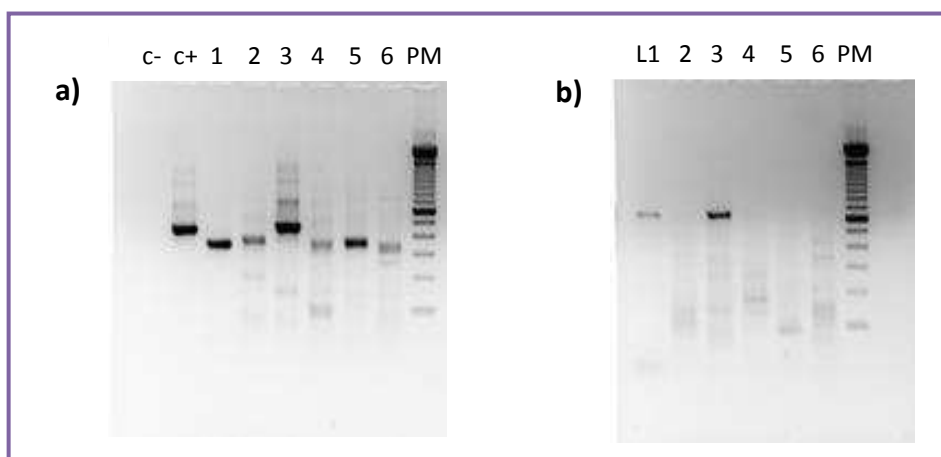


Figura 14: Gel de agarosa al 2% mostrando amplificación por PCR de la misma muestra con *primers* (a) VH-JH, mostrando amplificación policlonal, y (b) LH-C $\mu$ , con definición de segmento LH3. C-: control negativo, C+: control positivo, PM: marcador de peso molecular.

Purificación de productos de PCR y secuenciación: Una vez confirmado el segmento VH implicado en cada muestra, los productos obtenidos en la PCR son corridos en un gel de agarosa al 2% con el fin de purificar la banda específica del segmento correspondiente utilizando el kit de purificación previamente mencionado (GE Healthcare). El mismo permite la extracción del producto PCR utilizando un agente caotrópico que desnaturaliza proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del ADNdc a una matriz de fibra de vidrio. El protocolo utiliza la muestra obtenida a partir de cortar la banda del gel de agarosa que contiene el fragmento de ADN a purificar. Este paso se realiza en un transiluminador UV empleando un bisturí limpio, con mínimo tiempo de exposición y tratando de extraer la menor cantidad de agarosa posible. La banda obtenida es traspasada a un tubo Eppendorf libre de DNAsas de 1,5mL vacío. El tubo es pesado previamente vacío y luego conteniendo la banda de agarosa para calcular el peso de la misma. Se agregan 10  $\mu$ L de buffer de captura por cada 10mg de agarosa, se mezcla por inversión y se incuba en baño a 60°C hasta que la agarosa se disuelva completamente (15-30 minutos). El buffer de captura contenido en el kit posee un indicador de pH que permite visualizar si la mezcla de buffer y muestra se encuentra al pH óptimo ( $\leq 7,5$ ; color amarillo-naranja) para que el ADN se una a la membrana de sílica en la columna GFX. Luego, se mezcla y se transfiere la mezcla a la columna GFX previamente colocada dentro de un tubo colector de 2 mL. Se incuba un minuto a temperatura ambiente y se centrifuga por 30 segundos a máxima velocidad (16000 g). Se descarta el eluido del tubo colector y se vuelve a colocar la columna que contiene el producto. Se agrega a la columna 500  $\mu$ L de buffer de lavado (solución de etanol para remover sales y otros contaminantes) y se vuelve a centrifugar 30 segundos a máxima velocidad. Se descarta el tubo colector con el eluido y se coloca la columna, con el producto PCR, en un nuevo tubo Eppendorf limpio. Se eluye la muestra de la columna con 40  $\mu$ L de buffer de elución (agua estéril libre de nucleasas) y se centrifuga por un minuto a máxima velocidad para recuperar el ADN purificado en

el tubo colector. La purificación se confirma corriendo una pequeña muestra del eluido en un gel de agarosa al 1-1,5/ y luego se mantiene la misma a -20°C.

Análisis de secuencias: Los productos de PCR purificados fueron secuenciados bidireccionalmente. Luego de comprobar que la secuenciación haya sido informativa, observando picos definidos y no superpuestos en el cromatograma, se elige la zona de la secuencia que se va a analizar. Esta zona debe encontrarse contenida entre las secuencias de los *primers* utilizados. En la Figura 15 se observa el cromatograma de una secuencia y la zona elegida a partir del mismo:



**B)**

```

GGNNNNNNNCTGACTGCACTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAGTGGGTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCC
CAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTCACTCATTATTGGAATGATGATAAGCGCTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGC
TCACCATACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTGGTCTTACAATGACCAACATGGACCTGTGGACACAGCCACAT
ATTACTGTCACTCTCACTGCACTGGGGATCGAGCTATGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGTCACCGTCTCTCAGG
TAAGAAATCTCTGATCTAGCTGTTCTATTACTATTTATTAACAGA
    
```

Figura 15: Ejemplo del análisis de una muestra por (a) secuenciación automática y (b) la zona de la secuencia (delimitada en violeta) que se analizó en las bases de datos IMGT e IgBlast.

Las secuencias son luego ingresadas y analizadas mediante las bases de datos ImMunoGeneTics (IMGT; <http://imgt.cines.fr/>) e IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) las cuales permiten identificar los segmentos clonales involucrados y el porcentaje de homología con respecto a la línea germinal (Figura 9). Se consideran como mutadas (M) a aquellas secuencias *IGH* con menos del 98% de homología con respecto a la línea germinal más cercana, y como no mutadas (NM) aquellas con un nivel de homología mayor o igual al 98% .

**A) V(D)J rearrangement summary for query sequence:**

Top V gene match	Top D gene match	Top J gene match	Chain type	V-J Frame	Strand
<a href="#">IGHV2-5*01</a>	IGHD7-27*01	IGHJ4*02	VH	In-frame	+

Nucleotide details around V(D)J junctions:

V region end	V-D junction*	D region	D-J junction*	J region start
TGCAC	TCTCACTGC	ACTGGGGA	TCGAGCTA	TGACT

\*: Overlapping nucleotides may exist at some V-D-J junction (i.e, nucleotides that could be contributed by either joining segment due to homology-directed rearrangement). Such bases will be shown inside a parenthesis (i.e., (TACAT)) and will not be included under V, D or J region itself.

Alignment summary between query and top germline V gene hit:

	from	to	length	matches	mismatches	gaps	identity( / )
CDR1	1	20	20	20	0	0	100
FWR2	21	62	42	42	0	0	100
CDR2	63	110	48	48	0	0	100
FWR3	111	204	94	94	0	0	100
Total			204	204	0	0	<b>100</b>

**B)**

<b>Result summary:</b>	<b>Productive IGH rearranged sequence</b> (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	<a href="#">IGHV2-5*01</a>	score = 995	identity = <b>100.00%</b> (200/200 nt)
J-GENE and allele	<a href="#">IGHJ4*02</a>	score = 145	identity = 86.84% (33/38 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	<a href="#">IGHD5-5*01</a>	D-REGION is in reading frame 3	
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[X.17.38.8]	[4.7.12]	CALSLHWGSSYDYW

Figura 16: Ejemplo del resultado obtenido del análisis de la secuencia previamente mostrada, contra la base de datos (a) IgBlast y (b) IMGT, mostrando los segmentos y subsegmentos V-D-J correspondientes (azul) y el porcentaje de homología (naranja) con respecto a la línea germinal.

Para la identificación de los genes *IGHD*, *IGHJ* y la longitud de la región HCDR3 se utilizó el software IMGT/Junction Analysis, según los criterios establecidos por la base de datos de IMGT. Brevemente, para la evaluación de los *clusters* HCDR3, todos los rearrreglos de secuencias *IGHD* en marco de lectura correcto (in-frame) se convirtieron a secuencia aminoacídica (aa) y se alinearon con las secuencias aa HCDR3 putativas utilizando el software de alineamiento múltiple ClustalX (1.83). Para este alineamiento se calcula la longitud de la región HCDR3 entre los codones 107-117 (según la numeración IMGT), considerando la presencia de los codones conservados 105-106. Las nomenclaturas de los clusters se determinaron según los datos obtenidos por Messmer et al (2004) y Stomatopoulos et al (2007). Las secuencias así alineadas con estos clusters y las identificadas por tener similar o idéntica secuencia aminoacídica HCDR3 son aquellas que presentaran un MAS (*mean alignment score*) mayor o igual al 60%. El MAS se determina como el valor medio de todos los pares de alineamiento, entre la secuencia incógnita y las secuencias en el cluster, determinados por ClustalX. En resumen, para la definición de clusters o subsets de secuencias de rearrreglos IGHV-D-J se utilizaron los siguientes criterios propuestos por Messmer et al (2004): uso de los mismos rearrreglos V-D-J, uso del mismo marco de lectura *IGHD* y MAS mayor o igual al 60%.

### 3.3.6. PCR en tiempo real (QRT-PCR)

#### Reactivos:

- Capilares de vidrio (Roche Diagnostics)
- Kit SYBR Green (Roche Diagnostics)
- Kit TaqMan (Roche Diagnostics)
- *Primers* específicos para cada gen
- Kit de amplificación para el gen *CLLU-1* (Ipsogen)

#### Procedimiento:

La expresión de los genes *LPL*, *ADAM-29*, *MCL-1*, *SEPTIN-10* y *CLLU-1* se evaluó mediante la técnica de QRT-PCR a partir de los ADNc previamente obtenidos. El termociclador utilizado para todos los genes fue el LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics). Este sistema emplea capilares de vidrio, hasta un número máximo de 32 posiciones, ubicados en un carrusel que va rotando durante la medición de fluorescencia, con el fin de posicionar el capilar en el punto focal de máxima intensidad con respecto a la óptica del fluorímetro. Para la cuantificación se utilizaron los protocolos de amplificación de SYBR Green I (para los genes *LPL*, *ADAM-29*, *MCL-1* y *SEPTIN-10*) y TaqMan (para el

gen *CLU-1*), empleándose en ambos casos los kits de Ligthcycler (Roche Diagnostics), que suministran todos los componentes necesarios para la reacción, exceptuando *primers* y sondas.

La técnica de QRT-PCR empleando SYBR Green I es la más simple ya que se basa en la detección de los productos de PCR mediante el empleo de un fluorocromo intercalante (SYBR Green I) en el ADN doble cadena (ADNdc). Este fluorocromo se une al surco menor del ADNdc aumentando su fluorescencia. Durante los consecutivos ciclos de la reacción de PCR la cantidad de ADNdc aumenta de manera exponencial y, por consecuencia, la cantidad de intercalante que puede unirse al mismo y emitir fluorescencia a una longitud de onda de 530nm. La señal fluorescente aumentará gradualmente durante la fase de extensión, será máxima al final de cada fase y disminuirá o será nula en cada fase de desnaturalización (Figura 10a). Esta técnica de PCR cuantitativa no es específica de la secuencia amplificada y, por consecuencia, puede detectarse fluorescencia emitida por productos no específicos y/o dímeros de *primers*. Para evaluar la especificidad de la amplificación debe realizarse un análisis de curvas de *melting*, posteriormente al ciclado, para evidenciar eventuales productos inespecíficos que pudieran alterar la calidad de la estimación cuantitativa. En el análisis de *melting* la temperatura es aumentada lentamente por encima del punto de desnaturalización, luego de la amplificación del fragmento. La fluorescencia será máxima a temperaturas bajas, cuando todo el ADN se encuentra como ADNdc, pero disminuirá de manera drástica cercano al punto de *melting* del producto específico. Este punto corresponde a la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) la cual es característica de cada producto ya que la desnaturalización de un fragmento de ADN depende de su longitud, su secuencia de bases y su contenido en GC, pudiendo identificarse cada uno de ellos de manera específica.

A diferencia de la técnica de SYBR Green I, las sondas TaqMan son sondas de hidrólisis, que utilizan la actividad 5'→3' exonucleasa de la Taq polimerasa para detectar y cuantificar los productos de PCR específicos en la reacción de QRT-PCR. Estas sondas están marcadas con un fluorocromo dador (fluoróforo) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (*quencher*) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el fluoróforo. Para que esto ocurra, las moléculas dadora y aceptoras deben encontrarse próximas entre sí. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el dador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, cuando la secuencia de interés es amplificada, la sonda de hidrólisis hibridada con la secuencia de interés, es desplazada durante la reacción de PCR por la actividad 5' exonucleasa de la Taq polimerasa que hidroliza el extremo libre 5' de la sonda y produce la liberación del fluorocromo dador. Como ambos dador y aceptor se encuentran separados espacialmente, la fluorescencia emitida por el primero puede ser detectada por el lector del termociclador (Holland et al, 1991). Durante cada ciclo de PCR

consecutivo, la fluorescencia aumenta por la progresiva y exponencial acumulación del reportero libre (Figura 10b).

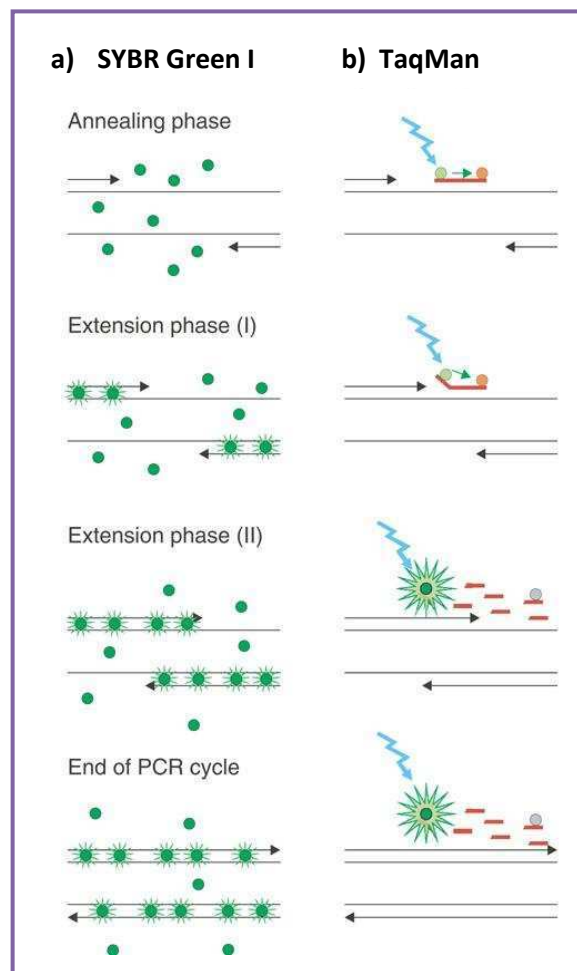


Figura 17: Mecanismos de acción de: a) SYBR Green I; y b) de las sondas de hidrólisis TaqMan.

En la Tabla 7 se indican las secuencias de los *primers* empleados para cada gen en estudio. El gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), de expresión constitutiva, fue utilizado como control interno de la PCR (Hu et al, 2004) para las amplificaciones con SYBR Green I. En este trabajo se emplearon los *primers* previamente descritos por Van't Veer et al (2006) para los genes *LPL* y *SEPT-10*, por Maloum et al (2009) para *ADAM-29* y por Isomoto et al (2005) para *MCL-1*.

La reacción de PCR se lleva a cabo en un volumen final de 20 $\mu$ l, empleando 5 $\mu$ L de ADNc de pacientes y controles, y 15  $\mu$ L de mezcla de reacción que contiene: 1X SYBR Green master mix (Roche Diagnostics), 4mM CIMg y 0,5 $\mu$ M de cada *primer*. Como control negativo se empleó agua en lugar de ADNc de pacientes y controles. Se estandarizaron las condiciones de QRT-PCR para cada gen, arribándose a un único ciclado para todos ellos: 95 $^{\circ}$ C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95 $^{\circ}$ C por 15 segundos, 62 $^{\circ}$ C por 10 segundos y 72 $^{\circ}$ C por 15 segundos (con obtención de



fluorescencia al finalizar cada ciclo), seguido por un ciclo de *melting* a 95°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos y 98°C por 0 segundos, finalizando con un ciclo de enfriado a 40°C por 30 segundos.

Tabla 7: Secuencias de los *primers* empleados con la metodología de SYBR Green I.

Gen	Primers	Secuencia referencia	Referencia
<i>LPL</i>	FW 5'-CCGCCGACCAAAGAAGAGAT-3' RV 5'-TTCTGTTACCGTCCAGCCAT-3'	NM 000237	Van't Veer et al., 2006
<i>SEPT-10</i>	FW 5'-GGCACCTGCTCTTTTCAGTC-3' RV 5'-CCTTGCTGAATGGATCTGTT-3'	NM 144710	Van't Veer et al., 2006
<i>ADAM-29</i>	FW 5'-GGCAACCCACCAATAACTAAAT-3' RV 5'-TTTAATGTGAAGCGCTGTGGGA-3'	NM 014269	Maloum et al., 2009
<i>MCL-1</i>	FW 5'-ATGCTTCGGAACTGGACAT-3' RV 5'-TCCTGATGCCACCTTCTTAGG-3'	NM 182763	Isomoto et al., 2005
<i>GAPDH</i>	FW 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' RV 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'	NM 002046	Hu et al., 2004

FW: forward; RV: reverse.

Para la amplificación del gen *CLLU-1* se empleó el kit *CLLU-1 ProfileQuant Kit* (Ipsogen) que emplea *primers* y sondas específicas para el gen en estudio, utilizando el gen  $\beta$ 2microglobulina ( *$\beta$ 2M*) como control interno de la PCR. El mismo provee los estándares con número de copias conocido ( *$\beta$ 2M*:  $10^5$ - $10^6$ - $10^7$  y *CLLU-1*:  $10^1$ - $10^2$ - $10^3$ - $10^4$ - $10^5$ - $10^6$ ) de los plásmidos de expresión de ambos genes para la confección de las curvas de calibración correspondientes.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 $\mu$ L, empleando 5 $\mu$ L de cDNA de pacientes y controles, y 15  $\mu$ L de la mezcla de reacción que contiene: 1X TaqMan master mix (Roche Diagnostics) y 1X *primer/probe* mix (Ipsogen) para ambos genes. Como control negativo se empleó agua en lugar de ADNc de pacientes y controles. Se utilizaron las condiciones para el ciclado de QRT-PCR especificadas para el kit: 95°C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95°C por 10 segundos y 60°C por 1 minuto, y enfriado a 45°C por 1 minuto.

Curvas standard de calibración: Al trabajar con QRT-PCR es necesario realizar curvas estándar durante cada ciclado o previamente al análisis de las muestras incógnita, con diferentes concentraciones de los genes de interés para la cuantificación. Estas curvas permiten:

- Calcular la eficiencia de amplificación de los *primers*, dato importante para la cuantificación relativa (intra-experimento).
- Estimar el valor absoluto (cuantificación absoluta) del número de copias de un determinado transcrito.
- Determinar el rango dinámico de sensibilidad de cada reacción.
- Calcular la variabilidad y normalizar los datos de diferentes experimentos (inter-experimento).

Para la construcción de las curvas, se empleó ADNc obtenido a partir de controles normales que expresan los genes de interés *SEPT-10*, *ADAM-29* y *GAPDH*. Para los genes *LPL* y *MCL-1*, debido a que los controles normales expresaban niveles muy bajos de transcrito, se utilizaron muestras de dos pacientes con LLC que expresan altos niveles de los mismos, que fueron empleados únicamente para la confección de las curvas y excluidos del estudio. Se realizaron diluciones seriadas (1/5, 1/25, 1/125, 1/625) del ADNc en cuestión y se amplificó cada punto de la curva por duplicado (Figura 11). La razón entre el número de copias de *GAPDH* y cada uno de los genes se calculó tanto en las muestras de pacientes como en una serie de controles normales, utilizando el software de Lightcycler y las curvas previamente mencionadas.

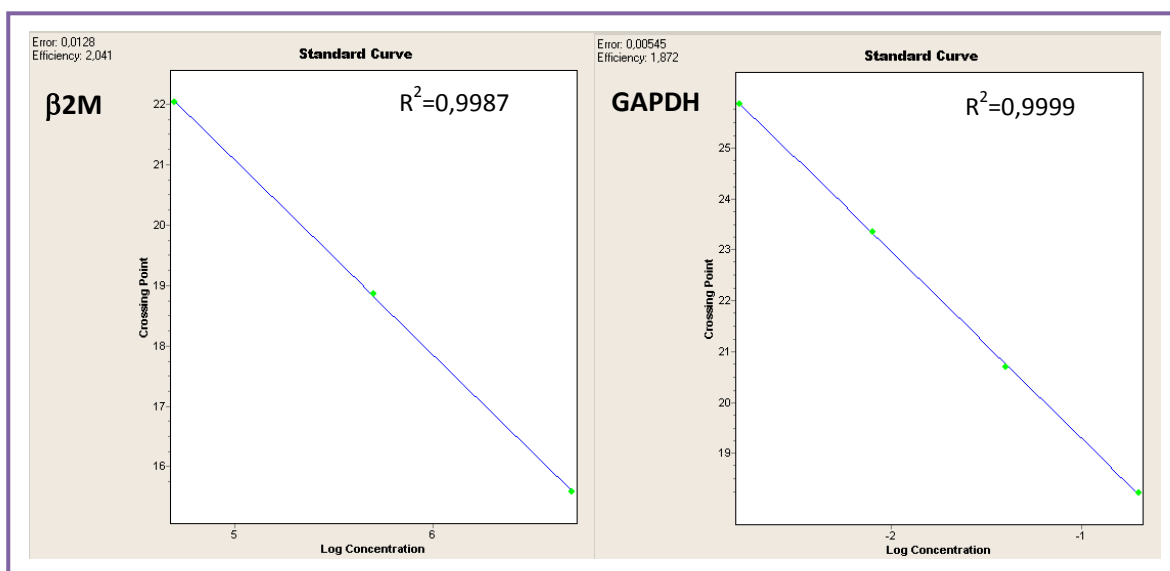


Figura 18. Curvas de calibración de los genes de referencia,  $\beta 2M$  y *GAPDH*, representadas por el logaritmo de la concentración de ARN respecto a su Cp. Para cada curva se indica la eficiencia, el error entre duplicados y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

### 3.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente empleando el test de *Mann-Whitney*. El análisis de las variables clínicas y moleculares entre grupos se llevó a cabo mediante los test *t* de Student o Kruskal-Wallis (para variables cuantitativas) y Chi-cuadrado o exacto de Fisher (para variables categóricas). Los puntos de corte en la expresión de los diferentes genes fueron seleccionados de acuerdo al test *Receiver Operating Characteristic* (ROC), el cual ayuda a determinar el valor umbral que permite discriminar con buena sensibilidad y especificidad una población de muestras considerada normal para la variable en estudio respecto de una anormal. El test genera una curva ROC con los porcentajes de sensibilidad y especificidad y una tabla con estos mismos porcentajes asociados a los distintos puntos de corte establecidos para la población de muestras.

El análisis de SV global y SLT entre grupos se realizó mediante el método de *Kaplan-Meier*, en tanto que las diferencias entre las curvas se evaluaron con el *log-rank* test. El período analizado se extendió desde el diagnóstico hasta el comienzo del tratamiento o la última consulta médica si el paciente no poseía tratamiento. Para todos los test, se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo. Para el análisis estadístico se utilizaron los programas "*Primer biostatistics*" de Stanton A. Glantz y *GraphPad Prism* versión 4.0 y 5.0.

## **4. Resultados**

**Capítulo I:**

**Estudios citogenéticos y citomoleculares**

## 4. Resultados

### 4.1. Estudios citogenéticos y citomoleculares

El estudio citogenético, empleando cultivo de SP con estimulación mitogénica y posterior análisis cromosómico con técnica de bandeado G, se llevó a cabo en un total de 194 pacientes con LLC. Para el análisis citomolecular se utilizó la técnica de FISH con sondas centromérica del cromosoma 12 y locus específica para la región 13q14 (D13S319) y los genes *ATM* (11q22) y *TP53* (17p13), sondas del pintado total de los cromosomas y Multi-FISH en algunos casos con cariotipos complejos. Del total de pacientes, 20 (10,3%) presentaron anomalías numéricas (AN) y 38 (19,6%) mostraron alteraciones estructurales (AE) clonales en su cariotipo. Entre estos últimos, 16 presentaron cariotipos complejos con múltiples anomalías (12 varones; edad media: 65 años; rango: 39-82 años; estadios clínicos Rai: 0: 15,4%, I-II: 46,2%, III-IV: 38,4%) mientras que los 22 restantes mostraron cariotipos simples (15 varones; edad media: 63 años; rango: 48-84 años; estadios clínicos Rai: 0: 75%, I-II: 18,7%, III-IV: 6,3%). Para la comparación de los parámetros clínicos se analizó simultáneamente un grupo control (C) de 78 (40,2%) pacientes con LLC con cariotipo normal y sin alteraciones genómicas o con presencia de delección 13q14 por FISH como única anomalía (42 varones; edad media: 66 años; rango: 40-89 años). Los 58 pacientes restantes presentaron cariotipo normal con otras alteraciones genómicas detectadas por FISH, determinando un 68% de casos con anomalías en nuestra serie.

En primera instancia se efectuó el análisis de los pacientes con anomalías estructurales. En las Tablas 8 y 9 se detallan las características citogenéticas y citomoleculares de los casos con cariotipos complejos y simples, respectivamente. Un único paciente (caso 9) presentó un segundo estudio durante el transcurso de la enfermedad. Excepto el caso 17 y el segundo estudio realizado en el caso 9, que presentaron exclusivamente metafases patológicas, todos los pacientes mostraron células citogenéticamente normales y anormales. Cuatro casos (11%) (casos 3, 8, 13 y 15) habían fallecido al momento de la realización del presente trabajo. El análisis de los 38 pacientes con AE permitió detectar un total de 35 anomalías nuevas (AEN), no descritas previamente en la literatura (Mitelman Database, 2012): 28 traslocaciones (19 desbalanceadas y una traslocación compleja), 4 delecciones (una de ellas recurrente), 1 isocromosoma, una duplicación y 1 cromosoma dicéntrico.

Tabla 8: Características citogenéticas y citomoleculares de 16 pacientes con LLC con cariotipos complejos.

Nro. caso	Edad/ Sexo	Estadio clínico Rai	Cariotipo combinado (Bandeo G y FISH)	FISH (✓)			
				del13q14	+12	del11q22	del17p13
<b>Cariotipos complejos</b>							
1	62/M	ND	45~47,Y,der(X)t(X;5)(q22;q13),del(1)(q23q25),i(2)(q10),del(3)(p13),+del(3)(q21),del(6)(q25),+i(6)(p10),del(7)(q22),t(8;12)(q13;p13),+10,del(11)(q23),+der(12)t(12;15)(p13;q11),-16,-17,-18,+22,+r[cp11]/46,XY[2]	0.5	<b>71</b>	0	<b>58</b>
2	79/F	II	46~47,XX,der(8)t(8;8)(p21;q22),+12,t(14;18)(q32;q21),der(22)t(22;?)(q11;?),+r [cp12]/46,XX [6]	1.1	<b>35.4</b>	0.7	2.1
3*	55/M	I	45~46,XY,+6,t(11;13)(p15;q22),add(17)(q25)[cp9]/46,XY[1]	ND	ND	ND	ND
4	66/M	ND	46,XX,der(14)t(10;14)(q11;p11),+del(14)(q24),+r [cp5]/76~122,XXYY,+del(3)(p11),del(6)(q21),-11,+der(14)t(10;14)(q11;p11),+del(14)(q24),-16,+20,+21,+22,+r [cp4]/46,XY[9]	ND	ND	ND	ND
5	72/F	I	46,XX,dup(X)(q22q26),del(7)(q32),der(8)t(8;12)(p21;q13)[17]/46,XX [2]	2.3	1.6	4.8	2.3
6	71/M	II	48,XXY,der(4)t(4;5)(q35;q13),+del(9)(q13q22),der(14)t(10;14)(q22;q32)[6]/46,XY[9]	ND	ND	ND	ND
7	61/M	II	46,XY,del(6)(q25),t(7;7)(q22;p22)[4]/46,XY,+21,-22[3]/46,XY,t(12;13)(q24;q14)[2]/46,XY[12]	<b>x1:79.6 /x2: 4.9</b>	0	0	1.3
8*	39/M	III	46,XY,t(2;14)(q31;q32),t(2;20)(p13;p13),t(8;13)(q22;q22),del(11)(q21)[8]/46,XY[20]	0	0	<b>8.6</b>	0.9
9	72/M	III	43~44,X,-Y,del(7)(q22q32),der(8)t(8;13)(p11.2;q11),der(15)t(Y;15)(q11;p11),del(17)(p11),der(17)t(15;17)(q15;q25),del(18)(q11q21),der(19)t(10;19)(q24;p13),der(19)t(15;19)(q15;q13) [cp11]/46,XY [8]	5.3	0	0	<b>44.3</b>
	73/M	IV	44,XY,-2,del(6)(q21),del(7)(q22q32),der(8)t(8;13)(p11.2;q11),add(12)(p13),psu dic(13;3)(q34;p21),del(17)(p11),der(17)t(15;17)(q15;q25),del(18)(q11q21),der(19)t(15;19)(q15;q13) [cp6]/44,X,-Y,del(4)(p12),del(6)(q21),del(7)(q22q32),der(8)t(8;13)(p11.2;q11),add(12)(p13),psu dic(13;3)(q34;p21),der(15)t(Y;15)(q11;p11),der(17)t(15;17)(q15;q25),del(18)(q11q21) [cp4]	<b>12.7</b>	0	0	<b>72</b>
10	52/M	III	51,XY,der(1)t(1;4)(q32;q21),+12,+18,+19,+22,+mar [15]/46,XY[10]	<b>x1:44 /x2:22</b>	<b>56.4</b>	0	0
11	82/M	I	41~44,XY,t(1;8)(p34;p21),del(6)(q13q21),-8,add(13)(p11),-13,-16,-19,-22[8]/46,XY[22]	ND	ND	ND	ND
12	61/F	ND	81~83,XXX,-1,-2,-3,del(6)(q15),-8,-9,-10,der(12)t(12;13)(q24;q22),der(14)t(8;14)(q22;q32),-14,-16,del(17)(q11)x2,der(19)t(4;19)(q21;q13),-20 [cp8]/46,XX [2]	<b>98.6</b>	0	4	<b>97</b>
13*	40/M	IV	46,XY,del(6)(q13q21),del(7)(q22q34),-8,add(9)(q34),del(9)(q22),der(11)t(1;11)(q21;q23),-17,+r,+dm [cp14]/46,XY[3]	1.8	1.3	<b>67.6</b>	<b>76.3</b>
14	80/M	0	46,X,-Y,der(8)t(8;13)(p12;q14),+12,del(13)(q14)x2,-21 [6]/46,XY [1]	<b>82</b>	<b>71</b>	1.2	0
15*	81/F	0	44,XX,der(2)t(2;15)(p21;q12),-8,t(8;11;15)(q10;q24;q10),-15,-17,der(17;20)(p10;q10),+dm [3]/46,XX [5]	1.7	0	0	<b>46</b>
16	59/M	III	46,XY,del(6)(q25),+10,+18,-19 [cp 9]/46,XY[10]	1.4	0.5	<b>10.2</b>	0

**Negrita:** alteraciones estructurales nuevas (AEN); **Negrita itálica:** porcentaje del clon anormal, x1: delección monoalélica de 13q14; x2: delección bialélica de 13q14; \*: pacientes fallecidos. ND: sin datos.

