

**DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I ANATOMIA PATOLÒGICA
FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**PROGRAMA DE DOCTORAT
BIOLOGIA I PATOLOGIA CEL·LULARS
Bienni 2002-2004**



**ANÀLISI DELS MECANISMES MOLECULARS IMPLICATS EN
EL DESENVOLUPAMENT I PROGRESSIÓ
DELS LIMFOMES DE CÈL·LULA B PETITA**

**Tesi presentada per Verònica Fernández Pascual
per optar al grau de Doctora en Biologia**

**Director de tesi: Dr. Elías Campo Güerri
Tutor: Dr. Carles Enrich Bastús
Barcelona 2008**



*Als meus pares i l'Alberto,
que m'han acompanyat durant aquest intens i bonic viatge
i sense els quals res de tot això hagués estat possible*

Ítaca

Quan surts per fer el viatge cap a Ítaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d'aventures, ple de coneixences.
Els Lestrígons i els Cíclops,
l'airat Posidó, no te n'esfereixis:
són coses que en el teu camí no trobaràs,
no, mai, si el pensament se't manté alt, si una
emoció escollida
et toca l'esperit i el cos alhora.
Els Lestrígons i els Cíclops,
el feroç Posidó, mai no serà que els topis
si no els portes amb tu dins la teva ànima,
si no és la teva ànima que els dreça davant teu.

Has de pregar que el camí sigui llarg.
Que siguin moltes les matinades d'estiu
que, amb quina delectança, amb quina joia!
entraràs en un port que els teus ulls ignoraven;
que et puguis aturar en mercats fenicis
i comprar-hi les bones coses que s'hi exhibeixen,
corals i nacres, mabres i banussos
i delicats perfums de tota mena:
tanta abundor com puguis de perfums delicats;
que vagis a ciutats d'Egipte, a moltes,
per aprendre i aprendre dels que saben.

Sempre tingues al cor la idea d'Ítaca.
Has d'arribar-hi, és el teu destí.
Però no forcis gens la travessia.
És preferible que duri molts anys
i que ja siguis vell quan fondegis a l'illa,
ric de tot el que hauràs guanyat fent el camí,
sense esperar que t'hagi de dar riqueses Ítaca.

Ítaca t'ha donat el bell viatge.
Sense ella no hauries pas sortit cap a fer-lo.
Res més no té que et pugui ja donar.

I si la trobes pobra, no és que Ítaca t'hagi enganyat.
Savi com bé t'has fet, amb tanta experiència,
ja hauràs pogut comprendre què volen dir les Ítaques.

Konstantinos Kavafis
(traduït per Carles Riba)

AGRAÏMENTS

Com vola el temps! Fa gairebé 5 anys que vaig començar la tesi i sense adonar-me'n ja em trobo escrivint aquestes línies, que sempre m'havien semblat molt llunyanes, i fins i tot en certs punts àlgids, impossibles... Però aquí estic! Molta gent m'ha dit que aquestes pàgines són les més difícils d'escriure de tota la tesi, però arribat el moment flueixen fàcilment totes i cadascuna de les paraules i imatges que m'arriben a la ment, perquè han estat tantes les persones sense les quals ni una sola lletra, que dic! Ni una sola coma o signe de puntuació s'hagués pogut escriure d'aquest treball que teniu a les mans!

Així que he decidit anar molt però que molt enrere en el temps i començar donant les gràcies a la **Matilde Arias** i al **Florenci Vallès**, els meus professors de Biologia i Ciències de la secundària, sense els quals la llavor de la biologia potser no m'hagués arrelat tan fort com ho va fer, i a qui els dec tot l'entusiasme per la matèria que em van ensenyar. Espero que el seu talent i ànim no decaigui i que segueixin despertant l'esperit científic d'un gran nombre de futurs investigadors que a hores d'ara potser encara van amb bolquers. Continuo agraint la magnífica amistat que m'ha lligat amb la meva colla de la facultat, especialment les dues **Sílvies** (García Vicente i Mata), la **Gisela**, l'**Alfons**, la **Maricar**, la **Merche**, la **Laura**, el **Chemita**, l'**Hèctor** i el **Dani**. Per molt que han passat els anys i els doctorats pel mig, continuem trobant-nos on menys ens ho esperem... pels que encara no han llegit la tesi, ànims i molta sort! En concret vull agrair-li a la **Sílvia** (García Vicente) totes les bones estones que hem passat juntes, que sempre hagi estat al meu costat durant tots aquests anys (fins i tot en les múltiples pèrdues de consciència que he tingut durant la carrera, hematocrit i rates de fisio incloses, vas actuar com una autèntica professional i sense perdre la compostura!). Encara que no ens poguem veure tan sovint com voldríem, sempre hi ha un petit trosset de cor (amb xocolata) que ens lliga, ja sigui a Manresa, St. Feliu o Salamanca!