Tabla 9: Características citogenéticas y citomoleculares de 22 pacientes con LLC con cariotipos simples.

Nro. caso	Edad/ Sexo	Estadio clínico Rai	Cariotipo combinado (GTG y FISH)	FISH ( / )			
				del13q14	+12	del11q22	del17p13
<b>Cariotipos simples</b>							
17	84/F	0	45,XX,-3, <b>der(3)t(3;6)(q11;p23)</b> ,del(17)(p11) [20]	<b>73</b>	0	0	<b>62</b>
18	56/M	II	46,XY,del(6)(q13q15),del(11)(q21) [cp6]/46,XY [14]	ND	ND	ND	ND
19	48/M	0	46,XY,del(6)(q13q15) [6]/46,XY [6]	1.5	<b>14.1</b>	3.5	<b>8.7</b>
20	67/F	II	46,XX,del(6)(q15) [5]/46,XX [6]	ND	ND	ND	ND
21	48/M	ND	46,XY,del(6)(q15q21),del(14)(q22) [cp4]/46,XY[10]	0	0.5	0	<b>9</b>
22	63/M	0	46,XY,del(6)(q21q23) [4]/46,XY [20]	<b>49</b>	0	0	0
23	78/F	0	46,XX,del(6)(q23q25),del(13)(q14q22)[3]/46,XX[16]	<b>x1:27 / x2:26</b>	<b>3.4</b>	0.9	1.8
24	63/F	ND	46, XX,del(6)(q25) [4]/46,XX [9]	ND	ND	ND	ND
25	67/M	ND	46, XY,del(6)(q25) [5]/46,XY[10]	ND	ND	ND	ND
26	71/M	0	46,XY,del(6)(q25) [8]/46,XY[4]	ND	ND	ND	ND
27	63/F	0	46,XX,del(6)(q25)[1]/46,XX[14]	5.9	0	0.5	<b>6.3</b>
28	67/F	ND	47,XX,del(6)(q25),del(11)(q21) [6]/46,XX [14]	ND	ND	ND	ND
29	64/F	0	46,XX,del(8)(p11) [14]/46,XX [5]	<b>x1: 71.2 / x2: 8.4</b>	0	<b>13.6</b>	1.3
30	53/M	0	46,XY, <b>del(9)(q11)[5]</b> /46,XY[27]	2.8	0.5	0	0
31	63/M	ND	45-47,XY,+ <b>del(9)(q11)</b> ,del(10)(q22)[cp4]/46,XY[12]	ND	ND	ND	ND
32	61/M	IV	46,XY,del(11)(q21) [7]/46,XY [10]	<b>16.4</b>	0	<b>32.2</b>	0
33	59/M	0	46,XY,del(13)(q12q14) [6]/46,XY [14]	<b>62</b>	0	1	1,6
34	58/M	0	47,XY,del(13)(q12q14),+12 [3]/46,XY [18]	<b>21.5</b>	<b>24.4</b>	0.5	0.8
35	73/M	0	46,XY,del(13)(q14q22) [5]/46, XY [9]	<b>28.7</b>	0.5	0.5	0.4
36	58/M	ND	46,XY,del(14)(q22) [3]/46,XY [32]	0	2.9	3.8	0.6
37	70/M	0	46,XY,del(14)(q24) [4]/46,XY [8]	0.1	2.1	2.1	2.9
38	62/M	II	46,XY,del(14)(q24) [5]/46,XY [14]	2.3	0.8	1.7	2.1

**Negrita:** alteraciones estructurales nuevas (AEN); **negrita cursiva:** porcentaje del clon anormal, x1: deleción monoalélica de 13q14; x2: deleción bialélica de 13q14. ND: sin datos.

#### 4.1.1. Análisis de cariotipos complejos

El análisis de los cariotipos complejos, permitió evidenciar que los cromosomas 6, 8 y 13 fueron los más frecuentemente involucrados en anomalías estructurales en este grupo de pacientes, con un total de nueve alteraciones cada uno, seguidos por los cromosomas 12, 14 y 15 con seis anomalías cada uno. La Figura 19 muestra la distribución del total de las alteraciones por cromosoma encontradas en estos pacientes.



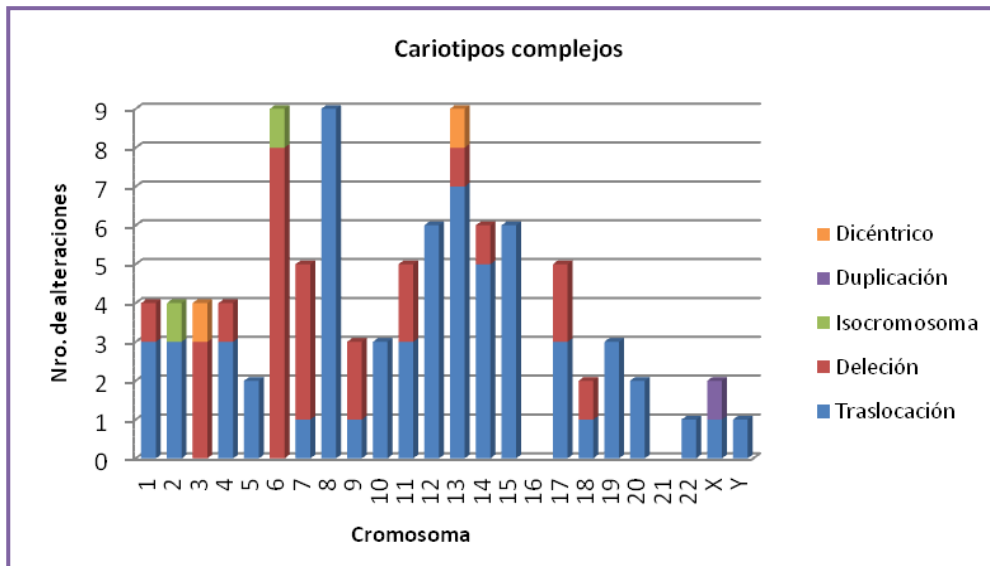


Figura 19: Histograma mostrando la distribución por cromosoma de los rearrreglos estructurales en pacientes con LLC con cariotipos complejos.

Como se mencionó previamente, el análisis de las anomalías cromosómicas de estos pacientes permitió detectar 32 AEN, no descriptas previamente en la literatura (Mitelman Database, 2012), que se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10: Anomalías estructurales nuevas encontradas en pacientes con cariotipos complejos

Translocaciones	Deleciones	Otras alteraciones
t(1;8)(p34;p21)	del(9)(q13q22)	i(2)(q10)
der(1)t(1;4)(q32;q21)	del(17)(q11)	psudic(13;3)(q34;p21)
t(2;14)(q31;q32)	del(18)(q11q21)	dup(X)(q22q26)
t(2;20)(p13;p13)		
der(2)t(2;15)(p21;q12)		
der(4)t(4;5)(q35;q13)		
t(7;7)(q22;p22)		
der(8)t(8;8)(p21;q22)		
der(8)t(8;12)(p21;q13)		
der(8)t(8;13)(p11.2;q11)		
t(8;12)(q13;p13)		
t(8;13)(q22;q22)		
t(8;11;15)(q10;q24;q10)		
t(11;13)(p15;q22)		
der(11)t(1;11)(q21;q23)		
t(12;13)(q24;q14)		
der(12)t(12;13)(q24;q22)		
der(12)t(12;15)(p13;q11)		
der(14)t(10;14)(q11;p11)		
der(14)t(8;14)(q22;q32)		
der(15)t(Y;15)(q11;p11)		
der(17)t(15;17)(q15;q25)		
der(17;20)(p10;q10)		
der(19)t(4;19)(q21;q13)		
der(19)t(10;19)(q24;p13)		
der(19)t(15;19)(q15;q13)		
der(X)t(X;5)(q22;q13)		

Es interesante remarcar que en nuestra serie se encontraron particularmente implicados en AEN los cromosomas 8, 12 y 15, pares cromosómicos que no se observan frecuentemente involucrados en alteraciones estructurales en esta patología. El cromosoma 8 fue el más afectado, con un total de 8 alteraciones. Todas las AEN halladas en este cromosoma fueron traslocaciones, 4 de ellas desbalanceadas y una compleja, que involucraron diferentes cromosomas dadores: 1p, 8p, 8q, 12p, 12q, 13q y 14q (Figura 20). Las traslocaciones desbalanceadas de este cromosoma determinaron fundamentalmente pérdida de material genético en su brazo corto, siendo la región comprendida entre las bandas 8p21-pter la más frecuentemente involucrada. Un único paciente (caso 2) mostró también ganancia de material génico a nivel de 8q22-qter (Figura 21).

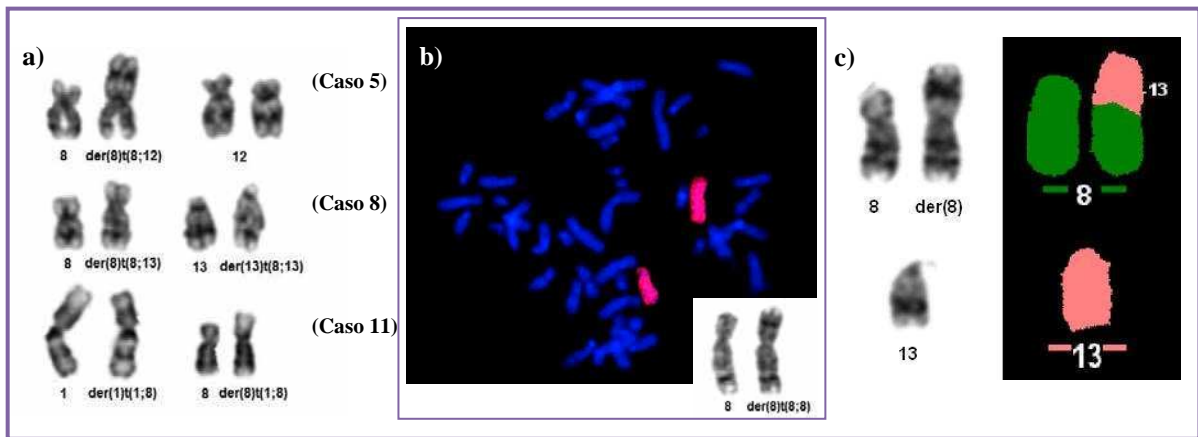


Figura 20: a) Cariotipos parciales de los casos 5, 8 y 11 mostrando las translocaciones:  $\text{der}(8)\text{t}(8;12)(\text{p}21;\text{q}13)$ ,  $\text{t}(8;13)(\text{q}22;\text{q}22)$  y  $\text{t}(1;8)(\text{p}34;\text{p}21)$ , respectivamente; b) cariotipo parcial del caso 2 mostrando la translocación  $\text{der}(8)\text{t}(8;8)(\text{p}21;\text{q}22)$  y metafase hibridada con la sonda del pintado total del cromosoma 8, confirmando dicha anomalía; c) cariotipo parcial con técnica de bandeado G y M-FISH del caso 9 mostrando los cromosomas normales 8 y 13, y el  $\text{der}(8)\text{t}(8;13)(\text{p}11.2;\text{q}11)$ .

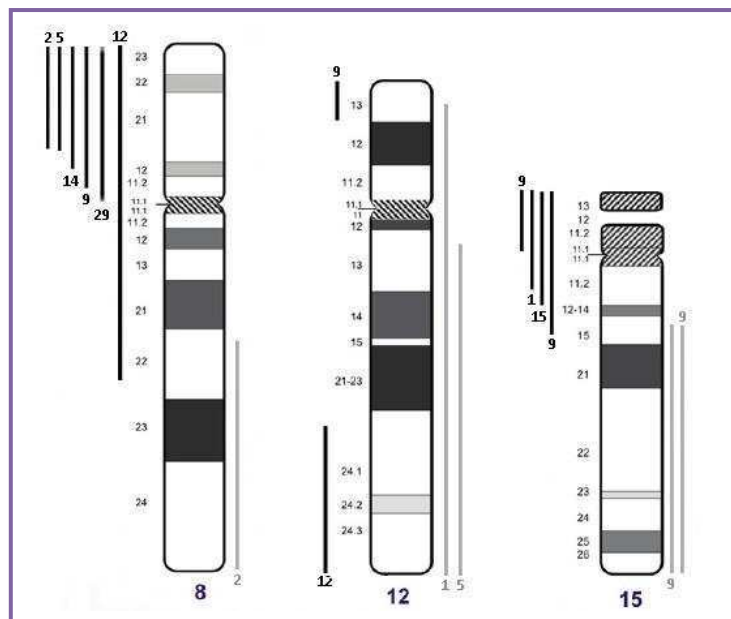


Figura 21: Desbalances genómicos observados en alteraciones estructurales de los cromosomas 8, 12 y 15. Los números en cada barra indican el número de caso con presencia de ganancia (barras grises a la derecha) o pérdida de material (barras negras a la izquierda).

En el caso del cromosoma 12, las anomalías estructurales nuevas (cinco traslocaciones, 3 de ellas desbalanceadas) determinaron ganancia de parte de su brazo largo, con una región de superposición ubicada entre las bandas  $12\text{q}13\text{-qter}$  (Figuras 20a y 21).

En cuanto al cromosoma 15, las seis traslocaciones halladas en nuestra serie (todas desbalanceadas) fueron AEN, tres de las cuales se encontraron en el mismo paciente (caso 9):  $\text{der}(15)\text{t}(\text{Y};15)(\text{q11};\text{p11})$ ,  $\text{der}(17)\text{t}(15;17)(\text{q15};\text{q25})$  y  $\text{der}(19)\text{t}(15;19)(\text{q15};\text{q13})$  (Figura 22). En la Figura 2 se muestran también los desbalances de material genético de este cromosoma, que determinaron tanto pérdidas en el brazo corto, particularmente 15q11.2-pter, como ganancias en el brazo largo a nivel de 15q15-qter.

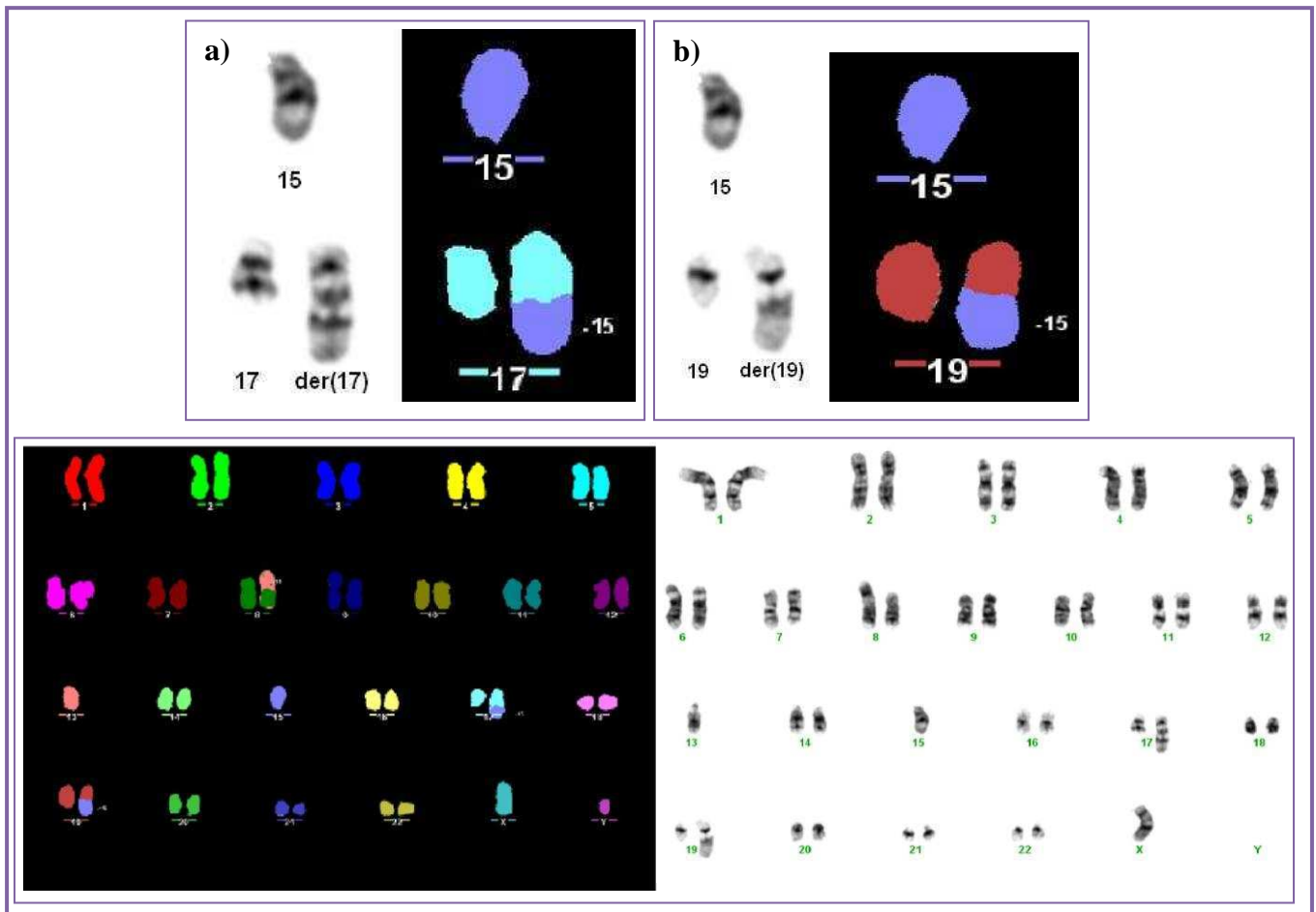


Figura 22: Cariotipos parciales con técnica de bandeo G y M-FISH del caso 9 mostrando: a) cromosomas normales 15 y 17, y  $\text{der}(17)\text{t}(15;17)(\text{q15};\text{q25})$ ; b) cromosomas normales 15 y 19, y  $\text{der}(19)\text{t}(15;19)(\text{q15};\text{q13})$ ; c) cariotipo con bandeo G y M-FISH (caso 9) mostrando los marcadores:  $\text{der}(8)\text{t}(8;13)(\text{p11.2};\text{q11})$ ,  $\text{der}(17)\text{t}(15;17)(\text{q15};\text{q25})$  y  $\text{der}(19)\text{t}(15;19)(\text{q15};\text{q13})$ .

A diferencia de los cromosomas previamente mencionados, los pares 6, 13 y 14 se encuentran frecuentemente asociados a rearrreglos en LLC. En nuestra serie, de un total de 9 alteraciones halladas para el cromosoma 13, seis fueron AEN. Entre estas se observaron cinco traslocaciones, tres de las cuales también involucraban al cromosoma 8 (Figuras 20a y 20c), y un  $\text{psu dic}(13;3)(\text{q34};\text{p21})$ , que determinaron pérdidas del brazo corto de este cromosoma como desbalance

más frecuente. Respecto al cromosoma 14, también se encontró involucrado en traslocaciones nuevas junto con los cromosomas 2, 8 y 10, mientras que el cromosoma 6 solo presentó deleciones recurrentes características de las neoplasias linfoides (Mitelman Database, 2012).

Es interesante remarcar que se observaron tres AEN que involucraban a los cromosomas sexuales, dos alteraciones del cromosoma X:  $\text{der}(X)t(X;5)(q22;q13)$  y  $\text{dup}(X)(q22q26)$ , y una del cromosoma Y:  $\text{der}(15)t(Y;15)(q11;p11)$  (Figura 23), eventos muy raros en esta patología.

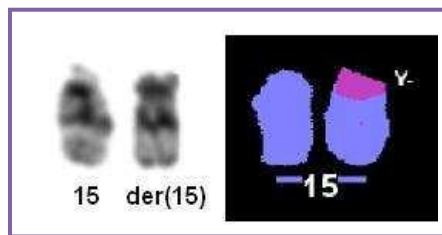


Figura 23: Cariotipo parcial con técnica de bandeo G y M-FISH del caso 9 mostrando un cromosoma 15 normal y el  $\text{der}(15)t(Y;15)(q11;p11)$ .

El análisis del total de los desbalances genómicos permitió observar que las pérdidas de material genético resultaron más frecuentes (72%) que las ganancias (28%). Asimismo, se encontraron un total de 105 puntos de ruptura involucrados en AE, siendo los más frecuentes: 6q21 y 14q32 (3,8% cada uno), seguidos de 6q25, 7q22, 8p21, 8q22, 11q23, 12p13, 13q14 y 13q22 (2,9% cada uno) (Tablas 8 y 9). De éstos, 53 puntos correspondieron a las AEN, siendo los más comúnmente implicados: 8p21, 8q22, 13q22 (5,7% cada uno) y 4q21, 5q13, 9q11, 12p13, 12q24, 13q14, 14q32, 15q15, 19q13 y Xq22 (3,8% cada uno) (Figura 24).

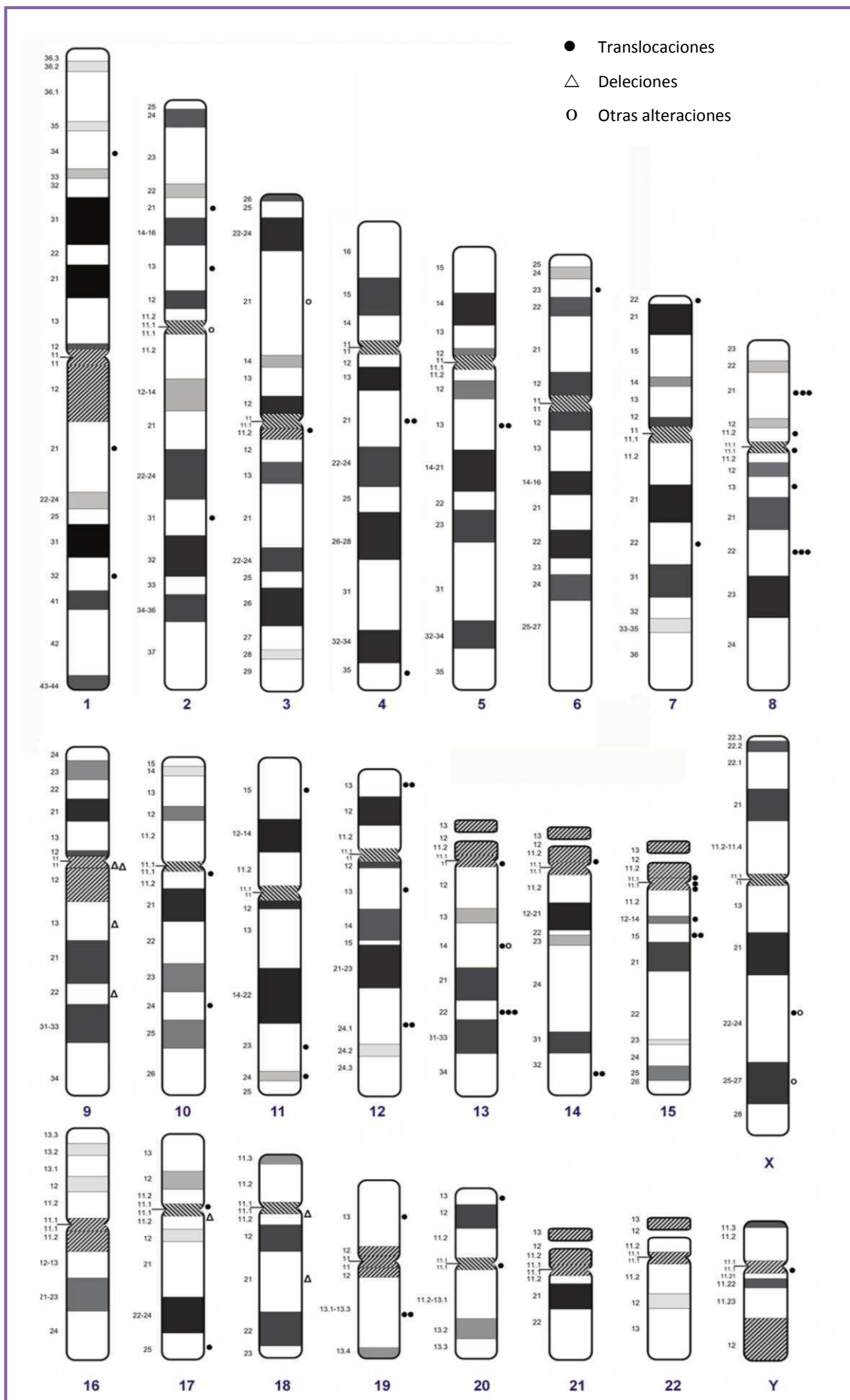


Figura 24: Diagrama mostrando la ubicación de los puntos de ruptura involucrados en AEN.

Entre los pacientes con cariotipos complejos, se encontró una media de 9,4 aberraciones cromosómicas por caso, pudiendo observarse un aumento de la misma (14,4) en aquellos pacientes que presentaron delección 17p por FISH. El empleo de esta técnica permitió detectar alteraciones no observadas mediante citogenética convencional en el 31/ de los casos (Tabla 8), fundamentalmente del(13)(q14) (3 casos) y del(11)(q22) (un caso).

#### 4.1.2. Análisis de cariotipos simples

En cuanto a los casos que presentaron cariotipos simples (Tabla 9), se pudo observar que las deleciones en 6q fueron las anomalías más frecuentes (39/ ), seguidas de las deleciones en 13q y 14q (14/ cada una), deleciones en 11q (7/ ), en 8p, 10q y 17p (3,5/ cada una). En este grupo de pacientes se encontraron dos AEN: der(3)t(3;6)(q11;p23 (caso 17) y del(9)(q11), siendo ésta recurrente en nuestra serie (casos 30 y 31) (Tabla 9). En la Figura 25 se muestra la distribución de las anomalías cromosómicas observadas en estos casos.

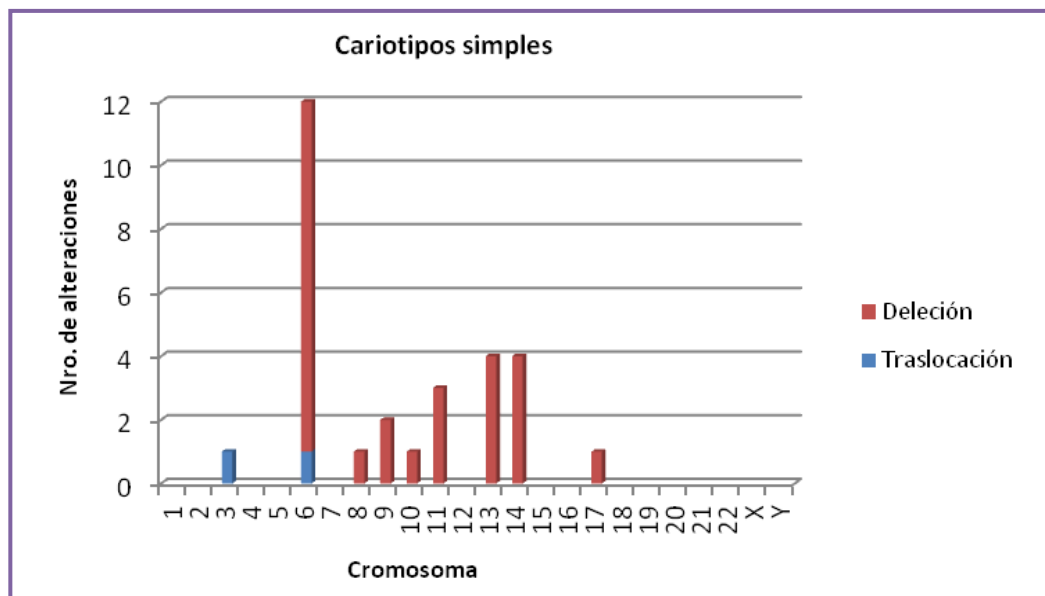


Figura 25: Histograma mostrando la distribución por cromosoma de los rearrreglos estructurales en pacientes con LLC con cariotipos simples.

Entre estos pacientes, se encontraron un total de 38 puntos de corte involucrados en AE, siendo el más frecuentemente utilizado 6q25 (15,8/ ), seguido de 6q15, 13q14 (10,5/ cada uno), y 11q21 (7,9/ ) (Tabla 9).

La comparación de los datos obtenidos mediante la técnica de FISH y el análisis citogenético permitió detectar un 53% de los casos con rearrreglos no observados por citogenética convencional: cuatro casos con del(13)(q14), dos con +12, dos con del(17)(p13) y uno con del(11)(q22), indicando un mayor aporte de esta metodología en los pacientes con cariotipos simples.

Analizando ambos grupos con cariotipos simples y complejos, se pudo determinar que la delección 6q, resultó ser la alteración estructural más frecuente. Asimismo, es interesante remarcar que se encontraron dos deleciones observadas una única vez en la literatura (Mitelman Database, 2011) que pasan a ser recurrentes a partir de nuestros datos: del(3)(p11) (Cerretini et al, 2003) y del(10)(q22) (Busson-Le Coniat et al, 1999) (casos 4 y 31, respectivamente).

#### **4.1.3. Alteraciones estructurales recurrentes (AER)**

El análisis de las anomalías estructurales recurrentes (AER) halladas acompañando a las AEN en ambos grupos de pacientes con cariotipos simples y complejos, mostró un total de 60 alteraciones, de las cuales 51 (85%) fueron deleciones y 9 (15%) translocaciones. En la Tabla 11 se detalla el total de las AER encontradas en nuestra serie.



Tabla 11: Anomalías estructurales recurrentes

Translocaciones	Deleciones
add(3)(p11)	del(1)(q23q25)
der(8)t(8;13)(p12;q14)	del(3)(p11)
add(9)(q34)	del(3)(p13)
add(12)(p13)	del(3)(q21)
add(13)(p11)	del(4)(p12)
t(14;18)(q32;q21)	del(6)(q13q15) [2]
der(14)t(10;14)(q22;q32)	del(6)(q13q21) [3]
add(17)(q25)	del(6)(q15) [3]
der(22)t(22;?)(q11;?)	del(6)(q15q21)
	del(6)(q21) [2]
	del(6)(q21q23)
	del(6)(q23q25)
	del(6)(q25) [8]
	del(7)(q22)
	del(7)(q32)
	del(7)(q22q32)
	del(7)(q22q34)
	del(8)(p11)
	del(9)(q22)
	del(10)(q22)
	del(11)(q21) [4]
	del(11)(q23)
	del(13)(q12q14) [2]
	del(13)(q14)
	del(13)(q14q22) [2]
	del(14)(q22) [2]
	del(14)(q24) [4]
	del(17)(p11) [2]

En este contexto, el cromosoma 6 fue el más afectado con un total de 21 alteraciones (35/ ), todas ellas deleciones del brazo largo con diferentes puntos de ruptura, seguido por los pares 14 (13,3/ ) (6 deleciones y 2 traslocaciones) y 13 (11,7/ ) (5 deleciones y 2 traslocaciones). Es interesante resaltar que no se detectaron AER que involucraran a los cromosomas 5, 19, 20 y 21, ni a los cromosomas sexuales.

La comparación entre los rearrreglos involucrados en las AEN y las AER muestra una frecuencia significativamente mayor de translocaciones en el primer grupo ( $p < 0,0001$ ) y de deleciones en el segundo ( $p < 0,0001$ ) (Tabla 12). Asimismo, entre las AEN se encontraron otro tipo de anomalías estructurales, como isocromosomas, marcadores pseudo-dicéntricos y duplicaciones (1 cada uno), no detectados entre las alteraciones recurrentes.

Tabla 12: Distribución del tipo de anomalía entre las AEN y las AER

	AEN (✓)	AER (✓)	p
Traslocaciones (n)	28 (75,7)	9 (15)	<b>&lt;0,0001</b>
Deleciones (n)	5 (13,5)	51 (85)	<b>&lt;0,0001</b>
Otras alteraciones (n)	4 (10,8)	-	

AEN: anomalías estructurales nuevas; AER: anomalías estructurales recurrentes; **negrita**: diferencias significativas entre ambos grupos.

#### 4.1.4. Alteraciones numéricas (AN)

En cuanto a las alteraciones numéricas (AN) observadas en los casos analizados, se encontraron un total de 47 alteraciones, destacándose la detección de un 68% de pérdidas de cromosomas enteros respecto de un 32% de ganancias (Tablas 8 y 9). Las pérdidas más frecuentes correspondieron a los pares 16 (4 casos), 8, 17 e Y (3 casos cada uno), mientras que las ganancias involucraron a los pares 12 (4 casos), 22 (3 casos), 10, 18 y 21 (2 casos cada uno). Los cromosomas 1, 2, 3, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17 e Y presentaron solamente pérdidas, mientras que el par 12 mostró únicamente ganancias. Los cromosomas 4, 5, 7 y X no se encontraron involucrados en AN (Figura 26).

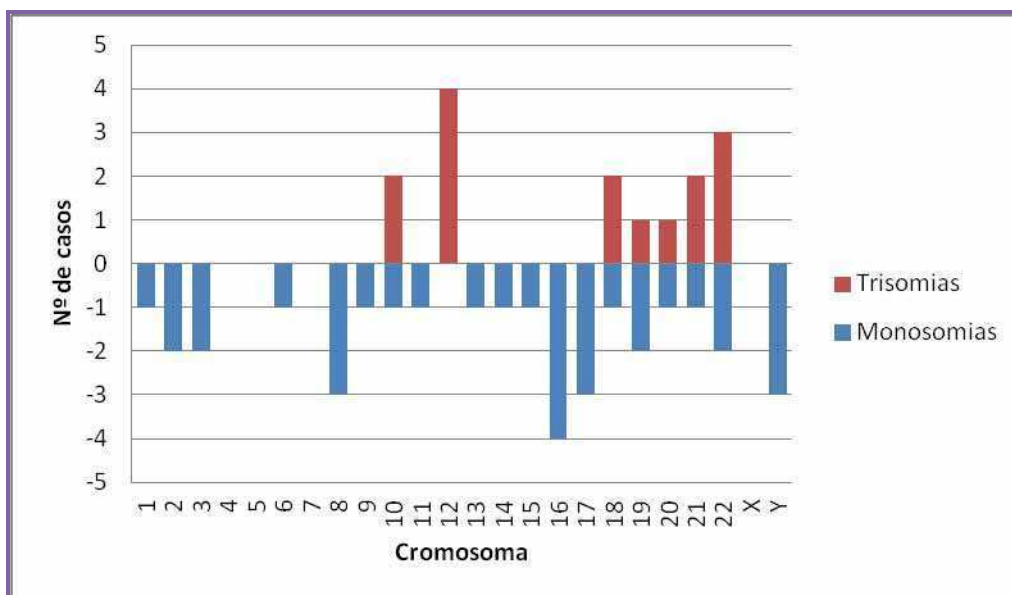


Figura 26: Distribución de las alteraciones numéricas presentes en los casos con cariotipos simples y complejos.

#### 4.1.5. Correlación con parámetros clínicos

Por otra parte, se efectuó la comparación de los parámetros clínicos de los pacientes evaluados y el grupo control de 78 pacientes previamente mencionados, con cariotipo normal y sin alteraciones genómicas o con presencia de delección 13q14 por FISH como única anomalía. En la Tabla 13 se resumen la edad, sexo, estadio clínico al diagnóstico y las características clínicas de los pacientes con AE y el grupo control (C). Este análisis mostró diferencias significativas entre los pacientes con alteraciones estructurales respecto del grupo control en el recuento de blancos ( $p=0,005$ ) y de plaquetas ( $p=0,015$ ). Al comparar los casos con cariotipos complejos y simples, se observó una menor proporción de pacientes en estadio clínico Rai 0 en el primer grupo (15,4 / vs 75 / ; respectivamente) ( $p=0,005$ ), así como mayores niveles de  $\beta_2$ microglobulina (3,3  $\mu\text{g/ml}$  vs 2,5  $\mu\text{g/ml}$ ; respectivamente) ( $p=0,037$ ) respecto de los casos con cariotipo simple.

Tabla 13: Características clínicas de los pacientes con alteraciones estructurales y el grupo control.

	Grupo control (C)	Grupo alteraciones estructurales (AE)	P (C vs. AE)	Cariotipo complejo (CC)	Cariotipo simple (CS)	P (CC vs. CS)
<b>Nro. de casos (n)</b>	78	38		16	22	
<b>Sexo F/M</b>	36/42	11/27	0,591	33,3	46,7	0,621
<b>Edad media (años) (rango)</b>	66 (40-89)	63,8 (39-84)	0,323	65 (39-82)	62,7 (48-84)	0,546
<b>Estadio clínico ( / )</b>						
<b>Rai 0</b>	33,3	48,3	0,242	15,4	75	<b>0,005</b>
<b>Rai I-II</b>	45	31	0,288	46,2	18,8	0,236
<b>Rai III-IV</b>	21,7	20,7	0,873	38,5	6,3	0,095
<b>Media WBC (<math>\times 10^9/L</math>) (rango)</b>	30 (8,3-400)	63,9 (8,9-354)	<b>0,005</b>	90,2 (12,5-35,4)	50,1 (8,9-35,4)	0,220
<b>Media porcentaje de linfocitos (rango)</b>	76 (40-99)	75,2 (54-97)	0,778	79,5 (59,5-97)	72,8 (54-97)	0,116
<b>Media plaquetas (<math>\times 10^9/L</math>) (rango)</b>	169 (15-440)	207,8 (47-400)	<b>0,015</b>	200,8 (47-388)	212,4 (47-400)	0,717
<b>Media Hb (g/dL) (rango)</b>	12,9 (6,8-16)	13,1 (8,2-15,8)	0,552	13,0 (8,2-15,8)	13,2 (9,6-15,8)	0,776
<b>Media LDH (UI/L) (rango)</b>	349,2 (149-626)	326,9 (125-526)	0,358	358,2 (125-526)	311,2 (159-438)	0,219
<b>Media <math>\beta_2M</math> (<math>\mu g/mL</math>) (rango)</b>	2,9 (1,1-6)	2,8 (1,2-5,9)	0,408	3,3 (2,3-5,9)	2,5 (1,2-3,2)	<b>0,037</b>

WBC: recuento de glóbulos blancos; Hb: hemoglobina; LDH: lactato deshidrogenasa;  $\beta_2M$ :  $\beta_2$ microglobulina; SLT: sobrevida libre de tratamiento; SV: sobrevida. **Negrita**: diferencias significativas entre ambos grupos.

Asimismo, el total de pacientes con AE presentaron una SLT significativamente menor (29 meses) que los pacientes del grupo control (69 meses) ( $p=0,037$ ). De la misma manera, el grupo de pacientes con cariotipos complejos mostró una SLT y una SV global significativamente menor en comparación con el grupo control (69 y 144 meses, respectivamente) ( $p=0,015$  y  $p=0,005$ ; respectivamente) (Figura 27). No se observaron diferencias significativas entre los pacientes con cariotipos simples y complejos, ni entre aquellos con cariotipo simple y el grupo control.

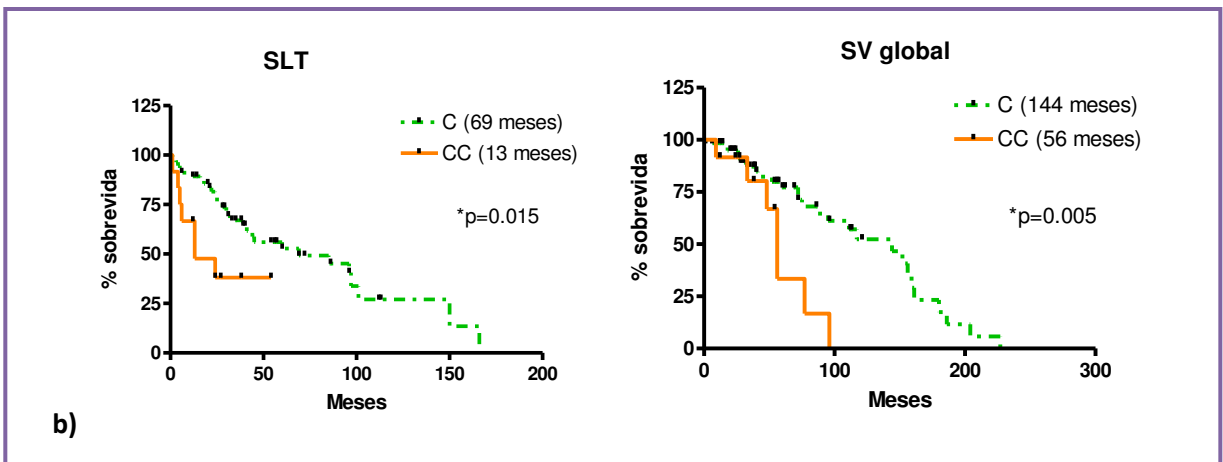
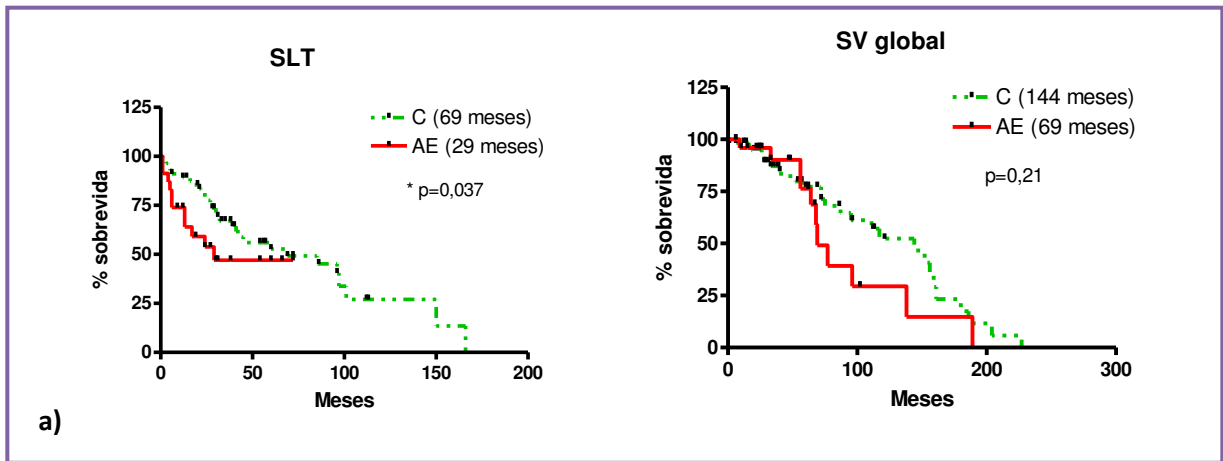


Figura 27: a) Curvas de sobrevida libre de tratamiento (SLT) y sobrevida (SV) global en pacientes con alteraciones estructurales (AE) y pacientes en el grupo control (C); b) curvas de SLT y SV global en pacientes con cariotipos complejos (CC) y controles (C).

#### 4.1.6. Discusión

Los estudios citogenéticos en neoplasias linfoides han demostrado ser una herramienta importante en la caracterización biológica de estas entidades. En la LLC, las dificultades de crecimiento *in vitro* de las células leucémicas han retrasado la identificación de nuevos marcadores citogenéticos y determinado la escasa información existente al respecto. Sin embargo, esta técnica resulta de interés ya que permite el análisis del complemento cromosómico completo haciendo factible la detección de anomalías no visibles mediante la técnica de FISH, así como la identificación de cromosomas o regiones cromosómicas que involucran genes de importancia para el desarrollo y/o progresión de la patología. En este trabajo, identificamos numerosas anomalías estructurales no descritas previamente en la literatura así como las regiones cromosómicas más involucradas en las mismas, y evaluamos su correlación con las características clínicas de los pacientes.

En nuestra serie, el cromosoma 8 resultó ser el más frecuentemente involucrado en AEN, con un total de ocho alteraciones no descritas previamente (Mitelman Database, 2012), correspondiente al 4,2% de los casos evaluados. Estas anomalías determinaron fundamentalmente pérdidas de parte de su brazo corto, siendo 8p21-pter la región más afectada. La recurrencia de desbalances en 8p ha sido escasamente observada en la literatura. Estudios de CGH (*comparative genomic hybridization*) han mostrado pérdida de 8p en el 5-7% de los casos con LLC (Beà et al, 2002; O'Malley et al, 2011) con un incremento en los pacientes que presentaban transformación a síndrome de Richter (44%) (Beà et al, 2002). Por otra parte, mediante análisis citogenético, Haferlach et al (2007) encuentran pérdidas recurrentes en 8p11-pter, mientras que otros autores empleando las técnicas de CGH y *microarrays* hallaron deleciones recurrentes en 8p21.2-p12 (Grubor et al, 2009), 8p11.2-p23.3 (Beà et al, 2002; Forconi et al, 2008; Gunnarsson et al, 2011), 8p12 y 8p23.1-p23.3 (Forconi et al, 2008). Asimismo, Haferlach et al (2007) asocian las pérdidas de 8p con cariotipos complejos, observando deleción de la región 8p11-pter en casos portadores de traslocaciones que involucraban los *loci* de las inmunoglobulinas. En nuestra serie de pacientes, estas alteraciones en 8p también fueron observadas en asociación con cariotipos complejos, mientras que un único caso mostró simultáneamente una traslocación involucrando al locus *IGH@* (14q32) (caso 2). A su vez, es interesante remarcar que en nuestra cohorte encontramos el segundo caso reportado con del(8)(p11) como anomalía única (caso 29) (Pittaluga et al, 1996). En particular, la región 8p corresponde a una zona genéticamente inestable con sitios de repeticiones cortas (LCRs: *low copy repeats*) y regiones de polimorfismos genómicos

submicroscópicos que podrían predisponer a traslocaciones por recombinación homóloga no alélica o recombinación meiótica aberrante (NAHR: *non-allelic homologous recombination*) (Giglio et al, 2002). En este sentido, pérdidas de 8p que incluyen a los genes *TRIM35* (8p21.2) y *TNFRSF10A/B* (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL-R1/2)*) (8p21.3) se han observado en neoplasias B asociadas a defectos en la apoptosis y transformación maligna (Lalonde et al, 2004; Rubio-Moscardo et al, 2005). Simultáneamente, Forconi et al (2008) encontraron que tanto la SLT como la SV global eran significativamente más cortas en los pacientes con pérdida de 8p, sugiriendo la importancia clínica de estas alteraciones.

Una de las ventajas de la citogenética convencional respecto de la técnica de FISH de interfase, es la posibilidad de subdividir los grupos de riesgo previamente establecidos si se incluye la presencia de traslocaciones. Como se mencionó previamente, la delección 13q14 por FISH corresponde a la anomalía más común en LLC, encontrándose asociada a buen pronóstico cuando se la observa como única alteración (Döhner et al, 2000). No obstante, los rearrreglos estructurales de este cromosoma son mucho menos frecuentes, aproximadamente el 20-30% de los casos con del(13)(q14) por FISH, siendo importante su detección ya que modifican significativamente el pronóstico de la enfermedad (Parker et al, 2011). En nuestra serie encontramos cinco AEN de este cromosoma, la mayoría formando parte de cariotipos complejos, algunas de ellas generando grandes deleciones en 13q asociadas a progresión de la enfermedad (Parker et al, 2011). Entre estos cabe destacar la presencia del psudic(13;3)(q34;p21), rearrreglo de escasa observación en LLC (Mitelman Database, 2012), y usualmente asociada a inestabilidad genética. En concordancia con estos datos, la mayoría de los casos de nuestra serie con traslocaciones involucrando la región 13q presentaron, a su vez, una muy corta SLT (casos 3, 7 y 8).

Por otra parte, resulta de interés la detección de AEN de los cromosomas 12, 15 y de los pares sexuales, cromosomas muy poco involucrados en rearrreglos en LLC (Mitelman Database, 2012). En el cromosoma 12, las AEN determinaron ganancia recurrente de parte de su brazo largo abarcando la región 12q13-qter, que incluye la banda 12q22, lugar donde se ubica el gen *CLLU-1*, sobreexpresado exclusivamente en células de LLC. Datos previos de nuestro grupo (Cerretini et al, 2003) muestran la asociación de anomalías en este cromosoma con una mala evolución clínica, en tanto que otros autores (Van Den Neste et al, 2007) refieren ganancia de 12q en el 5% de los casos con alteraciones cromosómicas. Respecto al cromosoma 15, el mismo mostró seis AEN (2% del total de casos), observándose una región de pérdida

recurrente en 15q11.2-pter y otra de ganancia entre las bandas 15q15-qter, siendo 15q15 el único punto de ruptura recurrente. Datos previos refieren una frecuencia de 3,2% de pacientes con traslocaciones que involucran a este par cromosómico. Resulta interesante remarcar que la región de ganancia recurrente observada en este cromosoma contiene el locus 15q23, asociado a LLC familiar (Di Bernardo et al, 2008). Por otra parte, en nuestra serie fue posible detectar tres AEN desbalanceadas que involucraron a los pares sexuales: der(X)t(X;5)(q22;q13), dup(X)(q22q26) y der(15)t(Y;15)(q11;p11). Dado que nos encontramos con una patología cuya edad media se ubica entre los 65-70 años, la pérdida de los cromosomas X e Y constituyen un evento de frecuente aparición, no así las alteraciones estructurales de los mismos, y mucho menos aún las del cromosoma Y (Mitelman Database, 2012), siendo por lo tanto un hallazgo de sumo interés.

Por otro lado, fue factible la identificación de la del(9)(q11) como alteración recurrente en nuestra serie (casos 30 y 31). La literatura refiere pérdidas en las regiones 9q21.33-q22.2 y 9q11-q32 con una baja incidencia en LLC (Forconi et al, 2008; Cavazzini et al, 2004). Esta región incluye los genes *FANCC* (*Fanconi anemia, complementation group C*) y *XPA* (*Xeroderma pigmentosum group A*) (9q22), y el gen *RAD23* (9q32), involucrados en mecanismos de reparación del ADN y mantenimiento de la estabilidad cromosómica, y han sido asociados con presencia de un comportamiento clínico agresivo (Cavazzini et al, 2004).

En cuanto a las alteraciones recurrentes, las deleciones en 6q con diferentes puntos de ruptura fue la anomalía más observada en nuestra serie. Los distintos estudios muestran esta alteración en una frecuencia del 4-7,5% de los casos (Oscier et al, 1999; Stilgenbauer et al, 2002; Cuneo et al, 2004; Wang et al, 2011) usualmente asociada a otras anomalías cariotípicas, lo que sugiere su participación en la progresión de la enfermedad. En nuestra serie la encontramos en el 11% de los pacientes, siendo el punto de ruptura más frecuente 6q25 (8 casos), seguido de 6q15 (3 casos) y 6q21 (2). Si bien se han detectado diferentes regiones de deleción que incluyen numerosos genes, al presente ninguno ha sido identificado como particularmente involucrado en la patogénesis de la LLC. Por otra parte, son pocos los estudios que han efectuado un análisis detallado de las características hematológicas y clínicas de los pacientes con esta alteración (Stilgenbauer et al, 2002; Cuneo et al, 2004; Wang et al, 2011), considerándose que tendrían un pronóstico intermedio.

En cuanto a las alteraciones numéricas observadas en nuestra serie encontramos pérdidas frecuentes de los pares 16, 8, 17 e Y, así como ganancia del par 22. La literatura refiere ganancias frecuentes de los cromosomas: +3, +8, +18 y +19 en <5% de los casos



(Döhner et al, 2000; Aoun et al, 2004; Sellmann et al, 2007), que no parecerían tener implicancias en el pronóstico clínico, excepto la trisomía 18 que ha sido recientemente asociada a rápida progresión de la enfermedad y menor supervivencia libre de tratamiento (López C et al, 2012).

El análisis del seguimiento clínico mostró una SLT significativamente menor en los casos con AE, así como la presencia de diferencias significativas tanto en SV global como en SLT en los pacientes con cariotipos complejos respecto del grupo control. Esto resulta consistente con el alto nivel de aberraciones observado en los pacientes con cariotipos complejos (9,4 por caso) que le conferiría un elevado nivel de inestabilidad genética, asociada a pronóstico adverso. De esta manera, nuestros datos confirman observaciones previas de la literatura, sustentando el importante valor pronóstico de las anomalías estructurales en LLC (Dicker et al, 2006; Van Den Neste et al, 2007; Ouilette et al, 2011), cuya presencia permite subdividir a los grupos de riesgo definidos por FISH de interfase, y representan un importante parámetro a tener en cuenta en la evaluación de la evolución clínica de los pacientes.

Cabe aclarar que el análisis de los datos obtenidos por FISH en los casos con AE, mostró presencia de delección 17p en diez pacientes, alteración relacionada a pronóstico desfavorable (Döhner et al, 2000), y que podría estar influyendo en la SV de los pacientes. Sin embargo, tres de estos casos presentaban conjuntamente delección 13q14, asociación que se propone podría atenuar la corta SV detectada en los pacientes 17p- (Van Dyke et al, 2010), en tanto que otros tres presentaron menos del 25% de núcleos metafásicos portadores de la delección, porcentaje asociado a menor impacto en la evolución clínica de los casos con esta anomalía (Tam et al, 2009).

Concluyendo, el presente estudio permitió definir anomalías no descritas previamente, una de ellas recurrente en nuestra serie, así como detectar tres rearrreglos observados una única vez en la literatura que pasan a ser recurrentes a partir de nuestros resultados. Esto hizo factible identificar varias regiones cromosómicas posibles de contener genes de importancia para el desarrollo de la LLC, destacándose las alteraciones en 8p, con pérdidas recurrentes en 8p21-pter. Finalmente, nuestros datos confirman el impacto de las anomalías estructurales en la SV de los pacientes, particularmente en aquellos con cariotipos complejos, confirmando el pronóstico adverso de las AE en pacientes con LLC y reforzando la importancia del análisis citogenético en los mismos.

**Capítulo II:**

**Análisis del estado mutacional de los genes *IGVH***

#### 4.2. Análisis del estado mutacional de los genes *IGVH*

El estudio del perfil mutacional de los genes *IGVH*, empleando PCR específica para cada familia VH y posterior secuenciación directa, se llevó a cabo en un total de 73 (33/ ) pacientes con LLC (49 varones; edad media: 64,9 años; rango: 36-87 años). En la Tabla 14 se resume la edad, sexo, estadio clínico al diagnóstico, estado mutacional de *IGVH*, rearrreglos *IGHV-D-J*, características citogenéticas y FISH de los pacientes analizados. Entre estos, 43 (58,9/ ) fueron mutados (M) (<98/ de homología respecto de la línea germinal) mientras los 30 (41,1%) restantes fueron no mutados (NM) ( $\geq$ 98% de homología). Un único paciente presentó doble rearrreglo (caso 9). Asimismo, entre los casos NM el 80,6/ de las secuencias fueron *completamente NM* (100/ homología), 12,9/ fueron *minimamente M* (99-99,9/ ) y 6,5/ *borderline* (98-98,9/ ). Respecto de los pacientes M, 81,4/ de los casos mostraron secuencias con <96/ de homología y 18,6/ entre 96-97,9/ de identidad. La mediana de edad fue mayor para los pacientes con LLC M (69 años) respecto de los NM (61,5 años), observándose una similar distribución por sexo en ambos grupos. La distribución por estadios Rai mostró una mayor proporción de casos en estadio 0 en las LLC M (41,2/ ) respecto de las NM (25,9/ ).

Tabla 14: Características clínicas, estado mutacional, rearrreglos IGVH, características citogenéticas y de FISH en 73 pacientes con leucemia linfocítica crónica.

Caso	Edad/Sexo	Estadio clínico Rai	/ homología	Familia VH	Gen VH	Segmento JH	Segmento DH	HCDR3 (pb)	Citogenética	FISH ( / )			
										13q14	C12	17p13	11q22
1	57/M	II	NM (100)	3	V3-11*01	J3*02	D3-3	18	CA	2,3	0,8	1,7	2,04
2	79/F	II	M (94,3)	3	V3-43*01	J4*02	D4-17	11	CA	1,1	<b>35,4</b>	0,7	2,1
3	72/F	ND	NM (100)	2	V2-5*01	J4*02	D5-5	12	ND	ND	ND	ND	ND
4	54/M	I	NM (100)	4	V4-31*03	J6*02	D3-3	23	CN	2,4	0	1,7	1
5	77/F	I	M (97,4)	1	V1-18*01	J4*03	D3-16	12	CN	0	0	0	1,57
6	70/M	0	M (95)	3	V3-72*01	J6*02	D1-26	15	CN	<b>X1: 92/ X2: 4,4</b>	0	0,9	2,4
7	80/M	IV	M (95,8)	3	V3-23*01	J1*01	D6-19	11	CN	ND	0	<b>45,3</b>	<b>9</b>
8	74/M	I	M (92)	1	V1-2*02	J4*02	D3-3	13	CN	ND	0	0,35	0,7
9	65/F	II	NM (100)	3	V3-33*01	J3*02	D2-2	19	CN	1,3	0	1	0,8
			NM (100)	1	V1-46*01	J4*02	D6-13	17	CN				
10	78/M	0	NM (100)	7	V7-4*01	J5*02	D5-12	15	CN	5,5	1,2	0,9	2,5
11	72/F	0	NM (99,3)	1	V1-59*01	J6*02	D3-3	23	CA	2,3	1,6	4,8	2,25
12	57/F	0	NM (99)	3	V3-66*01	J4*01	D2-21	14	CN	<b>47,8</b>	0	0,4	1
13	55/F	0	M (95,3)	4	V4-59*08	J4*02	D3-22	17	CN	<b>X1:67,4 /X2: 14</b>	0	2	0,6
14	55/F	I	NM (100)	1	V1-3*01	J4*02	D6-19	13	ND	2,2	1,98	0,4	0,3
15	80/F	0	M (94,4)	3	V3-30*03	J3*02	D1-20	14	CN	<b>62,8</b>	0	0,4	3,69
16	73/M	I	NM (100)	1	V1-3*03	J6*02	D1-26	17	CN	0,5	<b>57,8</b>	0,95	0
17	40/M	0	M (90,9)	3	V3-21*04	J4*02	D5-18	16	CN	<b>19,3</b>	0,4	3	2,4
18	61/M	II	NM (100)	1	V1-69*01	J6*02	D3-3	24	CA	<b>X1: 79,6/ X2: 4,9</b>	0	0	1,3
19	77/M	III	M (86,8)	3	V3-23*01	J4*02	D3-3	13	CN	0,9	0	<b>14</b>	0,9
20	83/F	II	M (91)	3	V3-7*03	J5*02	D6-13	10	CN	<b>94,2</b>	0	0,4	0
21	66/F	0	M (93,2)	3	V3-72*01	J4*02	D5-24	11	CN	4,03	0	1,7	0
22	67/M	0	M (85,7)	3	V3-23*01	J4*02	D3-10	13	CN	1,35	0	0	0
23	67/M	I	M (90,6)	4	V4-61*06	J4*02	D1-1	11	CN	<b>57,5</b>	0	0	0
24	65/M	0	NM (100)	3	V3-48*03	J5*02	D3-22	19	ND	0	0	0	<b>24,4</b>

25	39/M	II	M (96)	2	V2-5*10	J4*02	D3-10	15	ND	57	0	0	0
26	51/M	IV	NM (100)	3	V3-30*03	J6*02	D3-3	24	CN	88,4	0	93,5	0
27	62/M	II	NM (100)	4	V4-59*02	J5*02	D3-3	24	ND	0,9	0	0	0
28	80/M	0	M (91)	3	V3-72*01	J3*02	D3-22	12	CA	2	0	5,5	0
29	53/M	II	NM (100)	1	V1-59*01	J6*02	D3-3	25	CN	19,6	0	1,3	0,5
30	52/M	III	NM (98)	4	V4-4*07	J4*02	D3-3	12	CA	X1: 44/ X2: 22	56,4	0	0
31	59/M	0	M (93)	3	V3-74*01	J3*02	D4-23	15	CA	62	0	1	1,6
32	65/F	0	M (95)	4	V4-59*03	J4*01	D6-13	10	CA	0	0	0	3,8
33	71/F	0	NM (99)	3	V3-23*01	J5*02	D3-10	24	CN	X1: 67,7/ X2: 3,2	0	0	1,8
34	66/M	0	M (91,7)	3	V3-33*01	J4*02	D3-10	13	CA	49	0	0	0
35	47/M	I	M (87,9)	4	V4-59*07	J6*02	D2-15	10	CN	71,3	0	0	1,2
36	54/F	IV	NM (100)	1	V1-58*01	J3*02	D3-16	20	CN	0	0	1,4	0
37	46/M	III	M (96,2)	3	V3-9*01	J4*02	D3-3	12	CN	83	0	0	0
38	69/M	IV	M (93)	3	V3-15*01	J4*02	D2-21	12	CN	X1: 16,9/ X2: 8,4	0,4	0	0,5
39	76/M	0	M (89)	3	V3-11*01	J4*02	D1-26	10	CN	ND	ND	ND	ND
40	75/F	I	M (97,3)	3	V3-66*01	J6*03	D3-22	18	CN	5,16	40,4	0	0,9
41	76/M	II	M (88)	4	V4-34*01	J6*02	D2-15	24	ND	ND	ND	ND	ND
42	59/M	II	NM (100)	3	V3-23*01	J4*02	D3-10	23	CA	ND	ND	ND	ND
43	51/M	I	NM (100)	3	V3-49*03	J4*02	D3-3	21	CN	0	0	73,9	0
44	60/M	II	NM (100)	1	V1-69*01	J6*02	D3-10	24	CN	15,5	0	58,6	0
45	69/M	0	M (92)	3	V3-7*03	J4*02	D2-8	14	CN	90	0	0	0
46	60/M	II	M (93,5)	3	V3-7*01	J3*02	D6-16	14	ND	X1: 48,6/ X2: 7,78	ND	1,5	ND
47	53/M	III	M (90,3)	3	V3-23*01	J4*02	D2-15	14	CA	0	35	0	0,8
48	75/M	ND	NM (100)	3	V3-30*03	J6*04	D3-16	18	ND	ND	ND	ND	ND
49	73/F	II	NM (100)	1	V1-69*13	J5*02	D2-2	16	CA	0	49,5	0,9	0,5
50	38/M	II	NM (100)	3	V3-21*02	J6*02	D5-12	22	CN	90	0,4	0,5	0,5
51	60/M	0	M (96,5)	4	V4-61*02	J4*02	D4-23	12	ND	86,7	0	0	0
52	78/M	I	M (88,0)	3	V3-23*01	J4*02	D6-6	15	ND	ND	ND	ND	ND

100

101	53	72/M	I	NM (100)	3	V3-48*01	J5*02	D2-8	21	ND	<b>53,5</b>	0	<b>44</b>	0
	54	63/M	IV	M (92,0)	4	V4-34*01	J1*01	D2-21	6	ND	ND	ND	ND	ND
	55	38/F	0	M (97,8)	2	V2-5*10	J4*02	D2-21	14	CN	0	0	0	0
	56	82/M	IV	NM (100)	1	V1-69*01	J6*02	D3-3	23	CN	0	<b>57</b>	0	0
	57	49/F	I	NM (100)	1	V1-2*02	J4*02	D6-19	13	CN	0,4	<b>9,8</b>	ND	0
	58	57/M	0	NM (100)	1	V1-69*13	J6*02	D3-3	23	CN	0	0	0	0
	59	79/M	I	M (95,0)	3	V3-74*01	J6*13	D6-13	18	CN	<b>70</b>	0	<b>11,2</b>	0
	60	82/F	I	M (92,7)	3	V3-33*01	J3*02	D2-8	13	ND	ND	ND	ND	ND
	61	69/M	I	M (97,5)	2	V2-5*10	J4*01	D2-21	14	CN	<b>52,4</b>	0	<b>9,4</b>	0
	62	68/M	II	M (86,5)	2	V2-5*10	J3*01	D6-19	18	ND	ND	ND	ND	ND
	63	70/M	ND	M (93,5)	1	V1-69*13	J6*02	D3-10	27	ND	ND	ND	ND	ND
	64	74/M	ND	NM (100)	1	V1-69*02	J4*02	D3-3	18	ND	ND	ND	ND	ND
	65	72/F	0	M (93,4)	3	V3-30*04	J4*02	D3-22	21	CN	2,6	<b>10</b>	2,1	ND
	66	87/F	0	M (96,8)	3	V3-21*02	J6*02	D1-26	9	ND	4,3	0,5	3,6	1,6
67	75/M	IV	NM (99,5)	3	V3-21*01	J6*02	D3-3	11	ND	ND	<b>6,5</b>	ND	ND	
68	69/M	0	NM (98,5)	3	V3-66*01	J1*01	D1-26	12	ND	<b>52,4</b>	1,4	0,99	9,4	
69	55/F	IV	M (92,7)	3	V3-23*01	J4*02	D2-2	19	CA	4,1	1,0	1,8	ND	
70	67/M	0	M (85,5)	3	V3-48*03	J3*02	D1-14	11	CN	ND	ND	ND	ND	
71	36/F	ND	M (89,0)	1	V1-3*01	J3*02	D5-24	19	CN	<b>73,3</b>	0	1,9	0	
72	45/M	I	M (93,8)	4	V4-59*01	J4*02	D3-22	13	CA	0	0	0	0	
73	79/F	II	M (92,2)	4	V4-61*02	J3*02	D5-18	15	CA	3,3	0,9	3,1	5,0	

M: mutado; NM: no mutado; ND: sin datos; CN: cariotipo normal; CA: cariotipo anormal; **Negrita**: porcentaje del clon anormal; 13q14x1: delección monoalélica; 13q14x2: delección bialélica.

#### 4.2.1 Correlación entre el estado mutacional de *IGVH* y las alteraciones genómicas

El análisis citogenético se efectuó en 54 casos, observándose una distribución similar de cariotipos normales (CN) y anormales (CA) entre los pacientes M (63/ y 66,7/ ) y NM (37/ y 33,3/ , respectivamente) (Figura 28). No obstante, al analizar el tipo y cantidad de anomalías, detectamos que los casos NM presentaban mayor número de alteraciones por cariotipo que los pacientes M (2,1 y 3,3, respectivamente) en tanto que se observó un mayor porcentaje de translocaciones desbalanceadas en los NM (33/ ), respecto de los casos M (20/ ) (Tabla 15).

Tabla 15: Características citogenéticas de los pacientes con cariotipo anormal entre los casos con *IGVH* M y NM.

Nº Caso	Cariotipo
<b><i>IGVH</i> Mutado</b>	
2	46-47,XX,der(8)t(8;8)(p21;q22),+12,t(14;18)(q52;q21),der(22)t(22;?)(q11;?),+r [cp12]/ 46,XX [6]
28	45,XY,-9 [5]/ 46,XY [7]/ hipodiploidias inespecíficas [8]
31	46,XY,del(13)(q12q14) [6]/ 46,XY [14]
32	46,XX,del(6)(q25) [3]/ 46,XX [12]
34	46,XY,del(6)(q21q23) [4]/ 46,XY [20]
40	47,XX,+19 [5] / 46,XX [12]
47	49,XY,+12,+18,+19 [5]/ 46,XY [16]
69	46,XY,inv(3)(q22q28) [8]/ 46,XY [14]
73	46,X,t(X;7)(p11;q21.2),del(6)(q23q25) [cp4]/ 46,XX [16]
<b><i>IGVH</i> no mutado</b>	
1	46,XY,del(14)(q24) [5]/ 46,XY [14]
11	46,XX,dup(X)(q22q26),del(7)(q32),der(8)t(8;12)(p21;q13) [17] / 46,XX [2]
18	46,XY,del(6)(q25),t(7;7)(q22;p22) [4]/46,XY,+21,-22 [3]/ 46,XY,t(12;13)(q24;q14) [2]/ 46,XY [12]
30	51,XY,der(1)t(1;4)(q32;q21),+12,+18,+19,+22,+M [15]/ 46,XY [10]
42	46,XY,del(6)(q13q15),del(11)(q21) [cp6]/46,XY [14]
49	47,XX,+12 [5]/ 46,XY [10]

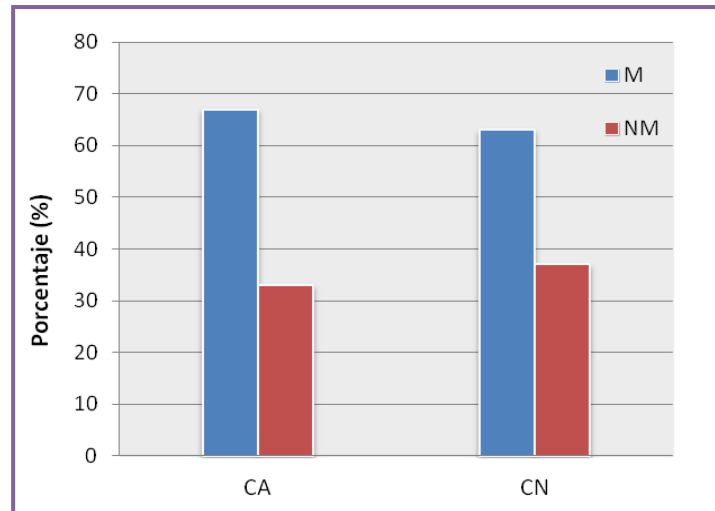


Figura 28: Distribución de cariotipos normales (CN) y anormales (CA) en pacientes *IGHV* mutados (M) y no mutados (NM).

El análisis por FISH se realizó en 61 casos entre los cuales el 44/ mostró delección 13q14 (26/ de ellos con delección bialélica), 33/ trisomía 12, 15/ delección 17p13 y 2/ delección 11q22 (Tabla 14). La incidencia total de aberraciones fue similar en los casos M y NM (71,4/ y 65,4/ , respectivamente). Sin embargo, se observó una mayor proporción de delección 13q14, como única anomalía en los pacientes con LLC M (48/ ) respecto de los casos con LLC NM (21/ ). El análisis de la distribución de alteraciones genómicas en cada grupo permitió observar que los pacientes con LLC M presentaban una proporción significativamente mayor de del(13q14) como única anomalía respecto de los casos con trisomía 12 (12/ ) ( $p=0,003$ ) y con delección 17p/11q (11,7/ ) ( $p=0,003$ ) (Figura 29).



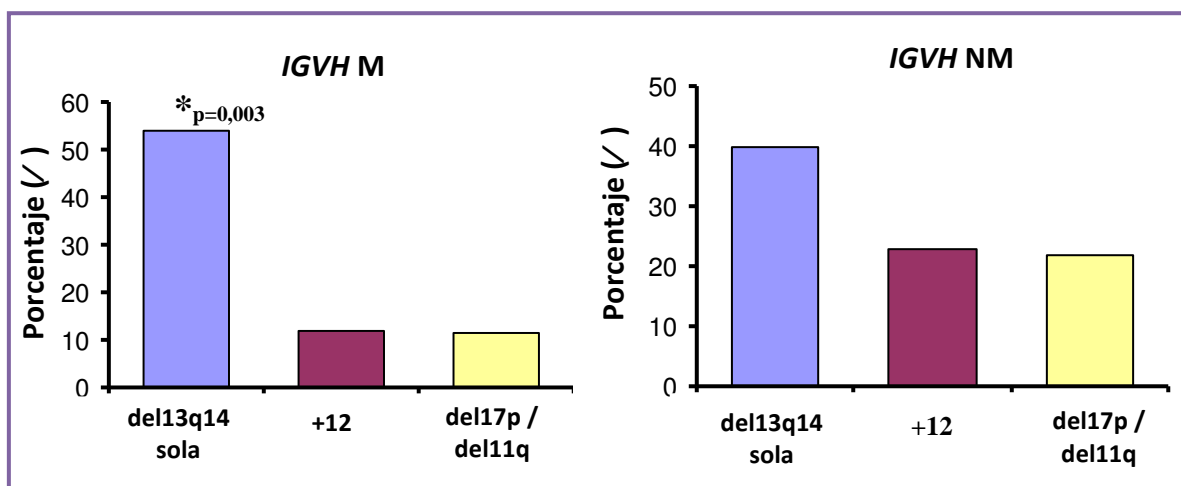


Figura 2: Distribución de alteraciones genómicas por FISH entre pacientes *IGVH* M y NM. Diferencias significativas: \*deleción 13q14 como única anomalía vs trisomía 12 (+12) ( $p=0,003$ ) y del17p13/del11q22 ( $p=0,003$ ).

#### 4.2.2 Análisis de los rearrreglos *IGHV-D-J*

##### 4.2.2.1. Distribución de familias y genes *VH*

Con respecto a las familias *IGHV*, encontramos que la más frecuentemente utilizada en nuestra serie fue *IGHV3* (52,7% de los casos), seguida por *IGHV1* (23%), *IGHV4* (16,2%), *IGHV2* (6,7%) e *IGHV7* (1,4%), no hallándose expresión de las familias *IGHV5* e *IGHV6* (Figura 29a). En los casos M se encontró un mayor uso de las familias *IGHV3* e *IGHV4* (66,7% y 75%, respectivamente). En contraste, se detectó un 76,5% de pacientes con *IGHV1* entre las LLC NM, con diferencias significativas respecto de *IGHV3* ( $p=0,0039$ ), *IGHV4* ( $p=0,0095$ ) y la serie entera ( $p=0,0016$ ).

En referencia al uso de los genes *IGHV*, en nuestra serie encontramos representados 28 de los 42 segmentos funcionales descritos (Matsuda et al, 1998). El segmento más frecuentemente utilizado fue *IGHV3-23* (10,8%), seguido por *IGHV1-69* (9,5%), *IGHV2-5* e *IGHV4-59* (6,8% cada uno), *IGHV3-30* e *IGHV3-21* (5,4% cada uno) (Figura 29b); en conjunto los mismos representaron el 44,7% de los genes expresados. Asimismo, se pudo observar que el gen *IGHV1-69* se encontró asociado al estatus NM en 6/7 casos (85,7%), todos con 100% de homología, mientras que *IGHV3-72* e *IGHV3-7* siempre se relacionaron al estatus M. De la misma manera, los genes *IGHV2-5*, *IGHV4-59* e *IGHV3-23* fueron hallados mayormente en pacientes mutados (80%, 80% y 75%, respectivamente), los dos últimos con homología menor al 96%, respecto de la línea germinal.

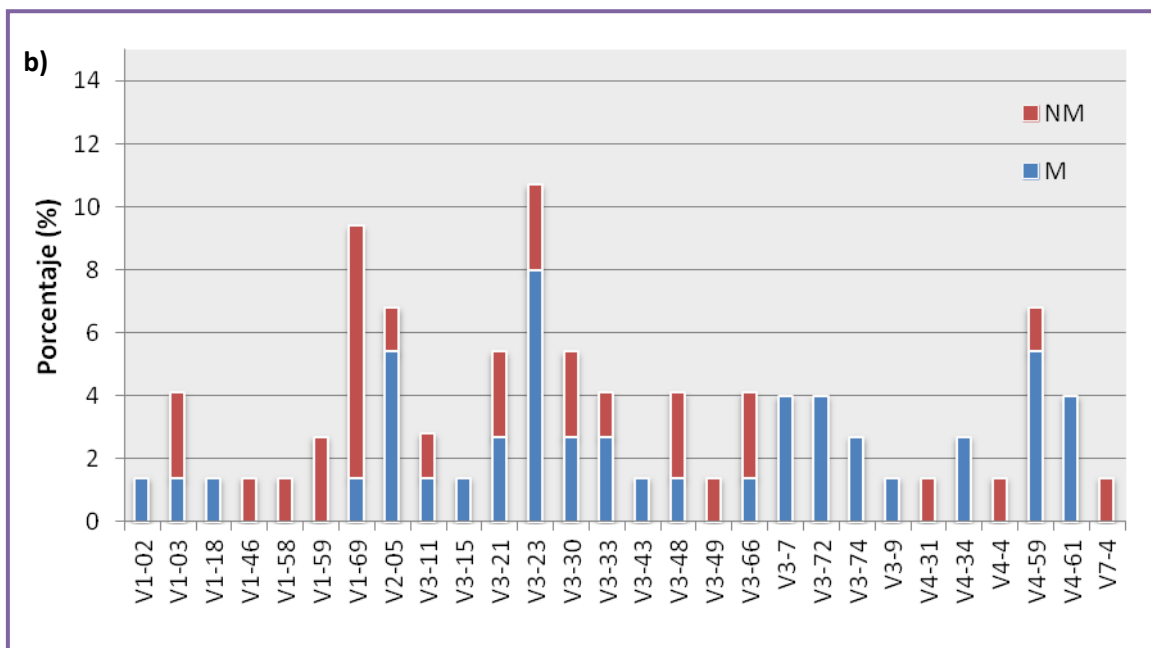
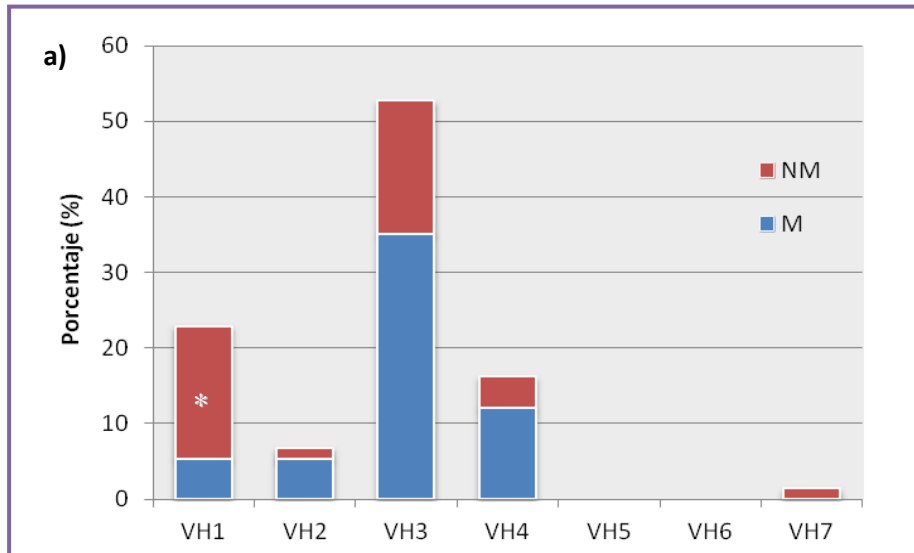


Figura 29: a) Distribución de familias *IGHV* en pacientes con LLC mutados (M) y no mutados (NM). Diferencias significativas: \**IGHV1* NM vs. *IGHV3* ( $p=0,0039$ ), *IGHV4* ( $p=0,0095$ ) y la serie entera ( $p=0,0016$ ); b) Distribución de segmentos *IGHV* en pacientes LLC M y NM.

#### 4.2.2.2. Distribución de familias y genes *DH*

El análisis de las familias *IGHD* mostró la siguiente distribución: *IGHD3* (43,2/ ), *IGHD2* (18,9/ ), *IGHD6* (13,5/ ), *IGHD1* (10,8/ ), *IGHD5* (9,5/ ) e *IGHD4* (4,1/ ) (Figura 30a), observándose un mayor uso de la familia *IGHD3* en las LLC NM (61,3/ ), con diferencias significativas respecto del total de la serie ( $p=0,0097$ ). Asimismo, 22 de los 26 diferentes segmentos *IGHD* (Matsuda et al, 1998) fueron expresados en nuestros casos, siendo el más frecuentemente utilizado *IGHD3-3* (21,6/ ), seguido por *IGHD3-10* (9,5/ ), *IGHD3-22* (8,1/ ), *IGHD1-26* e *IGHD2-21* (6,8/ cada uno) (Figura 30b). El gen *IGHD3-22* mostró sobre-expresión

en el grupo M (5/6 casos; 83,3/ ), en tanto que se observó mayor representación del segmento *IGHD3-3* (13/31 casos; 42/ ) en el grupo de casos NM, con diferencias significativas respecto del resto de la serie ( $p=0,0005$ ).

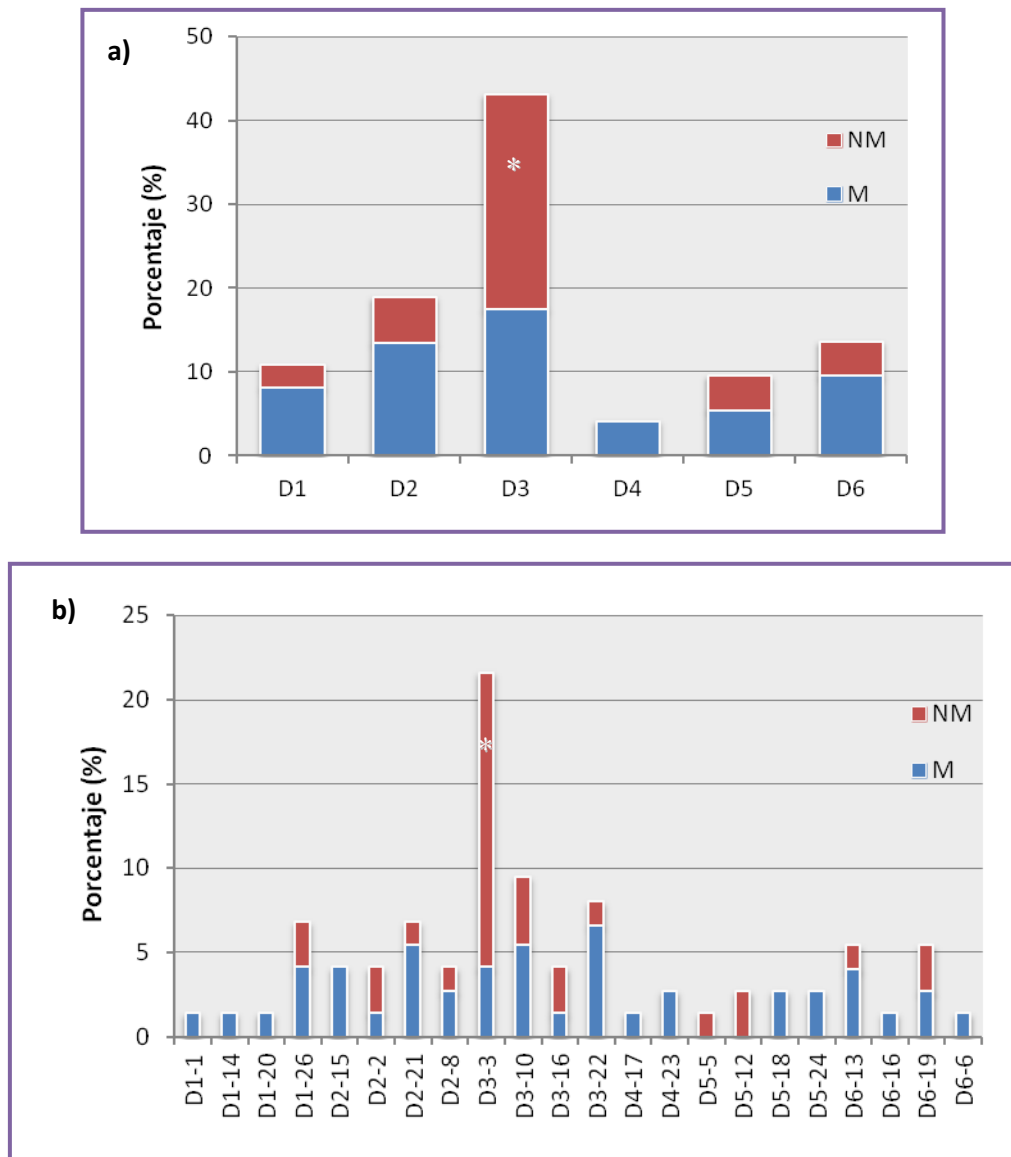


Figure 30: a) Distribución de familias *IGHD* en pacientes LLC M y NM. \*Diferencias significativas en la frecuencia de casos *IGHD3* NM respecto del resto de la serie ( $p=0,0097$ ); b) Distribución de los segmentos *IGHD* entre pacientes M y NM. \*Diferencias significativas en la frecuencia de casos *IGHD3-3* NM respecto del total de la serie ( $p=0,0005$ ).

#### 4.2.2.3. Distribución de segmentos y genes *JH*

Con respecto a los segmentos *IGJH*, el más frecuentemente utilizado fue *IGJH4* (44,6/ ), seguido de *IGJH6* (25,7/ ), *IGJH3* (16,2/ ), *IGJH5* (9,5/ ) e *IGJH1* (4/ ), no habiéndose

encontrado ningún caso *IGJH2* (Figura 31a). En el grupo de pacientes M, el segmento *IGJH4* fue el mayormente expresado (72,7%) presentando diferencias significativas respecto del resto de la serie ( $p=0,033$ ), mientras que *IGJH6* se encontró más representado en los pacientes NM (70,5%). Asimismo, el gen *IGJH4\*02* (39,1%) fue el más frecuentemente utilizado en nuestra serie, seguido de *IGJH6\*02* (21,6%) e *IGJH3\*02* (14,9%) (Figura 31b).

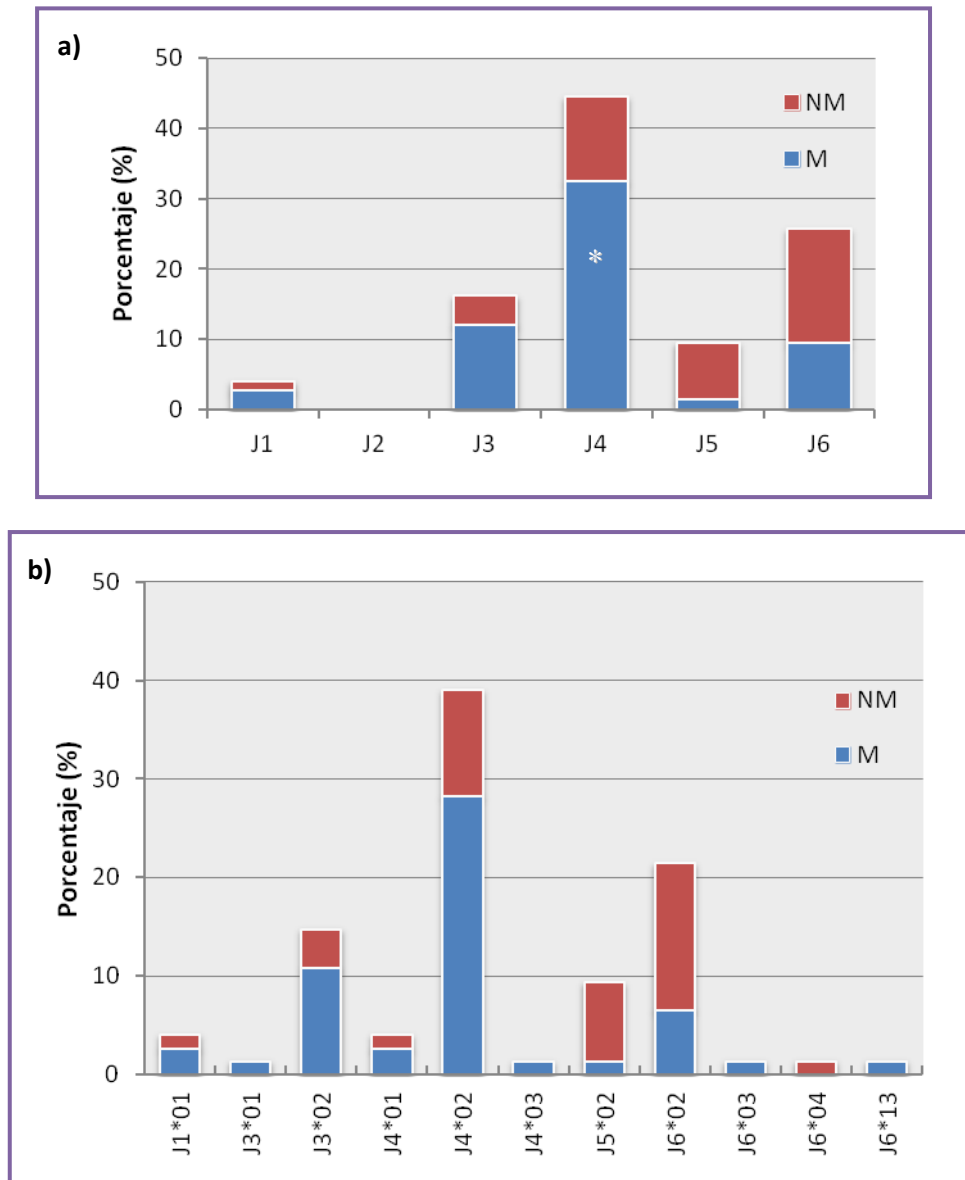


Figura 31: a) Distribución de familias *IGJH* en pacientes LLC M y NM. \*Diferencias significativas en la frecuencia de pacientes *IGJH4* M con respecto a la serie entera ( $p=0,033$ ). b) Distribución de genes *IGJH* en pacientes M y NM.

#### 4.2.3 Análisis de longitud de HCDR3 y presencia de estereotipos:

El análisis de las secuencias HCDR3 mostró una longitud media de 16 aminoácidos (aa) (rango: 6-27 aa), siendo la misma significativamente más corta en el grupo M (14 aa; rango: 6-

27 aa) en comparación con los pacientes NM (19 aa; rango: 11-25 aa) ( $p=0,0001$ ) (Tabla 1). Con respecto a las familias *VH*, esta longitud también fue mayor en los casos *IGVH1* (19 aa), asociada a estatus NM, respecto de *IGVH2* (15 aa) ( $p=0,008$ ), *IGVH3* (15 aa) ( $p=0,004$ ) e *IGVH4* (15 aa) ( $p=0,035$ ), con mayor proporción de LLC M. De la misma manera, la longitud media de HCDR3 en los casos con *IGVH1-69* (22 aa), fue mayor que la encontrada en casos con *IGVH3-7*, *IGVH3-72* (12 aa cada uno) ( $p=0,044$  para ambos casos), *IGVH2-5* (15 aa) e *IGVH3-23* (16 aa).

El análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de los HCDR3 en nuestros pacientes se efectuó tomando como referencia las series publicadas por Bomben et al (2009) y Messmer et al (2004). Esta evaluación mostró la presencia de receptores estereotipados en siete pacientes (9,5%) (Tabla 16). Cuatro de ellos fueron *IGVH1* mientras que los tres restantes fueron *IGVH3*; cinco de los 7 casos expresaron genes *IGVH* NM. A su vez, se encontró expresión de *IGHJ6* en cinco pacientes, junto con el segmento *IGHD3-3* (3 casos) e *IGHD1-26* (2).

Tabla 16: Secuencias HCDR3 de pacientes con LLC con receptores estereotipados.

Caso	Rearreglo			Edo. mutacional	Secuencia HCDR3	Cluster Bomben et al	MAS	Cluster Messmer et al	MAS
	Gen <i>IGHV</i>	Gen <i>IGHD</i>	Gen <i>IGHJ</i>						
14	V1-3*01	D6-19	J4*02	NM	EQWLVLASFDY	1	64	-	-
15	V3-30*03	D1-20	J3*02	M	NNWVDFQDASDI	N6	70	26	58
16	V1-3*03	D1-26	J6*02	NM	MYSGSYYYYYGMVDV	-	-	27	73
18	V1-69*01	D3-3	J6*02	NM	PKDSYDFWSGYHVLYYYYGMDV	7	62	9	68
26	V3-30*03	D3-3	J6*02	NM	ADLNADDFWSGYHYYYYGMDV	7	62	64	63
59	V1-69*13	D3-3	J6*02	NM	DPTGDFWSGYPNYYYYGMDV	7	71	-	-
66	V3-21*01	D1-26	J6*02	M	TRDANGMDV	2	82	2	88

NM: no mutado; M: mutado; MAS: *mean alignment score*. El MAS se calcula como el valor medio de todos los scores de pares de alineamiento obtenidos por el programa ClustalW. Clusters 1, 2, 7 y N6 identificados por Bomben et al [2009]; clusters 2, 9, 26, 27 and 64 identificados por Messmer et al [2004].

#### 4.2.4 Comparación de nuestros datos con los reportados previamente

Al realizar la comparación de los datos observados en el presente trabajo con los previamente publicados en la literatura, se encontró que, globalmente, nuestra distribución de familias *IGVH* ( $VH3 > VH1 > VH4$ ) es similar a la reportada para los países occidentales, y diferente a las frecuencias observadas en países asiáticos (Tabla 17). Particularmente, detectamos diferencias significativas para *VH1* respecto de Japón ( $p=0,012$ ) y China ( $p=0,02$ ) y para *VH4* respecto de China ( $p=0,001$ ). Resulta también interesante que nuestra serie tiene una frecuencia algo mayor de *VH2* respecto de USA ( $p=0,03$ ) e Italia ( $p=0,02$ ). Cuando se efectuó la comparación con los datos de países de América Latina, encontramos que Brasil y Uruguay mostraban una distribución de familias similar a la de los países asiáticos

(VH3>VH4>VH1), encontrándose diferencias significativas con la serie de Brasil para VH4 (p=0,03).

Tabla 17: Distribución de familias *IGVH* en pacientes LLC de diferentes regiones geográficas.

	Total de secuencias reportadas	Familias <i>IGVH</i> ( % )							Referencias
		VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6	VH7	
USA	1188	26,9	2,0●	48,0	20,3	1,0	0,7	0,3	Widhopf et al, 2004
Suecia	407	28,0	2,0~	47,0	19,5	<2	<2	<2	Tobin et al, 2004
Italia	1456	22,3	2,1#	50,8	21,4	2,3	0,6	0,5	Bomben et al, 2009; Nardini et al, 2003
España	56	39,3	3,6	35,7	17,8	1,8	0	1,8	Crespo et al, 2003
Francia	39	23,1	10,3	41,0	15,4	7,7	2,5	0	Maloum et al, 2000
Mediterráneo	927	24,3	2,8	46,1	23,4	2,4	0,8	0,2	Stamatopoulos et al, 2007
Inglaterra	243	25,5	5,7	49,3	15,6	2,5	1,2	0	Hamblin et al, 1999; Duke et al, 2003
Japón	155	9,7*	3,9	49,7	33,0	2,6	1,3	0	Koiso et al, 2006; Ikematsu et al, 1994; Nakahashi et al, 2009
China	111	9,0#	2,7	46,8	37,8†	2,7	0	0,9	Irons et al, 2009; Chen et al, 2008
Irán	87	18,4	0	56,4	20,7	1,1	3,4	0	Hojjat-Farsangi et al, 2009
Brasil	37	10,8	5,4	37,8	35,2●	8,1	2,7	0	Pimentel et al, 2008
Uruguay	80	17,5	2,5	52,5	22,5	1,3	1,3	2,5	Bianchi et al, 2010
Venezuela	87	25,3	0	48,3	21,8	4,6	0	0	Marquez et al, 2012
<b>Argentina</b>	<b>74</b>	<b>23</b>	<b>6,8</b>	<b>52,7</b>	<b>16,2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,4</b>	

110

Diferencias significativas entre frecuencias de Argentina y otras series para: VH1 respecto de Japón \*p=0,012 y China #p=0,02; VH2 respecto de USA ●p=0,03 e Italia #p=0,02 y con respecto a Suecia ~p=0,051; VH4 respecto de China †p=0,001 y Brasil ●p=0,03.

Asimismo, se evaluó la distribución de los genes *IGVH* en pacientes con LLC de diferentes regiones geográficas (Tabla 18; Figura 32) observándose que nuestra población presentaba un patrón similar al reportado para los países occidentales, con mayor expresión de los segmentos *IGVH3-23* e *IGVH1-69*. Particularmente, se encontró una menor representación de *IGVH4-34* respecto de las series publicadas, con diferencias significativas para USA ( $p=0,04$ ) y Asia ( $p=0,003$ ). Por el contrario los genes *IGVH4-59*, *IGVH3-72* e *IGVH2-5* se mostraron sobreexpresados en nuestros pacientes comparado con las demás regiones evaluadas. En forma específica, *IGVH4-59* mostró diferencias significativas respecto de Europa ( $p=0,034$ ), *IGVH3-72* comparado con los países asiáticos ( $p=0,024$ ), en tanto que *IGVH2-5* se encontró sobreexpresado respecto de las series de Europa ( $p=0,011$ ), Asia ( $p=0,006$ ) e incluso comparado con los restantes países de América Latina ( $p=0,001$ ).

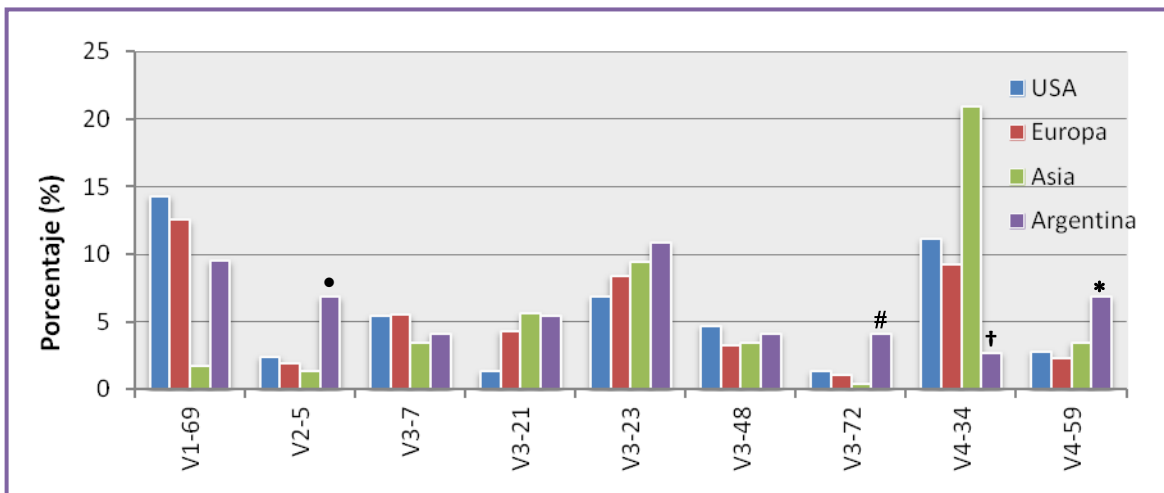


Figura 32: Distribución de segmentos *IGVH* en pacientes con LLC de diferentes regiones geográficas. Diferencias significativas entre las frecuencias de Argentina respecto de otras regiones geográficas : •VH2-5 respecto de Europa ( $p=0,011$ ), Asia ( $p=0,006$ ) y América del Sur ( $p=0,001$ ); # VH3-72 respecto de Asia ( $p=0,024$ ); †VH4-34 respecto de USA ( $p=0,04$ ) y Asia ( $p=0,003$ ); \*VH4-59 respecto de Europa ( $p=0,034$ ).



Tabla 18: Distribución de genes *IGVH* en pacientes de diferentes regiones geográficas.

Referencias	Total de secuencias	Segmentos <i>IGVH</i> ( / )										
		1-2	1-69	2-5	3-7	3-21	3-23	3-43	3-48	3-72	4-34	4-59
<b>USA</b>												
Mauerer et al, 2005	375	4,8	18	3	4,3	1,6	7	0	4,3	0,5	7	0
Weinberg et al, 2007	172	5,2	12,2	3,5	5,2	0	6,4	0	8,7	3,5	15,7	5,8
Messmer et al, 2004	172	6,4	10,5	NI	8,2	1,2	6,4	0	2,9	1,1	14,5	4,7
Pasqualucci et al, 2000	41	2,4	4,9	2,4	4,9	4,9	9,8	0	0	0	14,6	4,9
<b>Europa</b>												
Tobin et al, 2004	407	4	14	NI	3	9	5	NI	NI	NI	7	NI
Pritsch et al, 1993	25	8,0	4,0	8	0	4,0	16,0	0	0	0	12,0	0
Bomben et al, 2007	1426	4,2	11,9	1,5	5,8	4,1	9,4	0	3,8	1,9	9,0	3,2
Nardini et al, 2003	30	13,3	3,3	0	6,6	3,3	0	0	6,7	0	3,3	0
Crespo et al, 2003	56	1,8	21,4	1,8	1,8	1,8	5,4	1,8	3,6	3,6	7,1	1,8
Maloum et al, 2000	39	5,1	10,2	10,8	2,6	2,6	12,8	0	0	0	10,3	0
Stamatopoulos et al, 2007	927	4,1	12,6	4	6,6	3,5	9,0	0,43	3,6	0,8	10,4	2,4
Ghia et al, 2005	553	4,2	10,7	3,1	5,4	3,0	9,2	NI	2,2	0	10,7	2,0
Hamblin et al, 1999	84	7,1	11,9	1,2	7,1	2,4	11,9	0	4,8	0	11,9	1,2
Duke et al, 2003	159	6,3	11,3	4,4	5,0	5,7	8,2	0,6	5,6	1,9	6,9	0,6
Abramenko et al, 2007	189	5,3	21,7	0	4,8	5,8	1,6	0	4,2	0	7,4	3,7
<b>Asia</b>												
Koiso et al, 2006	43	NI	2,3	NI	NI	7	14	7,0	NI	NI	20,9	NI
Nakahashi et al, 2009	80	1,25	1,25	0	5	7,5	8,75	1	3,75	0	27,5	0
Chen et al, 2008	65	0	1,5	4,2	4,6	3	7,7	0	1,5	0	12,3	10,8
Irons et al, 2009	46	2,2	2,2	0	2,2	4,3	8,7	0	8,7	1	21,7	1
Hojjat-Farsangi et al, 2009	87	3,4	5,7	0	12,6	0	4,6	0	9,2	0	5,7	0
<b>América del Sur</b>												
Pimentel et al, 2008	37	0	5,4	0	5,4	0	10,8	0	0	1	8,1	8,1
Bianchi et al, 2010	80	3,75	7,5	0	12,5	1,3	11,3	0	5,0	1	7,5	1,25
Marquez et al, 2012	87	4,6	14,9	0	8	9,2	14,6	0	3,4	0	10,3	2,3
<b>Argentina</b>	<b>74</b>	<b>2,7</b>	<b>9,5</b>	<b>6,8</b>	<b>4,1</b>	<b>5,4</b>	<b>10,8</b>	<b>1,3</b>	<b>4,1</b>	<b>4,1</b>	<b>2,7</b>	<b>6,8</b>

NI : no identificado.

#### 4.2.5. Discusión

El análisis del repertorio de genes *IGVH* en LLC ha demostrado estar sesgado tanto a nivel de las familias como de los genes utilizados, mostrando asimismo importantes variaciones étnicas y geográficas. En el presente trabajo, estudiamos por primera vez el estado mutacional así como la distribución y uso de los genes *IGVH* en pacientes argentinos con LLC, y realizamos la comparación de estos datos con los previamente publicados en la literatura para otras regiones geográficas. Nuestros resultados mostraron un 59% de casos M y un 41% de pacientes NM, encontrando frecuencias similares a las publicadas para otras poblaciones (Duke et al, 2003; Maurer et al, 2005; Stamatopoulos et al, 2007), confirmando que, en al menos la mitad de los casos, los genes *IGVH* poseen un número relevante de mutaciones somáticas.

La presencia de aberraciones genómicas y el estado mutacional de *IGVH* son considerados como importantes factores de riesgo en esta patología. Si bien no observamos diferencias en la distribución de cariotipos normales y anormales entre pacientes M y NM, encontramos que los casos con LLC NM presentaban mayor número de alteraciones por cariotipo así como un porcentaje más alto de translocaciones desbalanceadas. En este aspecto, los resultados publicados por otros autores son contradictorios, existiendo correlación entre pacientes NM y la presencia de aberraciones cromosómicas en algunos estudios (Dicker et al, 2006; Haferlach et al, 2007) mientras que otros autores no han encontrado este tipo de asociación (Van den Neste et al, 2007), resaltando la necesidad de continuar estos estudios. En cuanto a la correlación con los datos de FISH, encontramos una asociación significativa entre la del(13)(q14) y la presencia de *IGVH* M, sustentando el pronóstico favorable de ambos parámetros. En este aspecto, nuestros datos confirman resultados previos de la literatura que indican una distribución diferente de rearrreglos genómicos entre los pacientes con LLC M y NM (Kröber et al, 2002; Stilgenbauer et al, 2001; Haferlach et al, 2007). Un estudio más reciente analiza la correlación entre los rearrreglos genómicos, evaluados por array de SNP (*single nucleotide polymorphism*), y diferentes subsets de pacientes con receptores estereotipados, detectándose que el subset #2 con *IGVH3-21*, asociado con mal pronóstico, presentaba un mayor número de aberraciones e incremento de deleción 11q respecto del subset #4 con *IGVH4-34*, relacionado a enfermedad con bajo nivel proliferativo, que podría evitar la acumulación de alteraciones (Marincevic et al, 2010). Asimismo, *IGVH4-34* estereotipado ha sido asociado a del(13)(q14) con diferencias significativas respecto de *IGVH4-*

34 no estereotipado (Athanasidou et al, 2008), evidenciando la importancia de la presión selectiva en la leucemogénesis de al menos algunos pacientes con LLC.

Al evaluar el uso de las distintas familias *IGVH*, se encontró una distribución similar a la observada en países de occidente (Duke et al, 2003; Widhopf et al, 2004; Stamatopoulos et al, 2007), con una mayor representación de la familia *IGVH3*, seguida de *IGVH1* e *IGVH4*. Interesantemente, la distribución de nuestra población fue diferente a la reportada en las series de Asia (Ikematsu et al, 1994; Koiso et al, 2006; Hojjat-Farsangi et al, 2007; Chen et al, 2008), así como de los pacientes con LLC de Brasil (Pimentel et al, 2008) y Uruguay (Bianchi et al, 2010), que muestran una distribución *IGVH3>IGVH4>IGVH1*. Las diferencias con otros países latinoamericanos resultan de interés, pudiendo reflejar variaciones de origen genético y/o la influencia de factores ambientales. En este aspecto, sabemos que la población Argentina posee contribuciones ancestrales tanto de población europea (mayormente de la zona mediterránea (79/ ), como amerindia (17/ ) y africana (4/ ) (Seldin et al, 2007; Avena et al, 2012). Por su parte, la población uruguaya presenta una frecuencia similar de población de origen europeo (84,1/ ) en tanto que las contribuciones amerindia (5,6/ ) y africana (10,4/ ) se encuentran invertidas con respecto a la observada en nuestro país (Hidalgo et al, 2005). Simultáneamente, la estructura genética de la población brasilera es marcadamente diferente, con un alto grado de mezcla entre individuos de distintos orígenes étnicos con variaciones genotípicas importantes (Ghiolo et al, 2012), lo que sustentaría las diferencias encontradas. Asimismo, la baja representación de las familias *IGVH2* e *IGVH7* así como la ausencia de expresión de *IGVH5* e *IGVH6* en nuestra serie también fueron observadas en otros estudios, más allá del origen étnico de cada caso.

La comparación de los genes *IGVH* con los datos de otras regiones geográficas, permitió observar que nuestros pacientes tenían sobreexpresión de *IGVH4-59*, *IGVH3-72* e *IGVH2-5* y una menor representación de *IGVH4-34*. El gen *IGVH4-59* (6,8/ ) mostró una distribución comparable a la detectada en pacientes con LLC de Brasil (Pimentel et al, 2008) (8,1/ ) y China (Chen et al, 2008) (10,8/ ), y una frecuencia mayor respecto de otras regiones geográficas, particularmente de países europeos (Ghia et al, 2005; Messmer et al, 2004; Duke et al, 2003; Stamatopoulos et al, 2007; Bomben et al, 2009), con los que mostró diferencias significativas. Asimismo, resulta de interés la sobreexpresión del gen *IGVH2-5* (6,8/ ), el cual se ha encontrado poco representado en la mayoría de las series analizadas excepto en una cohorte pequeña de pacientes de Francia (10,3/ ) (Maloum et al, 2000), presentando en nuestra población una sobreexpresión significativamente diferente que la detectada en

Europa, Asia y América Latina. Con respecto al gen *IGVH3-72*, aunque este segmento ha sido relacionado con presencia de enfermedad estable e indolente (Capello et al, 2004), esta asociación no fue confirmada en nuestros casos ya que 2 de los 3 pacientes que expresaron este gen requirieron tratamiento luego de un seguimiento de 48 y 108 meses, respectivamente. Por el contrario, a diferencia de lo observado en poblaciones de Europa, Asia y USA (Messmer et al, 2004; Koiso et al, 2006; Weinberg et al, 2007; Stamatopoulos et al, 2007; Chen et al, 2008; Bomben et al, 2009) donde se ha reportado una alta representación del gen *IGVH4-34*, nosotros observamos una frecuencia baja (2,7/ ) del mismo, datos comparables con los reportados en un pequeño número de casos con LLC en Italia (3,3/ ) (Nardini et al, 2003) y en pacientes iraníes (5,7/ ) (Hojjat-Farsangi et al, 2009). Estos hallazgos en pacientes no relacionados y/o geográficamente distantes, sugerirían la selección y expansión clonal de las células leucémicas mediante la participación de estímulos antigénicos específicos que influirían en la patogénesis y las características clínico-biológicas de la LLC.

Respecto de los genes restantes, acorde a lo publicado por diferentes autores, el segmento *IGVH3-23* fue el mayormente observado entre nuestros pacientes, asociado a LLC M (Duke et al, 2007; Stamatopoulos et al, 2007). Una baja frecuencia de *IGVH3-23* ha sido observada únicamente en pacientes ucranianos (1,6/ ) (Abramenko et al, 2007). Asimismo, este gen no se ha encontrado presente en clusters de receptores de células B estereotipados y posee un perfil mutacional asociado a unión antigénica (Bomben et al, 2010). La expresión del gen *IGVH3-23* está altamente relacionada a un subgrupo de pacientes con características clínico-biológicas particulares y es considerado un marcador de mal pronóstico independiente en casos de LLC M (Bomben et al, 2010). En concordancia con estos datos, al momento del presente estudio, 5/8 (62,5/ ) de nuestros casos que mostraron este rearrreglo presentaron enfermedad progresiva, y tres de ellos requirieron tratamiento al momento del diagnóstico.

Coincidentemente con estudios previos (Hamblin et al, 1999; Potter et al, 2003; Messmer et al, 2004; Mauerer et al, 2005; Stamatopoulos et al, 2007; Bomben et al, 2009), el segmento *IGVH1-69* fue el segundo en frecuencia y el mayormente expresado de los pertenecientes a la familia *IGVH1*, exhibiendo en casi todos los casos una configuración germinal (perfil 100/ NM), encontrándose asociado a pronóstico adverso (Potter et al, 2003). La mayor incidencia de uso de *IGVH1-69* ha sido reportada en pacientes con LLC de Ucrania (21,7/ ) (Bomben et al, 2010) y España (21,4/ ) (Crespo et al, 2003). Nuestros datos, al igual que los descriptos para Brasil (Pimentel et al, 2008) y Uruguay (Bianchi et al, 2010), son mayores que los observados en población asiática (Koiso et al, 2006; Chen et al, 2008; Irons et

al, 2009; Nakahashi et al, 2009) pero menores que la mayoría de las series de Europa (Mauerer et al, 2005; Stamatopoulos et al, 2007; Bomben et al, 2009) y USA (Messmer et al, 2004; Mauerer et al, 2005). Varios estudios han demostrado que los pacientes portadores de rearrreglos *IGVH1-69* en LLC muestran características específicas, como ser un uso sesgado de genes *IGHD* e *IGHJ* y una longitud media para la región HCDR3 significativamente más larga en comparación con casos LLC asociados a otros rearrreglos *IGVH* (Potter et al, 2003; Duke et al, 2003). En nuestra serie pudimos confirmar la asociación del segmento *IGVH1-69* con los genes *IGHD3-3*, *IGHD3-10*, *IGHD2-2* e *IGHJ6* (Potter et al, 2003; Duke et al, 2003; Mauerer et al, 2005), así como también la presencia de una longitud HCDR3 mayor en comparación con los pacientes que expresaron por ejemplo los segmentos *IGVH3-7*, *IGVH3-72*, *IGVH2-5* e *IGVH3-23*. A su vez, dos de los casos con expresión de *IGVH1-69* mostraron receptores estereotipados.

En este aspecto, nuestra serie mostró receptores estereotipados en el 9,5% de los casos, frecuencia menor que la observada en otros estudios (Messmer et al, 2004; Stamatopoulos et al, 2007; Murray et al, 2008; Bomben et al, 2009; Marquez et al, 2012), pero similar a la reportada por Bianchi et al (2010) y Tobin et al (2004) (12,5%). Acorde a lo descripto, la mayoría de estos receptores estereotipados fueron detectados en casos con *IGVH* NM (Tobin et al, 2004; Stamatopoulos et al, 2007; Bomben et al, 2009). La presencia de estos receptores estereotipados sustentan la hipótesis de la presencia de estímulos antigénicos específicos o epitopes estructuralmente similares, en el desarrollo y la patogénesis de la LLC (Dühren-von Minden et al, 2012).

Finalmente, es interesante remarcar que el segmento *IGVH3-21* presentó una frecuencia en nuestra cohorte de 5,4%, dentro de ellos solo un caso (1/4; 25%) mostró receptor estereotipado perteneciente al cluster #2. Frecuencias similares para este segmento (5,8%) fueron reportadas por Abramenko et al (2007) en pacientes de Ucrania, quienes encontraron 18,2% de receptores estereotipados. Este gen fue observado en alta frecuencia en pacientes escandinavos (Tobin et al, 2004; Cahill et al, 2012), siendo de baja incidencia en grandes cohortes de USA y la región mediterránea (Messmer et al, 2004; Mauerer et al, 2005; Ghia et al, 2005). Recientemente, *IGVH3-21* fue observado en alta frecuencia en la población mestiza de Venezuela, alcanzando el 22,2% del total de genes expresados (Marquez et al, 2012), sustentando la importancia del background genético en la ocurrencia de los distintos rearrreglos en poblaciones de diferente origen geográfico y/o étnico.

En conclusión, nosotros hemos estudiado por primera vez los rearrreglos *IGVH* en pacientes argentinos con LLC encontrando resultados coincidentes con aquellos reportados en

poblaciones occidentales, así como también interesantes similitudes y diferencias respecto de las series publicadas de América Latina, sugiriendo la relevancia de estímulos antigénicos específicos en la patogénesis y las características clínico-biológicas de la enfermedad.

## **Capítulo III:**

### **Análisis de expresión génica**

### 4.3. Análisis de expresión génica

#### Optimización de la QRT-PCR

En primera instancia se procedió a la optimización de las condiciones de PCR para poder llevar a cabo la cuantificación génica con una alta eficiencia, reproducibilidad, sensibilidad y especificidad. Asimismo, se determinaron las concentraciones óptimas de los *primers* y las sondas a utilizar, así como las temperaturas y los tiempos de reacción.

#### Eficiencia de la amplificación en la PCR cuantitativa

El fundamento teórico de esta técnica es la amplificación exponencial de un segmento de ADN definido, mediante el uso de *primers* que se hibridan de manera específica con cada una de las hebras complementarias de ADN. Si bien la estrategia de PCR es muy poderosa y relativamente simple, cuando es utilizada con fines cuantitativos es necesario medir la eficiencia de amplificación de los diferentes juegos de *primers* con el propósito de eliminar cualquier artefacto experimental en el resultado final. La eficiencia de una reacción de PCR se define como el porcentaje de conversión de ADN molde a producto por ciclo. El máximo valor que puede tener es 2, donde todas las moléculas de ADN existentes son duplicadas por amplificación en cada ciclo y el valor mínimo es 1, cuando no se ha producido amplificación. Para una exacta cuantificación es necesario que las eficiencias de los estándares y de las muestras sean muy similares (por encima del 90%) dado que pequeñas variaciones en la eficiencia de amplificación conllevan a modificaciones considerables en los valores de concentración del producto. La eficiencia de la PCR dependerá, entre otros factores, de la calidad de los *primers*, de las condiciones de amplificación, del fragmento amplificado y de la pureza de la muestra de ARN.

El número de ciclos necesario para alcanzar un valor umbral de fluorescencia es una medida cuantitativa fundamental en este ensayo denominada *Crossing Point (Cp)* (Rasmussen, et al, 2001). La eficiencia de reacción para cada gen se determinó empleando diluciones seriadas de diferentes estándares previamente mencionados, por duplicado, y se representó el *Cp* con respecto al logaritmo de la concentración. La misma se calculó a partir de la pendiente de la recta resultante de dicha representación:

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

Para cada uno de los genes, las diferencias de la eficiencia entre distintas curvas no deben ser superiores a  $\pm 0,05$  ( $\pm 2,5\%$ ). En la Tabla 19 se muestra el valor promedio para cada gen evaluado y los genes de referencia, observándose una eficiencia similar para los estándares de todos los genes analizados.



Tabla 19: Valores de las eficiencias de amplificación obtenidas en cuatro ensayos diferentes de QRT-PCR utilizando ADNc de los estándares elegidos

Transcripto	Eficiencia				Promedio de Eficiencias
	Curva St 1	Curva St 2	Curva St 3	Curva St 4	
<i>LPL</i>	1,903	1,950	1,875	1,890	1,905
<i>ADAM-29</i>	1,801	1,939	1,860	1,901	1,875
<i>MCL-1</i>	1,782	1,894	1,986	1,908	1,893
<i>SEPT-10</i>	1,931	1,878	1,963	1,828	1,900
<i>CLU-1</i>	1,939	1,921	1,892	1,905	1,914
<i>B2M</i>	1,979	1,899	1,907	1,912	1,924
<i>GAPDH</i>	1,870	1,879	1,823	1,890	1,866

Curva St: curva estándar

#### Reproducibilidad de la PCR cuantitativa

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

El coeficiente de variación (CV) de los *C<sub>p</sub>* se utiliza habitualmente como un indicador de la reproducibilidad. El CV de un conjunto de datos se determina dividiendo la desviación estándar por la media aritmética de dichos valores. La variabilidad intra-ensayo se determinó a partir de cinco estándares para cada gen, los cuales fueron cuantificados por duplicado (Tabla 2). La máxima diferencia absoluta en los valores de *C<sub>p</sub>* intra-ensayo fue inferior a 0,7 ciclos para cada duplicado de la muestra. La variabilidad inter-ensayo se calculó en las mismas muestras en tres días diferentes. En este caso las diferencias absolutas en el *C<sub>p</sub>* para una misma muestra fueron inferiores a 1,5 ciclos.

Tabla 20: Determinación de la reproducibilidad intra- e inter-ensayo de la PCR cuantitativa. Los valores se expresan como porcentajes del CV del *Crossing Point*.

Gen	Reproducibilidad CV ( % )	
	Inter-ensayo	Intra-ensayo
<i>LPL</i>	0,35	1,24
<i>ADAM-29</i>	0,52	1,28
<i>MCL-1</i>	0,41	1,38
<i>SEPT-10</i>	0,38	1,24
<i>CLU-1</i>	0,28	1,15
<i>B2M</i>	0,24	1,20
<i>GAPDH</i>	0,25	0,35

CV: coeficiente de variación.

#### Sensibilidad y especificidad de la PCR cuantitativa

Para determinar la mínima cantidad de ADNc que puede ser cuantificado mediante la PCR en tiempo real en cada uno de los genes de interés, se construyó una curva patrón para cada uno de ellos a partir de diluciones seriadas de estándares de concentración conocida. Todas las curvas mostraron coeficientes de correlación cercanos a 1, indicando la existencia de una relación lineal precisa (Figura 33).

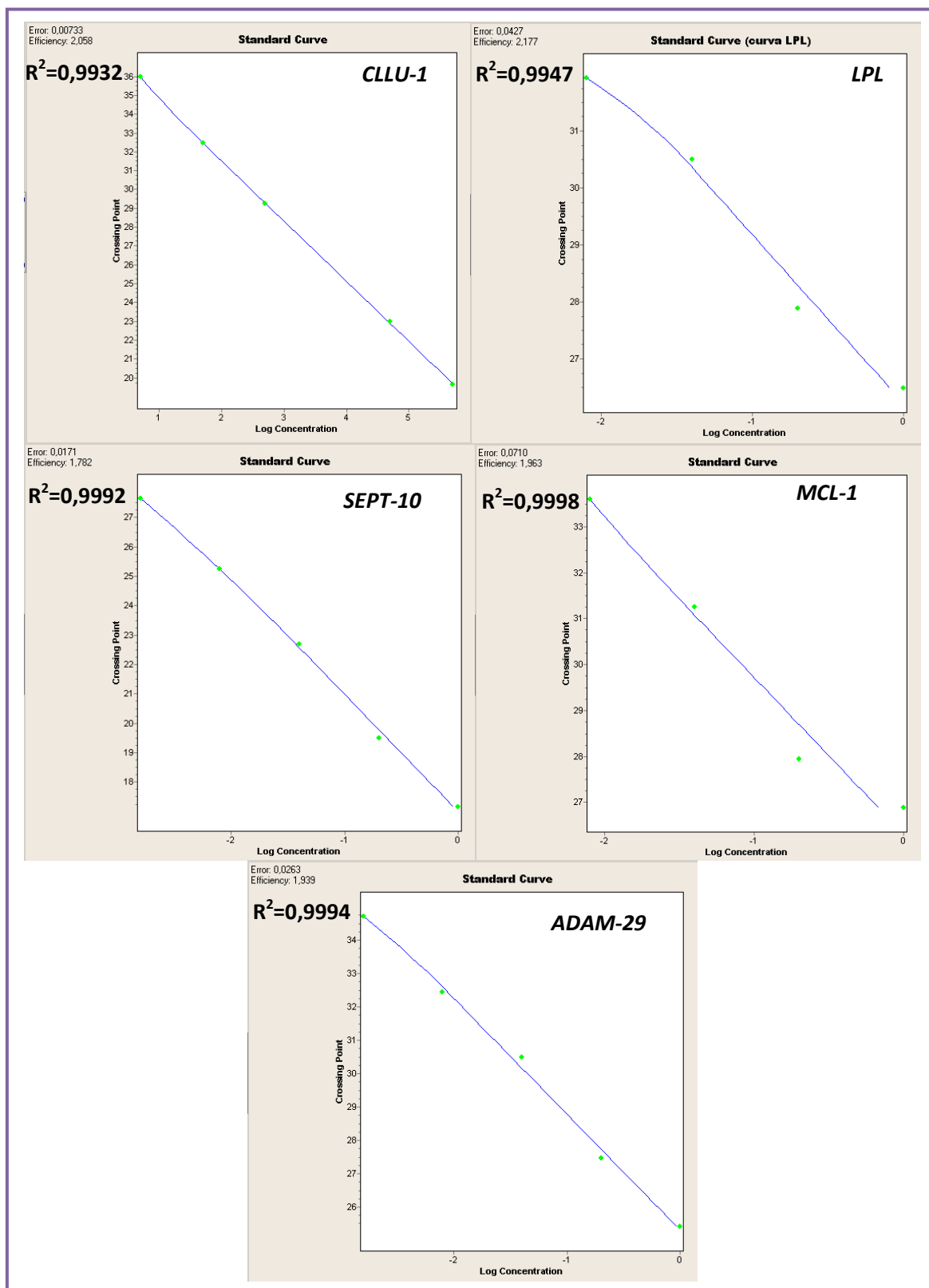


Figura 33: Curvas de calibración representadas por el logaritmo de la concentración de ARN respecto a su Cp. Se indica para cada gen la eficiencia, el error entre duplicados y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

Como se mencionó previamente, en este trabajo se emplearon ambas metodologías *SYBRGreen* y *TaqMan*. En el caso del método *SYBRGreen*, al tratarse de un intercalante del ADN doble cadena (ADNdc), se va a detectar tanto el producto deseado como productos inespecíficos y dímeros de *primers*, por lo tanto es necesario comprobar la especificidad del producto amplificado luego de la reacción de PCR mediante la realización de las curvas de *melting*. Este método se lleva a cabo por el mismo software LightCycler (Roche), posteriormente al ciclado, para evidenciar eventuales productos inespecíficos o dímeros de *primers* que pueden alterar la cuantificación. En este análisis la temperatura es aumentada lentamente desde 40°C a 95°C con monitoreo y medición continua de la fluorescencia, la cual será máxima a temperaturas bajas, cuando todo el ADN se encuentra como ADNdc. Mientras que, a temperaturas altas, el ADN se desnaturaliza liberando el fluoróforo y disminuyendo bruscamente la fluorescencia cercana al punto de *melting* del producto específico (Temperatura de *melting*,  $T_m$ ). Los valores de fluorescencia se convierten en curvas de *melting* representando la derivada negativa de la fluorescencia respecto a la temperatura versus la temperatura ( $-dF/dT$  vs.  $T$ ) (Figura 34). Los diferentes productos de PCR, que varían en longitud, secuencia y contenido GC, tendrán  $T_m$  diferentes y específicos, y permitirán observar un único pico en la curva de *melting* cuando se logre la amplificación específica.

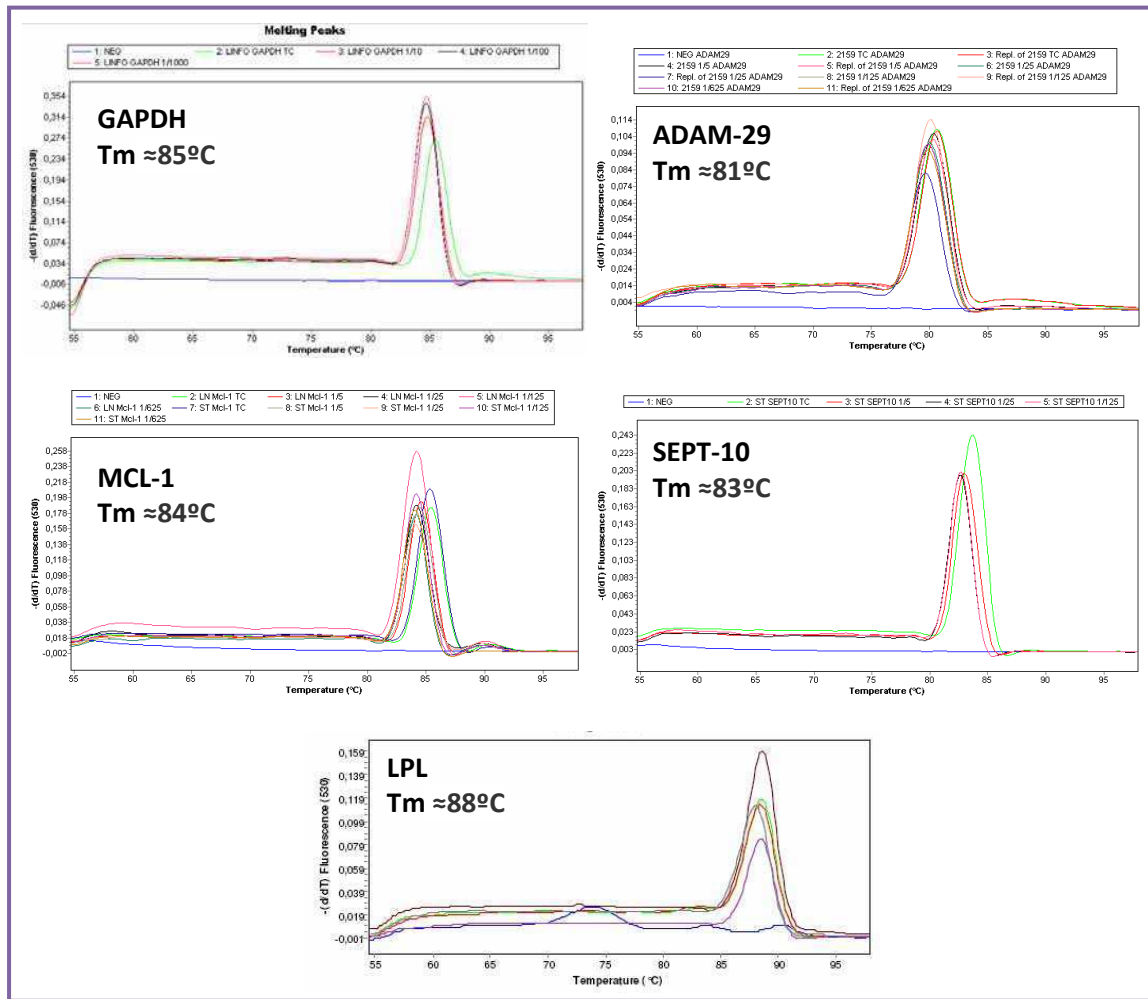


Figura 34: Curvas de *melting* mostrando amplificación específica de los genes de interés. Tm: temperatura de *melting*.

Por el contrario, la amplificación mediante la metodología *TaqMan* utiliza sondas específicas de secuencia que hibridan en forma complementaria con el producto que se quiere amplificar, tal que la fluorescencia observada corresponde únicamente al producto de interés (Figura 35).

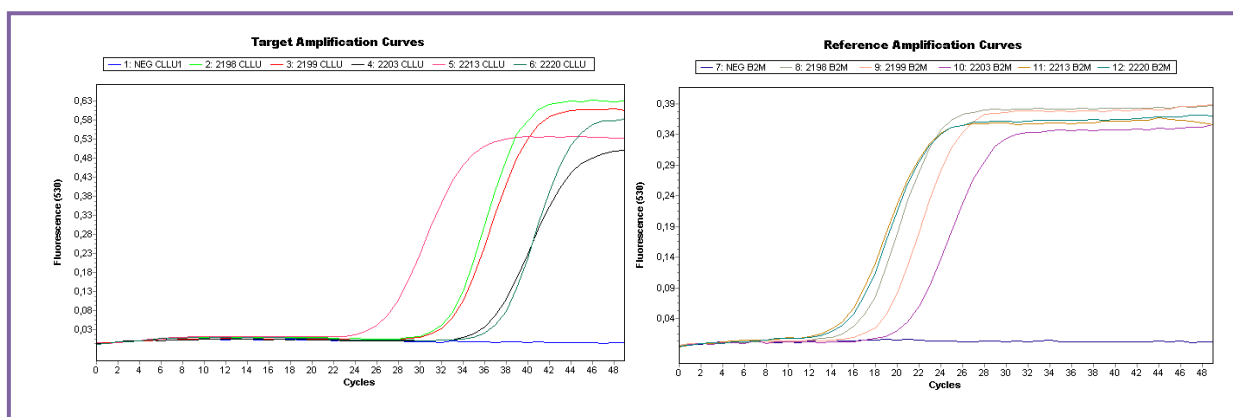


Figura 35: Ejemplo de curvas de amplificación representadas por la fluorescencia (530nm) en función del número de ciclos, empleando la técnica TaqMan. Se muestra a la derecha la amplificación del gen de referencia  $\beta 2M$  y a la izquierda del gen target  $CLLU-1$ .

#### 4.3.1. Perfiles de expresión génica

La cuantificación de la expresión se llevó a cabo en células mononucleares de SP de 81 pacientes con LLC (50 varones; edad media: 63,3 años) y de 10 individuos sanos (controles normales, C). El análisis de los perfiles de expresión génica permitió observar una gran heterogeneidad en los niveles de transcrito de todos los genes estudiados (Figura 36), efectuándose para una mejor evaluación la división de los pacientes en casos con sobreexpresión (SE) y baja expresión (BE) respecto del punto de corte establecido para cada uno de ellos mediante curvas ROC. Para los genes SEPT-10 y ADAM-29 los puntos de corte por curvas ROC fueron 221,5 y 18,4, respectivamente, muy similares a la media de los C (220,3 $\pm$ 107,5 y 17,65 $\pm$ 6,65, respectivamente). Para LPL y CLLU1, los puntos de corte fueron 2,7 y 5,7, respectivamente, equivalentes a 45 y 337 veces la media de los C (0,06 $\pm$ 0,02 y 1,68E-2 $\pm$ 7,6E-3, respectivamente). Finalmente, para MCL-1 el punto de corte de curvas ROC fue 6,4 equivalente a 2,55 veces la media de los controles normales (2,49 $\pm$ 0,22). Entre los pacientes analizados se encontraron casos que no alcanzaron el nivel de detección con la técnica utilizada: siete casos para el gen LPL, cuatro para CLLU-1, tres para MCL-1 y uno para ADAM-29, situación detectada en trabajos previos (Heintel et al, 2005; Nüchel et al, 2006; Chen et al, 2007; Véronèse et al, 2008; Awan et al, 2009; Maloum et a, 2010).

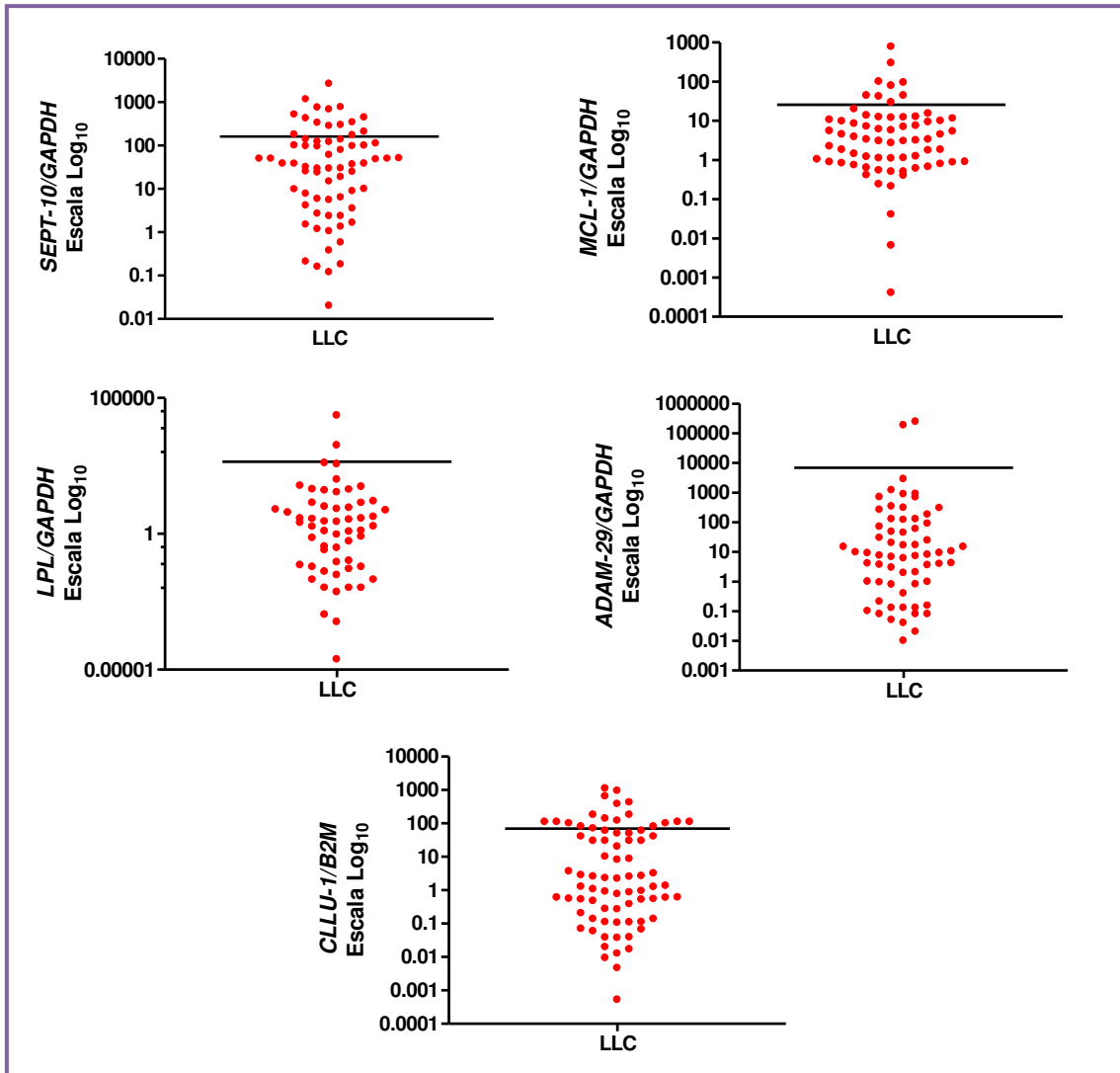


Figura 36: Dot-plot mostrando la alta heterogeneidad en los niveles de expresión de los genes estudiados en los pacientes con LLC. Los valores de expresión media ( $\pm$ SEM) de cada gen en el total de pacientes fue: *SEPT-10*= 161,9 $\pm$ 44,96; *MCL-1*= 25,82 $\pm$ 12,11; *LPL*= 446,8 $\pm$ 393,4; *ADAM-29*= 6883 $\pm$ 4766; y *CLLU-1*= 70,18 $\pm$ 20,96.

La Tabla 21 muestra los valores de expresión media de cada uno de los genes analizados en los controles normales (C), los puntos de corte así como en los grupos de alta y baja expresión. En este sentido se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión respecto de los controles para los genes *LPL* ( $p=0,0041$ ) y *CLLU-1* ( $p<0,0001$ ). El análisis de correlación entre la expresión de los diferentes genes mostró una asociación positiva únicamente entre los niveles de transcritos de *LPL* y *MCL-1* ( $p=0,0169$ ). El resto de los genes evaluados no mostraron ningún tipo de asociación entre ellos, probablemente debido al alto grado de heterogeneidad obtenido en los perfiles.

Tabla 21: Niveles de expresión relativa de los genes en estudio en controles, total de pacientes y en los grupos de baja y alta expresión de los pacientes analizados.

Grupo	Expresión génica (media±SEM)				
	<i>SEPT-10</i>	<i>MCL-1</i>	<i>LPL</i>	<i>ADAM-29</i>	<i>CLLU-1</i>
C	220,3±107,5	2,49±0,22	0,06±0,02	17,65±6,65	1,68E <sup>-2</sup> ±7,6E <sup>-3</sup>
Punto de corte	221,5	6,4	2,7	18,4	5,7
BE	44,26±6,99*	1,85±0,26	0,48±0,12	3,89±0,75•	0,80±0,15**
SE	720,9±190,5†	67,04±31,66**	942,8±828,1**	17970±11560#	169,9±46,0**

C: controles; BE: grupo baja expresión; SE: grupo sobre-expresión. Diferencias significativas respecto de C: \*p=0,004; \*\*p<0,0001; †p=0,0011; •p=0,0075; #p=0,0001.

### 4.3.2. Correlación con los parámetros clínicos

#### 4.3.2.1 Distribución de pacientes en función de los niveles de expresión génica

En primera instancia se efectuó el análisis de la distribución de pacientes acorde a los niveles de expresión de los genes *SEPT-10*, *MCL-1*, *LPL*, *CLLU-1* y *ADAM-29* en función del sexo, edad, estadio clínico Rai, estatus mutacional de *IGVH*, características citogenéticas y de FISH (Tabla 22). En este sentido observamos mayor edad en los casos con alta expresión de *SEPT-10* y *ADAM-29* (p=0,006 y p=0,034, respectivamente), así como una diferente distribución por sexo para *MCL-1*, con mayoría de varones en el grupo de baja expresión (p=0,017). Asimismo, *LPL* presentó diferencias significativas en la distribución por cariotipo (p=0,043), así como una mayor proporción de pacientes con alteraciones por FISH de pronóstico favorable en el grupo de baja expresión, aunque sin alcanzar diferencias significativas. Finalmente, para el gen *CLLU-1* se encontraron diferencias en la distribución de pacientes por estadios clínicos Rai (p=0,024) y se observó una tendencia a diferencia significativa en relación al estatus mutacional de *IGVH* con mayor frecuencia de pacientes con *IGVH* NM en el grupo de alta expresión (p=0,059).



Tabla 22: Distribución de casos entre los grupos de baja y alta expresión de los genes en estudio.

Nivel de expresión	SEPT-10		p	MCL-1		p	LPL		p	CLLU-1		p	ADAM-29		p
	Baja (<221,5)	Alta (≥221,5)		Baja (<6,4)	Alta (≥6,4)		Baja (<2,7)	Alta (≥2,7)		Baja (<5,7)	Alta (≥5,7)		Baja (<18,4)	Alta (≥18,4)	
Sexo (✓)															
M	65	50	0,347	76,2	44	<b>0,017</b>	56,7	63	0,831	62,6	56,3	0,334	69,2	53,8	0,319
F	35	50		23,8	56		43,3	37		30,4	43,7		30,8	46,2	
Edad media±SD (años)															
	61,7±11,5	71,4±6,3	<b>0,006</b>	63,8±11,5	62,3±12,7	0,625	62,3±12,6	65,3±11,2	0,35	61,4±14,9	68,8±11,9	0,451	60,3±12,1	66,5±10,7	<b>0,039</b>
Estadio clínico Rai (✓)															
0	31,8	54,5	0,346	36,7	37,5	0,951	50	33,3	0,286	36	39	<b>0,024</b>	27,6	50	0,24
I-II	47,7	36,4		43,3	45,8		27,3	50		38,5	61		51,7	37,5	
III-IV	20,5	9,1		20	16,7		22,7	16,7		25,5	0		20,7	12,5	
Estado mutacional de IGVH (✓)															
M	55,6	75	0,445	60,6	61	0,791	58,3	57	0,824	67,6	41	0,059	56,7	60	0,953
NM	44,4	25		39,4	39		41,7	43		32,4	59		43,3	40	
Citogenética (✓)															
CN	72,5	66,7	0,702	76	70	0,898	52,6	86,4	<b>0,043</b>	69,7	77,3	0,757	69,2	71,4	0,875
CA	27,5	33,3		24	30		47,4	13,6		30,3	22,7		30,8	28,6	
FISH (✓)															
NN/13q-	71,5	77,7	0,998	69	70	0,663	85,7	62,5	0,156	68,5	78,3	0,704	67,9	81,8	0,428
+12/ 11q- /17p-	28,5	22,3		31	22		14,3	37,5		31,5	21,7		32,1	18,2	

M: masculino, F: femenino, SD: desvió estándar, M: mutado, NM: no mutado, CN: cariotipo normal, CA: cariotipo anormal, NN: FISH normal, 13q-: delección 13q14, +12: trisomía 12, 11q-: delección 11q22, 17p-: delección 17p13.

#### 4.3.2.2. Distribución de niveles de expresión en función de los parámetros clínicos

Asimismo, se analizó la distribución de los parámetros clínicos en función de los grupos de alta y baja expresión para los cinco genes en estudio según los puntos de corte previamente establecidos para cada uno de ellos (Tabla 23). Esto permitió observar una distribución similar para ambos grupos en la mayoría de los parámetros evaluados, excepto para el gen *MCL-1* que mostró un aumento significativo en el recuento de blancos así como un mayor porcentaje de linfocitos en el grupo de pacientes con alta expresión ( $p=0,0176$  y  $p=0,004$ , respectivamente).

Tabla 23: Características clínicas de los casos analizados según los grupos de expresión génica.

	<b>Grupo expresión:</b>		<b>SEPT-10</b>	<b>MCL-1</b>	<b>LPL</b>	<b>CLU-1</b>	<b>ADAM-29</b>
	<b>Baja</b>	<b>Alta</b>	<b>&lt;221,5</b>	<b>&lt;6,4</b>	<b>&lt;2,7</b>	<b>&lt;5,7</b>	<b>&lt;18,4</b>
			<b>≥221,5</b>	<b>≥6,4</b>	<b>≥2,7</b>	<b>≥5,7</b>	<b>≥18,4</b>
<b>Nº de pacientes (n)</b>			57 12	43 25	30 27	46 32	39 26
<b>Media recuento leucocitos (<math>\times 10^9/L</math>) (rango)</b>			51,8 (5,2-286) 27,8 (8,2-79)	35,4 (5,2-198) 58 (12,6-286)*	34,5 (5,3-124) 64,8 (5,2-286)	57,9 (5,2-286) 32,4 (8,9-108)	58,9 (5,3-286) 34,4 (5,2-124)
<b>Media porcentaje linfocitos (rango)</b>			75,5 (49-98) 66,2 (54-87)	68,7 (49-91) 78,9 (60-98)†	72,4 (49-96) 75,6 (54-98)	75,3 (49-98) 73,7 (60-91)	74 (49-98) 74 (54-96)
<b>Media recuento plaquetas (<math>\times 10^9/L</math>) (rango)</b>			192,5 (33-378) 273,1 (76-900)	209,5 (33-900) 204,9 (68-378)	196 (39,2-378) 216,4 (33-900)	205 (33-900) 198 (70-378)	190 (39,2-296) 199 (33,1-378)
<b>Media Hb (g/dL) (rango)</b>			12,9 (7,4-15,5) 12,2 (5,6-15,8)	12,9 (5,6-15,8) 12,6 (8,2-15,4)	12,8 (7,4-15,4) 12,6 (5,6-15,8)	12,5 (5,6-15,8) 13,3 (9,6-15,1)	12,6 (7,4-15,1) 13,3 (5,6-15,8)
<b>Media LDH (UI/L) (rango)</b>			383 (120-680) 418 (269-497)	367 (120-526) 397 (185-607)	368 (149-588) 381 (120-607)	374 (149-588) 400 (120-607)	364 (149-526) 413 (120-607)
<b>Media <math>\beta 2M</math> (<math>\mu g/ml</math>) (rango)</b>			2,6 (1,1-3,6) 2,5 (1,2-3,6)	2,6 (1,1-3,7) 2,6 (1,2-6,2)	2,5 (1,1-6,2) 2,7 (1,2-3,8)	2,7 (1,1-6,2) 2,6 (1,1-4)	2,4 (1,1-3,3) 2,7 (1,2-6,2)

Hb: hemoglobina, LDH: lactato dehidrogenasa,  $\beta 2M$ : beta 2 microglobulina. Diferencias significativas entre grupos de baja y alta expresión: † $p=0,004$ , \* $p=0,0176$ .

Simultáneamente, se llevó a cabo el análisis de correlación entre las características clínico-patológicas de los pacientes con los niveles de expresión de los genes evaluados, observándose una asociación positiva entre los niveles del gen *SEPT-10* y la edad de los pacientes ( $p=0,02$ ), así como con el recuento de plaquetas ( $p<0,001$ ), y una correlación negativa con los niveles de hemoglobina ( $p=0,0094$ ) (Figura 37).

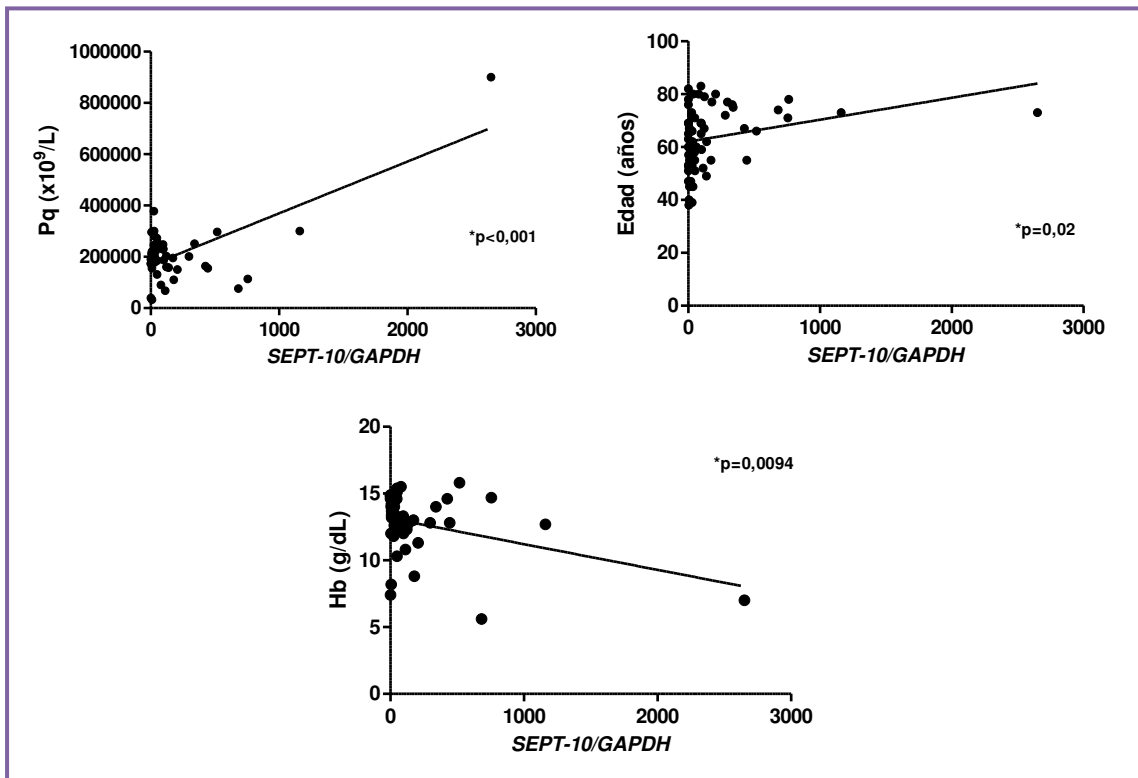


Figura 37: Asociación entre la expresión de *SEPT-10* y la edad, el recuento de plaquetas (Pq) y niveles de hemoglobina (Hb).

Por otra parte, se realizó el análisis de la SLT y la SV global, observándose una mayor SV global en los pacientes con baja expresión de los genes *SEPT-10* y *LPL* (144 meses) respecto de aquellos casos con alta expresión (69 y 67 meses, respectivamente). A su vez, los casos con bajos niveles de *LPL* presentaban una SLT mayor (72 meses) respecto de aquellos con alta expresión (49 meses), aunque sin alcanzar diferencias significativas (Figura 38). Con respecto a los genes *ADAM-29*, *MCL-1* y *CLLU-1*, no se observaron diferencias entre los grupos de expresión.

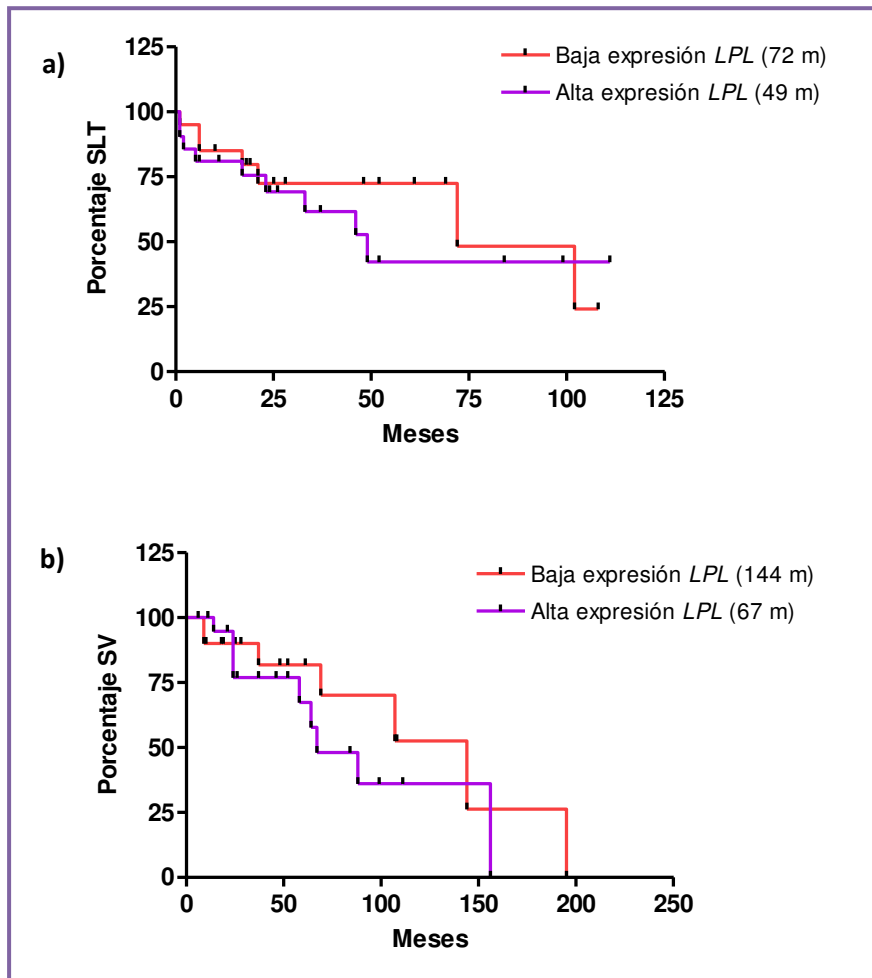


Figura 38: Curvas: a) sobrevida libre de tratamiento (SLT) y b) sobrevida (SV) global, entre grupos de baja y alta expresión de *LPL*.

#### 4.3.3. Correlación con características citogenéticas y de FISH

El análisis del comportamiento de estos genes de acuerdo a las características citogenéticas se efectuó en 57 pacientes. Esto permitió observar una disminución de los niveles de transcritos del gen *ADAM-29* en aquellos casos que presentaron alteraciones estructurales (AE) en el cariotipo, respecto de los pacientes sin alteraciones (SA). Por el contrario, el gen *LPL* mostró una mayor expresión en los pacientes con AE respecto del grupo SA. Sin embargo las diferencias observadas no son aún significativas, posiblemente debido al limitado número de casos con AE en los que fue factible evaluar los niveles de expresión génica. El resto de los genes evaluados mostró perfiles similares en ambos grupos (Figura 39).

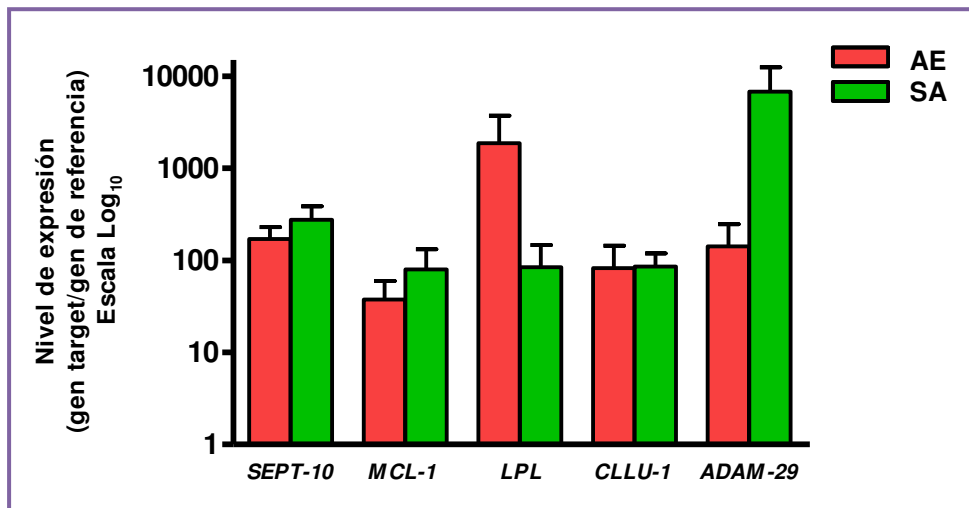


Figura 39: Histograma mostrando los niveles de expresión de los genes evaluados en pacientes con LLC con alteraciones estructurales (AE) o sin alteraciones (SA) detectados por citogenética convencional.

De la misma manera, se realizó el análisis de la distribución de la expresión de los genes *LPL* y *ADAM-29* en los pacientes con alteraciones estructurales (AE) en el cariotipo respecto de aquellos sin alteraciones genómicas o con delección 13q14 por FISH como única anomalía (SA). Si bien las diferencias no fueron significativas, el gen *ADAM-29* presentó niveles menores de transcrito en el grupo con AE respecto de aquellos SA (37,57 vs. 70,04, respectivamente), en tanto que *LPL* mostró una mayor expresión en los pacientes con AE respecto de los SA (2241 vs. 13,68, respectivamente) al igual que el cociente *LPL/ADAM-29* (247,4 vs. 7,56, respectivamente) (Figura 40), considerado de mayor valor predictivo (Oppezzo et al, 2005). El resto de los genes evaluados por PCR cuantitativa (*SEPT-10*, *MCL-1* y *CLLU-1*) no presentaron asociación con las características citogenéticas de los pacientes.

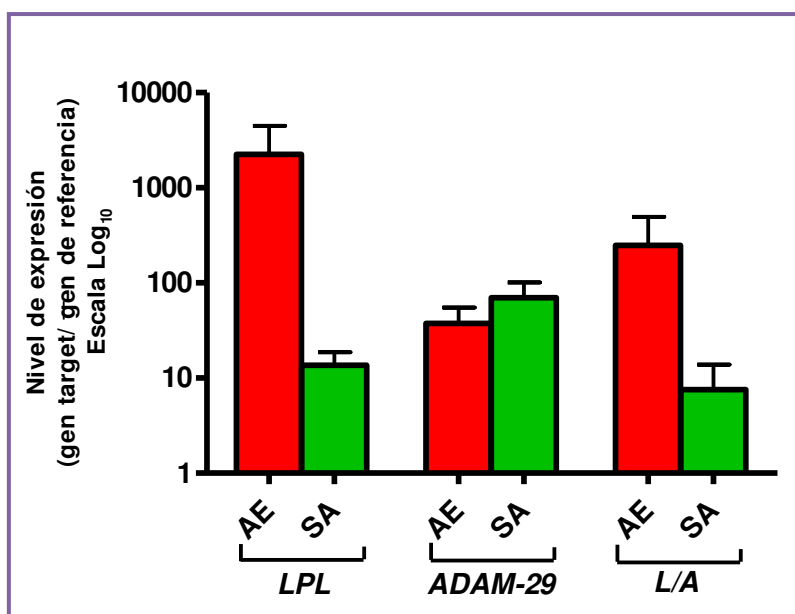


Figura 40: Niveles de expresión de los genes *LPL*, *ADAM-29* y relación *LPL/ADAM-29* (L/A) en los pacientes con alteraciones estructurales (AE) y sin alteraciones (SA).

Con respecto a las alteraciones observadas mediante la técnica de FISH, se pudo efectuar el análisis en un total de 62 pacientes. En este sentido, si bien no se observaron diferencias significativas, se detectó una mayor expresión relativa de *ADAM-29* en aquellos casos con presencia de delección 13q14, respecto de los pacientes sin alteraciones por FISH (NN) o con presencia de otra alteración de las evaluadas mediante esta técnica (trisomía 12, delección 11q22 y/o delección 17p13). Asimismo, también se pudo observar una mayor expresión de *LPL* en este último grupo, respecto de los casos NN y casos con delección 13q14. El resto de los genes analizados no mostraron diferencias entre los grupos de riesgo por FISH (Figura 41).

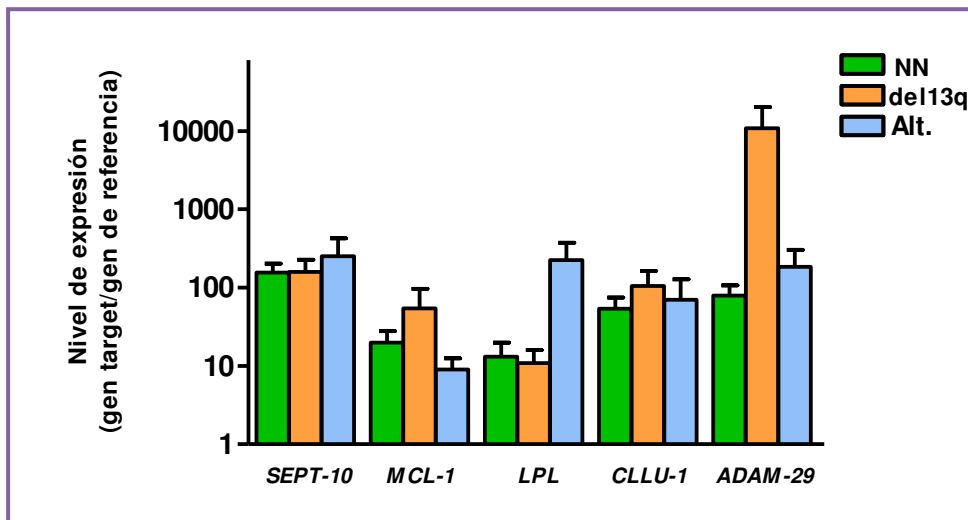


Figura 41: Histograma mostrando los niveles de expresión de los genes evaluados en pacientes sin alteraciones genómicas por FISH (NN), con presencia de delección 13q14 (del13q) y con otras alteraciones (Alt.).

#### 4.3.4. Correlación con perfil mutacional de genes *IGVH*

Asimismo, se evaluaron los niveles de expresión génica según el perfil mutacional de los genes *IGVH* en un total de 59 pacientes. La distribución de los perfiles permitió observar diferencias significativas en la expresión del gen *CLLU-1* en los pacientes con *IGVH* NM respecto de aquellos casos con perfil M ( $p=0,0425$ ) (Figura 42). Si bien el resto de los genes no mostraron diferencias significativas en su expresión entre pacientes M y NM, se detectaron niveles elevados de *LPL* en los casos con LLC NM así como mayores niveles de *MCL-1* en los pacientes M. Por el contrario, tanto *ADAM-29* como *SEPT-10* mostraron niveles similares de expresión en los casos M y NM. Tampoco se detectaron diferencias al analizar el cociente *LPL/ADAM-29* entre los casos con *IGVH* M y NM (datos no mostrados).

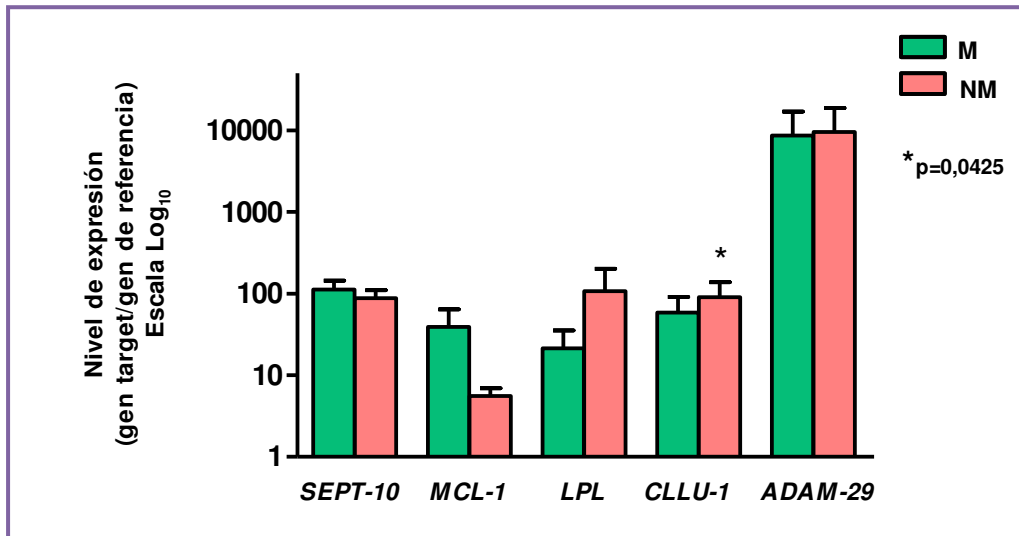


Figura 42: Histograma mostrando los niveles de expresión génica en pacientes con *IGVH* mutado (M) y no mutado (NM). Diferencias significativas: \* $p=0,0425$ .

Finalmente, el análisis de la distribución entre las familias VH mostró una mayor expresión de *MCL-1*, *LPL* y *ADAM-29* en los casos con *IGVH3*, y una distribución similar entre las tres familias para los genes *SEPT-10* y *CLLU-1*, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Figura 43).

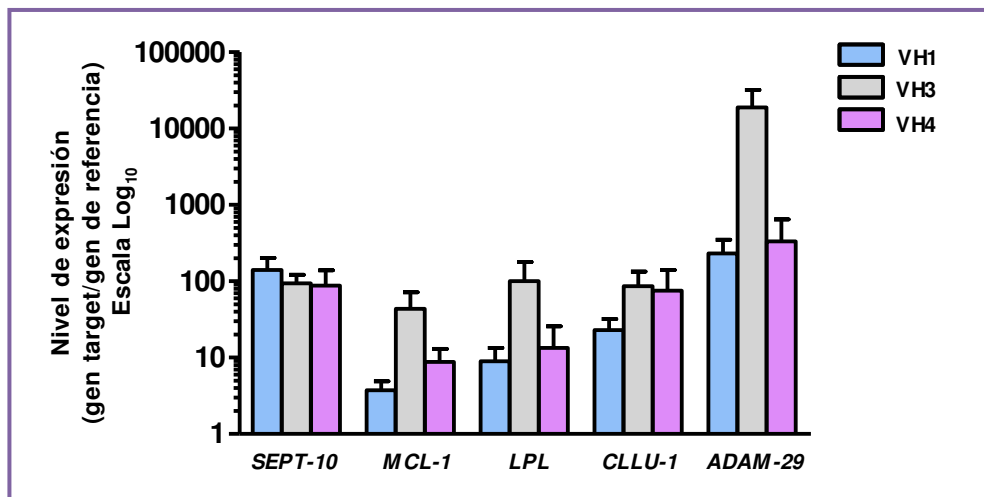


Figura 43: Histograma mostrando la distribución de la expresión de los genes evaluados entre familias VH1, VH3 y VH4.



#### 4.3.5. Discusión

La alta variabilidad clínica de la LLC hace necesaria la búsqueda de nuevos parámetros para predecir la evolución de la enfermedad, siendo los estudios genéticos una herramienta de importancia en este campo. En el presente trabajo se analizaron los perfiles de expresión de los genes *SEPT-10*, *MCL-1*, *LPL*, *CLLU-1* y *ADAM-29* en pacientes con LLC, y se realizó la comparación de los datos obtenidos con los estudios citogenéticos, citomoleculares, el perfil mutacional del gen *IGVH* y las características clínicas de los mismos.

El análisis de los resultados obtenidos mostró una importante heterogeneidad en los perfiles de todos los genes estudiados, que determinó la división de los pacientes en dos grupos de expresión empleando los puntos de corte obtenidos mediante curvas ROC, consistente con lo observado en estudios previos (Nüchel et al, 2006; van Bockstaele et al, 2007; Mansouri et al, 2010; Kienle et al, 2010). Dicha heterogeneidad podría estar relacionada con variaciones en el control de la expresión de los distintos genes en los niveles transcripcional, post-transcripcional y transduccional, o bien influenciada por la acción de citoquinas o mitógenos que inducen proliferación y diferenciación celular, a través de diferentes caminos de señalización. Asimismo, si bien algunos de estos genes mantienen niveles estables de expresión a lo largo de la enfermedad, como *LPL* y *CLLU-1*, otros como *ADAM-29* varían sustancialmente a lo largo del tiempo (Nüchel et al, 2006; van Bockstaele et al, 2007; Buhl et al, 2009).

El estudio del perfil de expresión del gen *MCL-1* permitió detectar una distribución de sexos diferente entre los grupos de baja y alta expresión, con mayoría de varones en el primer grupo, así como un aumento significativo tanto en el recuento de blancos como en el porcentaje de linfocitos en el grupo de alta expresión. Los resultados reportados en la literatura sobre la asociación entre la expresión de este gen y los diferentes marcadores de valor pronóstico en LLC resultan contradictorios. Algunos autores (Veronese et al, 2008; Awan et al, 2009) empleando diferentes abordajes, no encuentran asociación con los parámetros clínicos, pero si observan una SV más corta en los pacientes con alta expresión de *MCL-1*. Por el contrario, Pepper et al (2008) detectan asociación con los marcadores pronóstico de LLC y observan correlación con resistencia a drogas in vitro, rol previamente detectado in vitro e in vivo por Kitada et al (1998) a nivel proteico. En un trabajo más reciente (Kaderi et al, 2010) no se detectaron diferencias entre LLC M y NM, así como tampoco en la SLT y SV global entre los grupos de expresión de *MCL-1*. Resultados contradictorios también se han observado en

mieloma múltiple (Wuilleme-Toumi et al, 2008; Jourdan et al, 2009), situación que podría estar relacionada con la corta vida media de *MCL-1* tanto a nivel proteico como de ARNm que podrían influenciar los resultados obtenidos en cada estudio, pero fundamentalmente, con la compleja regulación post-transcripcional y post-traducciona de este gen, incluyendo variantes de splicing alternativo (Le Guill, et al 2004). Asimismo, en nuestra cohorte detectamos una correlación positiva entre los niveles de expresión de los genes *MCL-1* y *LPL*, asociación no referida previamente en la literatura. Si bien diferentes autores han evaluado estos genes en forma individual, existe muy poca información respecto de la correlación entre los mismos, habiéndose referido solo una correlación positiva entre los niveles de transcrito de *LPL* y *SEPT-10* (Bilban et al, 2006), situación no observada en nuestra serie.

En referencia al gen *ADAM-29*, hay pocos estudios que hayan evaluado la expresión de este gen, considerándose como un predictor de buena evolución en LLC, asociado a *IGVH M* y mayor SV, pero con un impacto adicional a otros marcadores pronóstico (Oppezzo et al, 2005; Van't Veer et al, 2006; Kienle et al, 2010). Particularmente, Nückel et al (2007) encontraron una SLT más larga sólo en pacientes con estadio Binet A, pero no en Binet B y C. En nuestra serie observamos mayor SV global en los casos con alta expresión de *ADAM-29* pero sin alcanzar diferencias significativas, y no encontramos correlación con el estado mutacional de *IGVH*. Por el contrario, detectamos un aumento significativo en la edad en los pacientes con alta expresión y un perfil diferencial respecto de las características citogenéticas y citomoleculares. En este aspecto, nuestros resultados muestran una menor expresión de *ADAM-29* en los casos con anomalías estructurales en el cariotipo respecto de aquellos sin alteraciones, así como una mayor expresión en los pacientes portadores de delección 13q14 como única anomalía. Cabe destacar que nuestros resultados constituyen la primera correlación de la expresión de este gen con las características citogenéticas de la patología, en tanto que los hallazgos a nivel citomolecular sustentan lo observado en el único reporte sobre el tema (Van't Veer et al, 2006), respaldando la asociación con buen pronóstico sugerida previamente. En cuanto a la relación con la edad de los pacientes, la presencia de edad aumentada en los pacientes que sobre-expresan *ADAM-29* sería coincidente con lo observado en nuestros casos con *IGVH M* respecto de aquellos con *IGVH NM*, referido en el capítulo precedente. Asimismo, nuestra cohorte mostró asociación de la expresión de *ADAM-29* con la familia VH3, significativamente relacionada a LLC M. En coincidencia con nuestros datos, el único trabajo que evalúa este aspecto (Van't Veer et al, 2006), encuentra bajos niveles de expresión de este en los pacientes con *IGVH1-69* e *IGVH3-21*, asociados a mal pronóstico.

*SEPT-10* es también un gen muy poco evaluado en LLC (Bilban et al, 2006; Van't Veer et al, 2006; Kienle et al, 2010). Nuestros pacientes mostraron asociación entre los niveles de transcripto y la edad así como en la distribución de los pacientes en los grupos de expresión. Asimismo, el análisis en función de las características clínico-patológicas permitió evidenciar una correlación negativa con los niveles de hemoglobina y positiva con el recuento de plaquetas así como una menor SLT en los casos con alta expresión de *SEPT-10*, respecto de los pacientes con baja expresión, aunque en este último aspecto sin alcanzar diferencias significativas. La correlación con la edad y los parámetros clínicos mencionados no ha sido evaluada en los estudios previos, siendo éstos los primeros datos al respecto. Simultáneamente, no hallamos correlación entre los niveles de expresión de *SEPT-10* y los grupos de riesgo citogenético por FISH, situación coincidente con el único estudio que efectúa este análisis (Van't Veer et al, 2006). La literatura refiere corta SV en los pacientes con alta expresión de *SEPT-10* (Bilban et al, 2006; Van't Veer et al, 2006; Kienle et al, 2010), en tanto que Van't Veer et al (2006) observan que este gen tiene valor predictivo en los casos con estadio A de Binet en el que el 80% de los pacientes presentaban bajos niveles de expresión. Respecto a su asociación con el estado mutacional de *IGVH* existen datos contradictorios, Bilban et al (2006) y Kienle et al (2010) detectan asociación con *IGVH* NM, en tanto que Van't Veer et al (2006) refiere correlación con *IGVH* M. En nuestra serie encontramos una distribución similar en ambos grupos. Por otra parte, Van't Veer et al (2006) observan asociación de *SEPT-10* con el uso de los segmentos *IGVH3-21* (67% de los casos) e *IGVH 3-34* (91% de los casos). Un estudio posterior (Benedetti et al, 2008) refiere bajos niveles de expresión de *SEPT-10* en los pacientes con *IGVH3-21*, sugiriendo la incapacidad de este gen para discriminar este subset de pacientes, asociado a mal pronóstico.

*CLLU-1* constituye el primer gen sobre-expresado específicamente en células de LLC (Buhl et al, 2006a), cuya estabilidad a lo largo de la enfermedad lo ubica como un marcador de interés en la patología (Buhl et al, 2009). En nuestra serie se observó una mayor proporción de pacientes con LLC NM en el grupo que sobre-expresa dicho gen así como un incremento significativo en los niveles de expresión de *CLLU-1* en estos casos. Estos resultados son coincidentes con los previamente observados en la literatura (Buhl et al, 2006b; Chen et al, 2007; Josefsson et al, 2007), ubicándolo como un parámetro de valor pronóstico adverso en LLC. Nuestros datos no muestran asociación con las alteraciones cariotípicas ni con la distribución de rearrreglos por FISH, resultados estos últimos coincidentes con lo observado por Chen et al (2007). Por otra parte, no detectamos diferencias significativas en la SV de los pacientes. Distintos estudios (Josefsson et al, 2007; Kaderi et al, 2011; Gonzalez et al, 2012)

encuentran asociación entre la SV global y SLT y los niveles de expresión de *CLLU-1*, particularmente en pacientes menores de 70 años, planteando su utilidad como factor pronóstico fundamentalmente en este grupo etario. No obstante, un trabajo muy reciente en más de 500 pacientes (Gonzalez et al, 2012), define que *CLLU-1* no constituye un predictor independiente de SV en los pacientes con LLC, pudiendo ayudar a refinar el pronóstico en pacientes jóvenes y en casos con LLC M.

En los últimos años *LPL* ha surgido el marcador molecular más consistente en LLC (Oppezco et al, 2005; Heintel et al, 2005; Mansouri et al, 2010; Kaderi et al, 2010). En lo que respecta a nuestra serie resulta de importancia destacar la mayor expresión del mismo en los casos con anomalías estructurales respecto de aquellos sin alteraciones cariotípicas, así como en función del cociente *LPL/ADAM-29*, considerado de mayor valor predictivo (Oppezco et al, 2005). Este aspecto no había sido analizado previamente en la literatura, y sustenta el carácter de marcador de mal pronóstico de este gen, siendo interesante profundizar estos estudios en el marco de protocolos de tratamiento. Este aspecto resulta de particular interés dado que la presencia de pérdidas parciales o totales del brazo corto del cromosoma 8, lugar donde se ubica el gen *LPL* (8p22), podrían influenciar la evaluación de su expresión. De hecho, dos de nuestros pacientes con pérdida de 8p en su cariotipo (casos 5 y 29, Tablas 8 y 9; Capítulo I) presentaron bajos niveles de transcripto, lo que ubicaría a estos casos en el grupo de buen pronóstico cuando, por sus otros parámetros, corresponden a pronóstico adverso y se comportaron como tales. Asimismo, al efectuar la correlación con los resultados obtenidos por FISH, si bien no se detectaron diferencias significativas, se observó una mayor expresión de *LPL* en los casos con alteraciones genómicas respecto de aquellos sin anomalías y/o con delección 13q14. La literatura muestra datos contradictorios en este aspecto, mientras algunos autores (Heintel et al, 2005; Van't Veer et al, 2006; Van Bockstaele et al, 2007; Mansouri et al, 2010; Kaderi et al, 2010) refieren mayor expresión de *LPL* en pacientes con delección de 17p y 11q, otros estudios no encuentran asociación entre la expresión génica y los rearrreglos genómicos detectados por FISH (Nikitin et al, 2007; Nückel et al, 2007). Por otra parte, en coincidencia con datos de la literatura (Heintel et al, 2005; Nückel et al, 2007; Van Bockstaele et al, 2007; Kaderi et al, 2010; Mansouri et al, 2010) observamos una mayor expresión de *LPL* en los casos con *IGHV* NM, así como una SV global y SLT más corta en los casos con alta expresión de este gen.

Estos hallazgos reflejan, sin duda, la alta heterogeneidad de la patología en estudio e indican que estos marcadores moleculares no resultan subrogantes satisfactorios de los factores pronóstico ya establecidos, pero pueden ser usados como marcadores adicionales

para el screening de riesgo genético. Esto pone de manifiesto la importancia de lograr combinaciones de marcadores que permitan establecer un score de evaluación, tendiente a definir con mayor certeza la evolución clínica de los pacientes en estadios iniciales de la enfermedad. Al presente existen algunos intentos al respecto pero ninguno totalmente conclusivo ni de utilización en la práctica clínica. Entre ellos encontramos la combinación de *LPL*, *ZAP-70* y *CD38* (Nüchel et al, 2006), la asociación de baja expresión de dos microRNAs, *miR-29c*, *miR-223*, con *ZAP-70* y *LPL* (Stamatopoulos et al, 2009), la combinación de *LPL* y *CD38* propuesta por Kaderi et al (2010), los grupos de riesgo en función de la asociación del estado mutacional de *IGVH*, la delección de *ATM* y el número de aberraciones cromosómicas (Haferlach et al, 2010), y la comparación de dos modelos de expresión de múltiples genes, uno restrictivo a la expresión génica y el otro en combinación con parámetros clínicos, obteniendo mejores resultados con este último (Kienle et al, 2010).

En lo referente a nuestro estudio, cabe destacar la correlación de las características citogenéticas de los pacientes con la expresión de *ADAM-29* y *LPL*, así como con el cociente *LPL/ADAM-29*, aspecto no evaluado previamente en la literatura, y que resulta de interés teniendo en cuenta la importancia de las alteraciones cariotípicas en el pronóstico de la patología, y que debe ser confirmado mediante el análisis de un número mayor de pacientes y en el marco de un protocolo de tratamiento.

Concluyendo, estos estudios resultan de importancia en la profundización de la caracterización biológica y la comprensión de los mecanismos patogénicos de la LLC, así como también en un futuro, en la definición de tratamientos innovativos con nuevos targets moleculares que puedan beneficiar a pacientes específicos.

## **5. Conclusiones**

## Conclusiones

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

- El análisis citogenético de nuestra serie de pacientes hizo factible identificar 35 alteraciones estructurales nuevas, no descritas previamente en la literatura, siendo el cromosoma 8 el más frecuentemente implicado, particularmente en pérdidas de 8p21-pter, región genéticamente inestable y de significado clínico adverso.
- La comparación de los rearrreglos involucrados en anomalías estructurales nuevas y recurrentes permitió observar una frecuencia significativamente mayor de translocaciones y rearrreglos más complejos en el primer grupo y de deleciones en el segundo, indicando un alto grado de inestabilidad cromosómica en los pacientes con rearrreglos estructurales nuevos.
- El análisis del seguimiento clínico mostró una menor SV global y SLT en los pacientes con anomalías estructurales y con cariotipos complejos respecto de aquellos sin alteraciones, sustentando el valor pronóstico de estas anomalías en LLC, y reforzando la importancia del estudio citogenético en esta patología.
- La evaluación de las familias *IGVH* permitió caracterizar por primera vez el estado mutacional así como la distribución y uso de estos genes en pacientes argentinos con LLC, observándose un comportamiento similar al de los países Occidentales (*IGVH3>IGVH1>IGVH4*), con diferencias significativas respecto de Asia y Brasil, que reflejan variaciones en el background genético y/o la influencia de factores ambientales.
- Los segmentos *IGVH4-59*, *IGVH3-72* e *IGVH2-5* se encontraron sobre-expresados en nuestra cohorte, en tanto que *IGVH4-34* se observó sub-representado, con diferencias significativas respecto de otras series publicadas. Asimismo, el segmento *IGVH3-21*, asociado a mal pronóstico, presentó una frecuencia de 5,4%, mayor que la correspondiente a la región Mediterránea.
- Los pacientes con LLC NM presentaron mayor número de alteraciones por cariotipo así como un porcentaje más alto de translocaciones desbalanceadas, en tanto que aquellos con LLC M mostraron asociación significativa con la presencia de deleción

13q14 por FISH como única alteración, sustentando el valor pronóstico de estos parámetros.

- La gran heterogeneidad observada en los perfiles de expresión de los genes *SEPT-10*, *MCL-1*, *LPL*, *CLLU-1* y *ADAM-29*, refleja la variabilidad característica de la LLC, pudiendo estar relacionada con variaciones en el control de la expresión en los niveles transcripcional, post-transcripcional y traduccional.
- La correlación de los niveles de expresión de estos genes con las características citogenéticas de los pacientes muestra, por primera vez, un perfil diferencial con disminución de la expresión de *ADAM-29* y aumento de los niveles de transcripto de *LPL*, así como del cociente *LPL/ADAM-29*, en los casos con anomalías estructurales respecto de aquellos sin alteraciones cariotípicas.
- El gen *ADAM-29* también mostró mayor expresión en los pacientes portadores de deleción 13q14 como única anomalía, confirmando lo observado en un único reporte de la literatura, y sustentando la asociación con buen pronóstico propuesta para el mismo.
- El análisis de *SEPT-10* y *MCL-1* presentó asociación con parámetros clínicos de mal pronóstico, en tanto que los niveles de expresión de *CLLU-1* mostraron un incremento significativo en los pacientes con *IGVH* NM, resultados que sustentan datos previamente publicados.
- Estos hallazgos ubican a estos marcadores moleculares como factores pronóstico adicionales, de importancia para el screening de riesgo genético, e indican la necesidad de lograr combinaciones de marcadores que permitan establecer con mayor certeza la evolución clínica de los pacientes en estadios iniciales de la enfermedad.
- Finalmente, consideramos que estos estudios pueden constituir un aporte para la profundización de la caracterización biológica y la comprensión de los mecanismos patogénicos de la LLC, así como también, en un futuro, en la definición de decisiones terapéuticas específicas.



## **6. Bibliografía**

### **Bibliografia:**

- AbdelSalam M, El Sissy A, Samra MA, et al. The impact of trisomy 12, retinoblastoma gene and P53 in prognosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematology* 2008; 13:147-53.
- Abramenko I, Bilous N, Kryachok I, et al. IGHV3-21 gene expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia in Ukraine. *Exp Oncol* 2007; 29: 226-30.
- Adachi M, Tsujimoto Y. Potential Z-DNA elements surround the breakpoints of chromosome translocation within the 5' flanking region of bcl-2 gene. *Oncogene* 1990; 5: 1653-7.
- Agarwal S, Daley GQ. AID for reprogramming. *Cell Res* 2010; 20: 253-5.
- Albesiano E, Messmer BT, Damle RN, et al. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. *Blood* 2003; 102:3333-9.
- Alfarano A, Indraccolo S, Circosta P, et al. An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93: 2327-35.
- Anastasi J, Le Beau MM, Vardiman JW, et al. Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method. *Blood* 1992; 79: 1796-801.
- Aoun P, Blair HE, Smith LM, et al. Fluorescence in situ hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 1595-603.
- Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Tsezou A, et al. Report of novel chromosomal abnormalities in a series of 130 chronic lymphocytic leukemia patients studied by classic cytogenetic analysis. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 2084-7.
- Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Gaitatzi M, et al. Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica* 2008; 93: 473-4.
- Auer RL, Dighiero G, Goldin LR, et al. Trinucleotide repeat dynamic mutation identifying susceptibility in familial and sporadic chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 136: 73-9.
- Austen B, Powell JE, Alvi A, et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 2005; 106: 3175-82.
- Austen B, Skowroska A, Baker C, et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing 11q deletion. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5448-57.
- Avena S, Via M, Ziv E, et al. Heterogeneity in genetic admixture across different regions of Argentina. *PLoS One* 2012; 7: e34695.

- Awan FT, Kay NE, Davis ME, et al. Mcl-1 expression predicts progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia patients treated with pentostatin, cyclophosphamide, and rituximab. *Blood* 2009; 113: 535-7.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116:281-97.
- Beà S, López-Guillermo A, Ribas M, et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol* 2002; 161: 957-68.
- Beà S, Colomo L, López-Guillermo A, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3498-506.
- Beà S, Campo E. Secondary genomic alterations in non-Hodgkin's lymphomas: tumor-specific profiles with impact on clinical behavior. *Haematologica* 2008; 93: 641-5.
- Benedetti D, Bomben R, Dal-Bo M, et al. Are surrogates of IGHV gene mutational status useful in B-cell chronic lymphocytic leukemia? The example of Septin-10. *Leukemia* 2008; 22: 224-6.
- Berkova A, Zemanova Z, Trneny M, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia studied by interphase fluorescence in-situ hybridization. *Neoplasma* 2009; 56: 455-8.
- Bezares RF, Slavutsky I, Gabus R, et al. Leucemia Linfocítica Crónica, en: "Manual de oncohematología. Las neoplasias linfoides", Norma Tartas, Marta Zerga, Julio Sánchez Ávalos, eds. pp. 27-48, 2009.
- Bianchi S, Moreno P, Landoni AI, et al. Immunoglobulin heavy chain V-D-J gene rearrangement and mutational status in Uruguayan patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2010; 51: 2070-8.
- Bilban M, Heintel D, Scharl T, et al. Deregulated expression of fat and muscle genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia with high lipoprotein lipase expression. *Leukemia* 2006; 20: 1080-8.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.
- Bomben R, Dal Bo M, Capello D, et al. Comprehensive characterization of IGHV3-21-expressing B-cell chronic lymphocytic leukemia: an Italian multicenter study. *Blood* 2007; 109: 2989-98.
- Bomben R, Dal Bo M, Capello D, et al. Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukemia with stereotyped B cell receptor: results from Italian multicentre study. *Br J Haematol* 2009; 144: 492-506.
- Bomben R, Dal-Bo M, Benedetti D, et al. Expression of mutated IGHV3-23 genes in chronic lymphocytic leukemia identifies a disease subset with peculiar clinical and biological features. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 620-8.

- Boonstra JG, van Lom K, Langerak AW, et al. CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70: 136-41.
- Boultonwood J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma. *J Clin Pathol* 2001; 54: 512-6.
- Brynes RK, McCourty A, Sun NC, Koo CH. Trisomy 12 in Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 199-203.
- Buggins AG, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia Research* 2010; 34: 837-42.
- Buhl AM, Jurlander J, Jørgensen FS, et al. Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006a; 107: 2904-11.
- Buhl AM, Jurlander J, Geisler CH, et al. CLLU1 expression levels predict time to initiation of therapy and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2006b; 76: 455-64.
- Buhl AM, Novotny GW, Josefsson P, et al. The CLLU1 expression level is a stable and inherent feature of the chronic lymphocytic leukemia clone. *Leukemia* 2009; 23: 1182-6.
- Buhl AM, James DF, Neuberg D, et al. Analysis of CLLU1 expression levels before and after therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 2011; 86: 405-11.
- Bullrich F, Rasio D, Kitada S, et al. ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1999; 59: 24-7.
- Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood* 1999; 94: 3658-67.
- Burger JA, Tsukada N, Burger M, et al. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000; 96: 2655-63.
- Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009; 114: 3367-75.
- Burger JA. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 424-30.
- Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 96-103.
- Bürkle A, Niedermeier M, Schmitt-Gräff A, et al. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 110: 3316-25.

- Busson-Le Coniat M, Salomon-Nguyen F, Dastugue N, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosome 1 abnormalities in hematopoietic disorders: rearrangements of DNA satellite II and new recurrent translocations. *Leukemia* 1999; 13: 1975-81.
- Cahill N, Sutton LA, Jansson M, et al. IGHV3-21 gene frequency in a Swedish cohort of patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma, Myeloma & Leuk* 2012; 12: 201-6.
- Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123: 380-8.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15524-9.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-801.
- Calin GA, Pekarsky Y, Croce CM. The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 425-37.
- Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 5166-71.
- Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy S, Levy R. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region repertoire. *Mol Immunol* 1992; 29: 193-203.
- Campbell KJ, Bath ML, Turner ML, et al. Elevated Mcl-1 perturbs lymphopoiesis, promotes transformation of hematopoietic stem/progenitor cells, and enhances drug resistance. *Blood* 2010; 116: 3197-207.
- Capello D, Guarini A, Berra E, et al. Evidence of biased immunoglobulin variable gene usage in highly stable B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 1941-7.
- Capello D, Zucchetto A, Degan M, et al. Immunophenotypic characterization of IGHV3-72 B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Leuk Res* 2006; 30: 1197-9.
- Caporaso N, Marti GE, Goldin L. Perspectives on familial chronic lymphocytic leukemia: genes and the environment. *Semin Hematol* 2004; 41: 201-6.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136: 642-55.
- Catera R, Silverman GJ, Hatzi K, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Mol Med* 2008; 14: 665-74.
- Catovsky D. The search for genetic clues in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 1997; 39: S5-11.

- Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370: 230-9.
- Cavazzini F, Cuneo A, de Angeli C, et al. Abnormalities of chromosomes 1p34-36, 4p16, 4q35, 9q11-32 and +7 represent novel recurrent cytogenetic rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2004; 45: 1197-203.
- Cavazzini F, Hernandez JA, Gozzetti A, et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Brit J Haematol* 2008; 142: 529-37.
- Cavazzini F, Rizzotto L, Sofritti O, et al. Clonal evolution including 14q32/IGH translocations in chronic lymphocytic leukemia: analysis of clinicobiologic correlations in 105 patients. *Leuk Lymphoma* 2012; 53: 83-8.
- Cerretini R, Chena C, Giere I, et al. Structural aberrations of chromosomes 17 and 12 in chronic B-cell disorders. *Eur J Haematol* 2003; 71: 433-8.
- Chang YH, Park J, Kim HC, et al. Korean patients with chronic lymphocytic leukemia show the similar types of chromosomal aberrations as those in Europe and North America. *Leuk Res* 2006; 30: 695-9.
- Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 4609-14.
- Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 105: 2036-41.
- Chen L, Li J, Zheng W, Zhang Y, et al. The prognostic evaluation of CLLU1 expression levels in 50 Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 1785-92.
- Chen L, Zhang Y, Zheng W, et al. Distinctive IgVH gene segments usage and mutation status in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2008; 32: 1491-8.
- Chena C, Cerretini R, Noriega MF, et al. Cytogenetic, FISH, and molecular studies in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia with karyotypic evolution. *Eur J Haematol* 2002; 69: 309-14.
- Chena C, Sánchez Ávalos J, Bezares R, et al. Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia. Cytogenetic, FISH and clinical studies. *Eur J Haematol* 2008; 81: 94-9.
- Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002; 116: 142-50.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352: 804-15.

- Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 2011; 117: 1781-91.
- Chu CC, CATERA R, HATZI K, et al. Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood* 2008; 112: 5122-9.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13944-9.
- Clifford R, Schuh A. State-of-the-Art Management of Patients Suffering from Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncology* 2012; 6 165–78.
- Coignet L, Berthéas MF, Vasselon C, et al. Trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: interphase study by in situ hybridization in 75 patients. *Nouv Rev Fr Hematol* 1993; 35: 129-34.
- Paris Conference (1971): Standardization in human cytogenetics. *Cytogenetics* 1972; 11: 317-62.
- Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-75.
- Crossen PE, Horn HL. Origin of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 28: 185-6.
- Cuneo A, Rigolin GM, Bigoni R, et al. Chronic lymphocytic leukaemia with 6q- shows distinct haematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 2004; 18: 476-83.
- D'Arena G, Musto P, Nunziata G, et al. CD69 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a new prognostic marker?. *Haematologica* 2001; 86: 995-6.
- Dal-Bo M, Bertoni F, Forconi F, et al. Intrinsic and extrinsic factors influencing the clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia: prognostic markers with pathogenetic relevance. *J Transl Med* 2009; 7: 76-90.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1840-7.
- Damle RN, Batliwalla FM, Ghitto F, et al. Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. *Blood* 2004; 103: 375-82.
- Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, et al. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005; 105: 3042-50.
- Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007; 110: 4012-21.
- Del Poeta G, Del Principe MI, Zucchetto A, et al. CD69 is independently prognostic in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive clinical and biological profiling study. *Haematologica* 2012; 97: 279-87.

- Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2008; 40: 1204-10.
- Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detects chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgV<sub>H</sub> status, and CD38 expression. *Blood* 2006; 108: 3152-60.
- Dicker F, Herholz H, Schnittger S, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukaemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009; 23: 117-24.
- Dighiero G. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia* 2003; 17: 2385-91.
- Dighiero G. CLL biology and prognosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005: 278-84.
- Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Lancet* 2008; 371: 1017-29.
- Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89: 2516-22.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-16.
- Donisi PM, Di Lorenzo N, Riccardi M, et al. Pattern and distribution of immunoglobulin V<sub>H</sub> gene usage in a cohort of B-cell patients from a northeastern region of Italy. *Diag Mol Pathol* 2006; 15: 206-15.
- Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, et al. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 2007; 139: 809-19.
- Dühren-von Minden M, Übelhart R, Schneider D, et al. Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature* 2012; 489: 309-12.
- Duke VM, Gandini D, Sherrington PD, et al. V<sub>H</sub> gene usage differs in germline and mutated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2003; 88: 1259-71.
- Efremov DG, Gobessi S, Longo PG. Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun Rev* 2007; 7: 102-8.
- Einhorn S, Burvall K, Juliusson G, et al. Molecular analyses of chromosome 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1989; 3: 871-4.
- Escudier SM, Pereira-Leahy JM, Drach JW, et al. Fluorescent in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 81: 2702-7.
- Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011; 208: 1389-401.



- Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102: 1515-25.
- Fegan C, Robinson H, Thompson P, et al. Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia* 1995; 9: 2003-8.
- Ferreira BI, García JF, Suela J, et al. Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia. *Haematologica* 2008; 93: 670-9.
- Fitchett M, Griffiths MJ, Oscier DG, et al. Chromosome abnormalities involving band 13q14 in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 24: 143-50.
- Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, et al. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion. *Br J Haematol* 2008; 143: 532-6.
- Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4944-51.
- Gandhi V, Balakrishnan K, Chen LS. Mcl-1: the 1 in CLL. *Blood* 2008; 112: 3538-40.
- García-Muñoz R, Galiacho VR, Llorente L. Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Ann Hematol* 2012; 91: 981-96.
- Garg R, Wierda W, Ferrajoli A, et al. The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2012; 118: 3531-7.
- Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, et al. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111: 865-73.
- Geisler CH, Philip P, Christensen BE, et al. In B-cell chronic lymphocytic leukaemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients. *Leuk Res* 1997; 21: 1011-23.
- Germain M, Duronio V. The N terminus of the anti-apoptotic BCL-2 homologue MCL-1 regulates its localization and function. *J Biol Chem* 2007; 282: 32233-42.
- Ghia P, Strola G, Granziero L, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1403-13.
- Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005; 105: 1678-85.
- Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med* 2008; 264: 549-62.
- Ghiolo S, Soler J, Greenway S, et al. Brazilian population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 111-6.

- Ghiotto F, Fais F, Valetto A, et al. Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 2004; 113: 1008-16.
- Giglio S, Calvari V, Gregato G, et al. Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 276-85.
- Glassman AB, Hayes KJ. The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 158: 88-91.
- Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, et al. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* 2007; 109: 2032-9.
- Goldin LR, Slager SL. Familial CLL: genes and environment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 339-45.
- Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, et al. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2009; 94: 647-53.
- Gonzalez D, Martinez P, Wade R, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2223-9.
- Gonzalez D, Else M, Wren D, et al. CLLU1 expression has prognostic value in CLL after first-line therapy in younger patients and those with mutated IGHV genes. *Haematologica* 2012; doi:10.3324/haematol.2012.070201.
- Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, et al. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005; 105: 4807-12.
- Grubor V, Krasnitz A, Troge JE, et al. Novel genomic alterations and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia revealed by representational oligonucleotide microarray analysis (ROMA). *Blood* 2009; 113: 1294-1303.
- Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, et al. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011; 96: 1161-9.
- Gurrieri C, McGuire P, Zan H, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells can undergo somatic hypermutation and intracлонаl immunoglobulin V(H)DJ(H) gene diversification. *J Exp Med* 2002; 196: 629-39.
- Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study of 506 cases analyzed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV<sub>H</sub> status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007; 21: 2442-51.
- Haferlach C, Dicker F, Weiss T, et al. Toward a comprehensive prognostic scoring system in chronic lymphocytic leukemia based on a combination of genetic parameters. *Genes Chrom Cancer* 2010; 49: 851-9.
- Hall PA, Jung K, Hillan KJ, Russell SE. Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol* 2005; 206: 269-78.

- Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93: 1732-7.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446-56.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, et al. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1848-54.
- Hamblin TJ, Davis ZA, Oscier DG. Determination of how many immunoglobulin variable region heavy chain mutations are allowable in unmutated chronic lymphocytic leukaemia - long-term follow up of patients with different percentages of mutations. *Br J Haematol* 2008; 140: 320-3.
- Hancer VS, Kose M, Diz-Kucukkaya R, et al. Activation-induced cytidine deaminase mRNA levels in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011; 52: 79-84.
- Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. Alan R. Liss, New York, 1995
- Heintel D, Kroemer E, Kienle D, et al; German CLL Study Group. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2004; 18: 756-62.
- Heintel D, Kienle D, Shehata M, et al. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005; 19: 1216-23.
- Hernández JA, Rodríguez AE, González M, et al. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica* 2009; 94: 364-71.
- Hidalgo PC, Bengochea M, Abilleira D, et al. Genetic admixture estimate in the Uruguayan population based on the loci LDLR, GYPA, HBGG, GC and D7S8. *Int J Hum Genet* 2005; 5: 217-22.
- Hojjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Sharifian RA, et al. Analysis of the immunoglobulin heavy chain variable region gene expression in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2007; 48: 109-16.
- Hojjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Razavi SM, et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage and mutational status of the leukemic B cells in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Sci* 2009; 100: 2346-53.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7276-80.
- Holmes RS, Vandeberg JL, Cox LA. Comparative studies of vertebrate lipoprotein lipase: a key enzyme of very low density lipoprotein metabolism. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2011; 6: 224-34.

- Houlston RS, Catovsky D. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2008; 3: 221-5.
- Houlston RS, Sellick G, Yuille M, et al. Causation of chronic lymphocytic leukemia--insights from familial disease. *Leuk Res* 2003; 27: 871-6.
- Hu LH, Chen FH, Li YR, Wang L. Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3514-7.
- Huh YO, Schweighofer CD, Ketterling RP, et al. Chronic lymphocytic leukemia with t(14;19)(q32;q13) is characterized by atypical morphologic and immunophenotypic features and distinctive genetic features. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 686-96.
- Hui D, Satkunam N, Al Kaptan M, et al. Pathway-specific apoptotic gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia and follicular lymphoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 1192-202.
- Ibrahim S, Keating M, Do KA, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98: 181-6.
- Ibrahim S, Jilani I, O'Brien S, et al. Clinical relevance of the expression of the CD31 ligand for CD38 in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2003; 97: 1914-9.
- Ikematsu W, Ikematsu H, Okamura S, et al. Surface phenotype and Ig heavy-chain gene usage in chronic B cell leukemias: expression of myelomonocytic surface markers in CD5-chronic B cell leukemia. *Blood* 1994; 83: 2602-10.
- Irons RD, Le A, Bao L, et al. Characterization of chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL) in Shanghai, China: molecular and cytogenetic characteristics, IgV gene restriction and hypermutation patterns. *Leuk Res* 2009; 33: 1599-1603.
- ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. LG Shaffer, ML Slovak, LJ Campbell, eds. Karger, Basel; 2011.
- Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, et al. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2005; 42: 1329-38.
- Jaksic O, Paro MM, Kardum Skelin I, et al. CD38 on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells has higher expression in lymph nodes than in peripheral blood or bone marrow. *Blood* 2004; 103: 1968-9.
- Janssens A, Van Roy N, Poppe B, et al. High-risk clonal evolution in chronic B-lymphocytic leukemia: single-center interphase fluorescence in situ hybridization study and review of the literature. *Eur J Haematol* 2012; 89: 72-80.
- Josefsson P, Geisler CH, Leffers H, et al. CLLU1 expression analysis adds prognostic information to risk prediction in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 4873-9.
- Jourdan M, Rème T, Goldschmidt H, et al. Gene expression of anti- and pro-apoptotic proteins in malignant and normal plasma cell. *Br J Haematol* 2009; 145: 45-58.

- Juliusson G, Gahrton G. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 45: 143-60.
- Juliusson G, Oscier DG, Gahrton G, for the International Working Party on chromosomes in CLL (IWCCLL). Cytogenetics findings and survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Second IWCCLL compilation of data on 662 patients. *Leuk Lymph* 1991; 5: 21-5.
- Kaderi MA, Mansouri M, Zainuddin N, et al. Lack of association between the MDM2 promoter polymorphism SNP309 and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2010; 34: 335-9.
- Kaderi MA, Kanduri M, Buhl AM, et al. LPL is the strongest prognostic factor in a comparative analysis of RNA-based markers in early chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011; 96: 1153-60.
- Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E, et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 1997; 42: 369-77.
- Kastan MB, Lim DS. The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 179-86.
- Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 1998; 92: 1165-71.
- Kienle D, Benner A, Läufler C, et al. Gene expression factors as predictors of genetic risk and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2010; 95: 102-9.
- Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 376-85.
- Kitada S, Andersen J, Akar S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 1998; 91: 3379-89.
- Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 106: 995-1004.
- Kitamura E, Su G, Sossey-Alaoui K, et al. A transcription map of the minimally deleted region from 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia as defined by large scale sequencing of the 650 kb critical region. *Oncogene* 2000; 19: 5772-80.
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1625-38.
- Klein U, Lia M, Crespo M, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010; 17: 28-40.
- Knauf WU, Ehlers B, Bisson S, Thiel E. Serum levels of interleukin-10 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; 86: 4382-3.

- Knauf WU, Ehlers B, Mohr B, et al. Prognostic impact of the serum levels of soluble CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1997; 89: 4241-2.
- Koiso H, Yamane A, Mitsui T, et al. Distinctive immunoglobulin VH gene usage in Japanese patients with CLL. *Leukemia Res* 2006; 30: 272-6.
- Kolset SO, Salmivirta M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56: 857-70.
- Kröber A, Seiler T, Benner A, et al. VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1410-6.
- Kröber A, Bloehdorn J, Hafner S, et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 969-75.
- Kuraoka M, Holl TM, Liao D, et al. Activation-induced cytidine deaminase mediates central tolerance in B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 11560-5.
- Lalonde JP, Lim R, Ingley E, et al. HLS5, a novel RBCC (ring finger, B box, coiled-coil) family member isolated from a hemopoietic lineage switch, is a candidate tumor suppressor. *J Biol Chem* 2004; 279: 8181-9.
- Lanham S, Hamblin T, Oscier D, et al. Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101: 1087-93.
- Lefranc M-P. Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes. *Exp Clin Immunogenet* 2001; 18: 100-16.
- Le Gouill S, Podar K, Harousseau JL, Anderson KC. Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma. *Cell Cycle* 2004; 3: 1259-62.
- Lin K, Manocha S, Harris RJ, et al. High frequency of p53 dysfunction and low level of VH mutation in chronic lymphocytic leukemia patients using the VH3-21 gene segment. *Blood* 2003; 102: 1145-6.
- Linet MS, Schubauer-Berigan MK, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol* 2007; 139: 672-86.
- Linsley PS, Schelter J, Burchard J, et al. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 2240-52.
- Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, et al. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008; 111: 846-55.
- López C, Delgado J, Costa D, et al. Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 881-9.
- Magnac C, Porcher R, Davi F, et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 2003; 17: 133-7.
- Maizels N. Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 23-46.

- Malavasi F, Funaro A, Roggero S, et al. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today* 1994; 15: 95-7.
- Maloum K, Davi F, Merle-Béral H, et al. Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2000; 96: 377-9.
- Maloum K, Settegrana C, Chapiro E, et al. IGHV gene mutational status and LPL/ADAM29 gene expression as clinical outcome predictors in CLL patients in remission following treatment with oral fludarabine plus cyclophosphamide. *Ann Hematol* 2009; 88: 1215-21.
- Mansouri M, Sevov M, Fahlgren E, et al. Lipoprotein lipase is differentially expressed in prognostic subsets of in chronic lymphocytic leukemia but displays invariably low catalytic activity. *Leuk Res* 2010; 34: 301-6.
- Marcos-Gragera R, Allemani C, Tereanu C, et al. Survival of European patients diagnosed with lymphoid neoplasms in 2000-2002: results of the HAEMACARE project. *Haematologica* 2011; 96: 720-8.
- Marincevic M, Cahill N, Gunnarsson R, et al. High-density screening reveals a different spectrum of genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia patients with 'stereotyped' IGHV3-21 and IGHV4-34 B-cell receptors. *Haematologica* 2010; 95: 1519-25.
- Marquez M, Palmer L, Caffaro MJ, et al. Leucemia linfocítica crónica, en: "Guía Diagnóstica Terapéutica", Sociedad argentina de Hematología, pp 95-121, 2011.
- Marquez ME, Deglesne PA, Lopez JL, et al. Unexpectedly high frequency of European parentage in Venezuelan patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 2012; 53: 235-241.
- Matos DM, Falcão RP. Monoclonal B-cell lymphocytosis: a brief review for general clinicians. *Sao Paulo Med J* 2011; 129: 171-5.
- Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, et al. The complex nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 1998; 188: 2151-62.
- Matutes E. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 1996; 20: 375-7.
- Mauerer K, Zahrieh D, Gorgun G, et al. Immunoglobulin gene segment usage, location and immunogenicity in mutated and unmutated chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2005; 129: 499-510.
- Maura F, Cutrona G, Fabris S, et al. Relevance of stereotyped B-cell receptors in the context of the molecular, cytogenetic and clinical features of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One* 2011; 6: e24313.
- Mauro FR, Giammartini E, Gentile M, et al. Clinical features and outcome of familial chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 1117-20.
- Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 742-51.

- McCarthy H, Wierda WG, Barron LL, et al. High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101: 4903-8.
- Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 2002; 80: 753-69.
- Mecucci C, Delannoy A, Van den Berghe H. The origin of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 36: 203-4.
- Messmer BT, Albesiano E, Messmer D, Chiorazzi N. The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood* 2004; 103: 3490-5.
- Meyers G, Ng YS, Bannock JM, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for B-cell tolerance in humans. *Proc Nat Acad Sc USA* 2011; 108: 11554-9.
- Michels J, Johnson PW, Packham G. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 267-71.
- Migliazza A, Bosch F, Komatsu H, et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 97: 2098-104.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F; eds. Mitelman database of chromosome aberration and gene fusions in cancer. Available from URL: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>; 2012.
- Mittal AK, Hegde GV, Aoun P, et al. Molecular basis of aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia patients with 11q deletion and trisomy 12 chromosomal abnormalities. *Int J Mol Med* 2007; 20: 461-9.
- Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987; 60: 2712-6.
- Molica S, Reverter JC, Alberti A, Montserrat E. Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance. *Eur J Haematol* 1990; 44: 277-81.
- Montillo M, Hamblin T, Hallek M, et al. Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica* 2005; 90: 391-9.
- Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Viñolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; 62: 567-75.
- Moreno C, Montserrat E. New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2008; 22: 211-9.
- Moreno P, Abreu C, Borge M, et al. Lipoprotein lipase expression in unmutated CLL patients is the consequence of a demethylation process induced by the microenvironment. *Leukemia* 2012; doi: 10.1038/leu.2012.212
- Müller-Hermelink HK, Monserrat E, Catovsky D, et al. Chronic Lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In: WHO Classification of tumors of haematopoietic and



lymphoid tissues. SH Swerdlow, E Campo, NL Harris, ES Jaffe, SA Pileri, H Stein, J Thiele, JW Vardiman; eds. Lyon, IARC; 2008: pp 180-2.

Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 2008; 111: 1524-33.

Nakahashi H, Tsukamoto N, Hashimoto Y, et al. Characterization of immunoglobulin heavy and light chain expression in chronic lymphocytic leukemia and related disorders. *Cancer Sci* 2009; 100: 671-7.

Nakahira M, Macedo JN, Seraphim TV, et al. A draft of the human septin interactome. *PLoS One* 2010; 5: e13799.

Nardini E, Neri F, Vicenzi E, et al. Thymic function and immunoglobulin mutation genotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Int J Cancer* 2003; 107: 958-61.

Neilson JR, Auer R, White D, et al. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia* 1997; 11: 1929-32.

Ng D, Toure O, Wei MH, et al. Identification of a novel chromosome region, 13q21.33-q22.2, for susceptibility genes in familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 916-25.

Nguyen-Khac F, Chapiro E, Lesty C, et al. Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res* 2011; 1: 13-21.

Nikitin EA, Malakho SG, Biderman BV, et al. Expression level of lipoprotein lipase and dystrophin genes predict survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 912-22.

Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood* 2005; 106: 1012-20.

Nolz JC, Tschumper RC, Pittner BT, et al. ZAP-70 is expressed by a subset of normal human B-lymphocytes displaying an activated phenotype. *Leukemia* 2005; 19: 1018-24.

Nückel H, Hüttmann A, Klein-Hitpass L, et al. Lipoprotein lipase expression is a novel prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1053-61.

Nückel H, Frey UH, Bau M, et al. Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109: 290-7.

O'Malley DP, Giudice C, Chang AS, et al. Comparison of array comparative genomic hybridization (aCGH) to FISH and cytogenetics in prognostic evaluation of chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol* 2011; 33: 238-44.

Opferman JT, Letai A, Beard C, et al. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 2003; 426: 671-6.

Oppezzo P, Vuillier F, Vasconcelos Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood* 2003; 101: 4029-32.

- Oppezso P, Vasconcelos Y, Settegrana C, et al. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2005; 106: 650-7.
- Oscier DG. Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *Blood Rev* 1994; 8: 88-97.
- Oscier DG. Cytogenetics and molecular genetics of chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica* 1999; 84: 88-91.
- Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002; 100: 1177-84.
- Ottoson NC, Pribila JT, Chan AS, Shimizu Y. Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase. *J Immunol* 2001; 167: 1857-61.
- Ouillette P, Erba H, Kujawski L, et al. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res* 2008; 68: 1012-21.
- Ouillette P, Collins R, Shakhan S, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118: 3051-61.
- Palacios F, Moreno P, Morande P, et al. High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood* 2010; 115: 4488-96.
- Pallasch CP, Schwamb J, Königs S, et al. Targeting lipid metabolism by the lipoprotein lipase inhibitor orlistat results in apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2008; 22: 585-92.
- Parker H, Rose-Zerillo MJ, Parker A, et al. 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2011; 25: 489-97.
- Pasqualucci L, Neri A, Baldini L, et al. BCL-6 mutations are associated with immunoglobulin variable heavy chain mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 2000; 60: 5644-8.
- Patten PE, Buggins AG, Richards J, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* 2008; 111: 5173-81.
- Payelle-Brogard B, Magnac C, Mauro FR, et al. Analysis of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in familial chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 3516-22.
- Payelle-Brogard B, Magnac C, Oppezso P, et al. Retention and defective assembly of the B-cell receptor in the endoplasmic reticulum of chronic lymphocytic leukaemia B cells cannot be reverted upon CD40 ligand stimulation. *Leukemia* 2003; 17: 1196-9.
- Pekarsky Y, Croce CM. Is miR-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL? *Oncotarget* 2010; 1: 224-7.
- Pepper C, Lin TT, Pratt G, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 2008; 112: 3807-17.
- Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 2007; 109: 1202-10.

- Pimentel BJ, Stefanoff CG, Santos Moreira A, et al. Use of VH, D and JH immunoglobulin gene segments in Brazilian patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Genet Mol Biol* 2008; 31: 643-8.
- Pittaluga S, Verhoef G, Criel A, et al. "Small" B-cell non-Hodgkin's lymphomas with splenomegaly at presentation are either mantle cell lymphoma or marginal zone cell lymphoma. A study based on histology, cytology, immunohistochemistry, and cytogenetic analysis. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 211-23.
- Popescu NC, Zimonjic DB. Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93: 10-21.
- Popp C, Dean W, Feng S, et al. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 2010; 463: 1101-5.
- Potter KN, Orchard J, Critchley E, et al. Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire. *Blood* 2003; 101: 3082-4.
- Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 2000; 16: 83-7.
- Pritsch O, Magnac C, Dumas G, et al. V gene usage by seven hybrids derived from CD5+ B-cell chronic lymphocytic leukemia and displaying autoantibody activity. *Blood* 1993; 82: 3103-12.
- Pritsch O, Troussard X, Magnac C, et al. VH gene usage by family members affected with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999; 107: 616-24.
- Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; 475: 101-5.
- Put N, Meeus P, Chatelain B, et al. Translocation t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1201-4.
- Que TH, Marco JG, Ellis J, et al. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood* 1993; 82: 571-5.
- Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011; 44: 47-52.
- Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. *Blood* 2009; 114: 1029-37.
- Rai KR, Montserrat E. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1987; 24: 252-6.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-34.
- Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* 1993; 177: 925-35.

- Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, and Nakagawara K. eds. Rapid cycle Real-Time PCR. Methods and Applications Springer Press, Heidelberg; 2001: ISBN 3-540-66736-9, 21-34.
- Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood* 2007; 109: 5079-86.
- Rawstron AC, Yuille MR, Fuller J, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 2002; 100: 2289-90.
- Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol* 2006; 132: 705-22.
- Richard K, Pierce SK, Song W. The agonists of TLR4 and 9 are sufficient to activate memory B cells to differentiate into plasma cells in vitro but not in vivo. *J Immunol* 2008; 181: 1746-52.
- Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2006; 107: 3584-92.
- Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood* 2012; 119: 2310-3.
- Roos G, Kröber A, Grabowski P, et al. Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111: 2246-52.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639-47.
- Rossi D, Spina V, Cerri M, et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4415-22.
- Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119: 521-9.
- Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, et al. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 2005; 106: 214-22.
- Rudd CE. Cell cycle 'check points' T cell anergy. *Nat Immunol* 2006; 7: 1130-2.
- Ruiz-Argüelles GJ, Velázquez BM, Apreza-Molina MG, et al. Chronic lymphocytic leukemia is infrequent in Mexican mestizos. *Int J Hematol* 1999; 69: 253-5.
- Salaverria I, Zettl A, Beà S, Moreno V, et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1216-22.
- Seiler T, Döhner H, Stilgenbauer S. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33: 186-94.
- Seldin MF, Tian C, Shigeta R, et al. Argentine population genetic structure: Large variance in Amerindian contribution. *Am J Phys Anthropol* 2007; 132: 455-62.

- Sellick GS, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006; 33: 195-201.
- Sellmann L, Gesk S, Walter C, et al. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 138: 217-20.
- Shanafelt TD, Witzing TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4634-41.
- Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004; 103: 1202-10.
- Shanafelt TD, Hanson C, Dewald GW, et al. Karyotype evolution on fluorescent in situ hybridization analysis is associated with short survival in patients with chronic lymphocytic leukemia and is related to CD49d expression. *J Clin Oncol* 2008; 26: e5-6.
- Shenoy PJ, Malik N, Sinha R, et al. Racial differences in the presentation and outcomes of chronic lymphocytic leukemia and variants in the United States. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011; 11: 498-506.
- Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, et al. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood* 2011; 117: 1911-6.
- Smith A, Howell D, Patmore R, et al. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 2011; 105: 1684-92.
- Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 2007; 109: 259-70.
- Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, et al. microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood* 2009; 113: 5237-45.
- Stankovic T, Stewart GS, Fegan C, et al. Ataxia telangiectasia mutated-deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage. *Blood* 2002; 99: 300-9.
- Starostik P, Manshour T, O'Brien S, et al. Deficiency of the ATM protein expression defines an aggressive subgroup of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 1998; 58: 4552-7.
- Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 2004; 103: 4389-95.
- Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, et al. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1331-4.
- Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Döhner H. Chronic lymphocytic leukemia. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V<sub>H</sub> gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002; 16: 993-1007.

- Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica* 2007; 92: 1242-5.
- Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M.D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009; 114: 957-64.
- te Raa GD, van Oers MH, Kater AP; HOVON CLL working party. Monoclonal B-cell lymphocytosis: recommendations from the Dutch Working Group on CLL for daily practice. *Neth J Med* 2012; 70: 236-41.
- Tefferi A, Bartholmai BJ, Witzig TE, et al. Clinical correlations of immunophenotypic variations and the presence of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 95: 173-7.
- Thompson AA, Talley JA, Do HN, et al. Aberrations of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1997; 90: 1387-94.
- Thornton PD, Fernandez C, Giustolisi GM, et al. CD38 expression as a prognostic indicator in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J* 2004; 5: 145-51.
- Thorsélius M, Kröber A, Murray F, et al. Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21 using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood* 2006; 107: 2889-94.
- Ticchioni M, Charvet C, Noraz N, et al. Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood* 2002; 99: 3111-8.
- Tobin G, Thunberg U, Johnson A, et al. Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 2262-4.
- Tobin G, Thunberg U, Karlsson K, et al. Subset with restricted immunoglobulin gene rearrangement features indicate a role for antigen selection in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; 104: 2879-85.
- Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of "nurselike" cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 1030-7.
- Van Bockstaele F, Pede V, Janssens A, et al. Lipoprotein Lipase mRNA Expression in Whole Blood is a Prognostic Marker in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Chem* 2007; 53: 204-12.
- Van Den Neste E, Robin V, Francart J, et al. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia* 2007; 21: 1715-22.
- Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, et al. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2010; 148: 544-50.
- Van't Veer MB, Brooijmans AM, Langerak AW, et al. The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2006; 91: 56-63.

- Vasconcelos Y, De Vos J, Vallat L, et al. Gene expression profiling of Chronic Lymphocytic Leukemia can discriminate cases with stable and mutated Ig genes from those with progressive disease and unmutated Ig genes. *Leukemia* 2005; 19: 2002-5.
- Véronèse L, Tournilhac O, Verrelle P, et al. Low MCL-1 mRNA expression correlates with prolonged survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2008; 22: 1291-3.
- Visone R, Rassenti LZ, Veronese A, et al. Karyotype-specific microRNA signature in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 114: 3872-9.
- Visone R, Veronese A, Rassenti LZ, et al. miR-181b is a biomarker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 118: 3072-9.
- Viswanatha D, Dyer Montgomery, K, Foucar K. Mature B-Cell Neoplasms: Chronic Lymphocytic Leukemia-Small Lymphocytic Lymphoma, B-Cell Prolymphocytic Leukemia and Lymphoplasmacytic lymphoma. Mature B-Cell Neoplasm 14. in *Hematopathology*, Jaffe E, Harris N, Vardiman J, Campo E, Arber D. 2011, pp: 221-46.
- Vuillier F, Dumas G, Magnac C, et al. Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains. *Blood* 2005; 105: 2933-40.
- Walsh SH, Rosenquist R. Immunoglobulin gene analysis of mature B-cell malignancies: reconsideration of cellular origin and potential antigen involvement in pathogenesis. *Med Oncol* 2005; 22: 327-41.
- Wang DM, Miao KR, Fan L, et al. Intermediate prognosis of 6q deletion in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2011; 52: 230-7.
- Wei X, Moncada-Pazos A, Cal S, et al. Analysis of the disintegrin-metalloproteinases family reveals ADAM29 and ADAM7 are often mutated in melanoma. *Hum Mutat* 2011; 32: E2148-75.
- Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 267-85.
- Weinberg JB, Volkheimer AD, Chen Y, et al. Clinical and molecular predictors of disease severity and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 2007; 82: 1063-70.
- Weller S, Reynaud CA, Weill JC. Splenic marginal zone B cells in humans: where do they mutate their Ig receptor? *Eur J Immunol* 2005; 35: 2789-92.
- Widhopf GF, Rassenti LZ, Toy TL, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1/ of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood* 2004; 104: 2499-2504.
- Widhopf GF, Kipps TJ. Normal B cells express 51p1-encoded Ig heavy chains that are distinct from those expressed by chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 2001; 166: 95-102.
- Wu G, Brouckaert P, Olivecrona T. Rapid downregulation of adipose tissue lipoprotein lipase activity on food deprivation: evidence that TNF-alpha is involved. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286: E711-7.
- Wuillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, et al. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* 2005; 19: 1248-52.

- Yuille MR, Matutes E, Marossy A, et al. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol* 2000; 109: 794-9.
- Zanette DL, Rivadavia F, Molfetta GA, et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 1435-40.
- Zenz T, Kröber A, Scherer K, et al. TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008; 112: 3322-9.
- Zenz T, Martens D, Kuppers R, et al. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Nat Rev Cancer* 2010a; 10: 37-50.
- Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010b; 28: 4473-9.
- Zucchetto A, Sonogo P, Degan M, et al. Surface-antigen expression profiling (SEP) in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): Identification of markers with prognostic relevance. *J Immunol Methods* 2005; 305: 20-32.