Els membres integrants del meu laboratori han esdevingut, més que companys, part de la meva família, i no només per totes les hores en què hem treballat junts i m'han demostrat la seva fantàstica professionalitat, sinó per molt més que això: per tot el que he après de vosaltres a nivell laboral i emocional, i els bons moments entre cafès, dinars, viatges, reunions d'organització, alguna que altra sortida nocturna (i no precisament per prendre poleo-menta) i els inimitables consultoris sentimental-

psiquiàtrics d'urgència que ens hem aplicat a uns i altres ;-). A l'**Alba**, que ara per ara és la més petita del nostre grup i que ja s'ha integrat plenament a les tertúlies més esbojarrades que s'hagués pogut imaginar, molts ànims per tots els anys que t'esperen (i que disfrutars de ben segur si és que no ho estàs fent ja) i que segueix donant empenta als limfomes, hi ha tema per estona! A la **Miriam** (àlies la *china* però també la podeu anomenar *chunguita* o *torti*), companya assídua de tren i bons cafès matiners, que mai perdi el bon humor que la caracteritza, que s'ho passi bé al costat de la llar de foc diguin el que diguin els altres i que no deixi de resar a *la virgen* entre quanti i quanti. A la **Laureta** (àlies la *pimentera*, demaneu-li a ella si no sabeu el perquè) li desitjo que cuidi els tendons, entre tanta PCR, pipeteig i concerts varis... no perdís la paciència ni l'esperança, tot arriba i quan menys t'ho esperes! A la **Laura Gelabert**, espero que no perdi mai la compostura al departament d'AP, entre tanta mostra junta, i que algun dia m'ensenyi a fer complements de felpa (conjuntament amb la Laureta), que ho estic desitjant! A la **Montsina** li dono les gràcies per haver tingut paciència amb mi i els microarrays i per haver-me descobert una nova dimensió del bingo que desconeixia. Sense la **Ira** (àlies *pulguilla*) no hagués menjat mai tant bé i de forma tant sana com ho estic fent ara, si ho sapigués la Teresa Guardiola! Sense la **Laurilla** (àlies *Marquesa*) no hagués descobert el meravellós món de la metilació ni dels pintxos, vocabulari i fauna bilbaína (de fet estem recopilant dades per fer un diccionari catabilbo, si algú hi vol dir la seva...). De la **Júlia** (també li podeu dir *Xu*) mai podré oblidar aquella vetllada ginebrenca un dissabte per la nit i les seves conseqüències. A l'**Elena** li dono especialment les gràcies perquè sempre m'ha escoltat i donat bons consells, m'ha gravat CDs inigualables que ja formen part del patrimoni del meu cotxe (amb grans clàssics com Pimpinela, la Terremoto de Alcorcón y la Hora Chanante...) i ha deixat que okupés la seva casa sempre que ho he necessitat (amb dinars succulents inclosos!). Mai li podré agrair prou que em rescatés d'una de les nits més fosques de la meva ànima.

La **Iti** mereix un punt i a part, perquè no només hem compartit programes de doctorat i ratolins disseccionats (amb algun mareig inclòs per part meva), sinó també taula amb impressora, congressos amb vols intempestius, factures i molts, però que molt moments inoblidables entre vinatxu i bronquetes del jefe. Ànims per la tesi (les dues ens trobem en el mateix punt) i sobretot que la sort t'acompanyi durant tot el teu camí, ets una gran persona! Ahhh... i per cert... que me n'oblidava... records al Mikel :P!!

Pel que fa als grans del meu grup, abans de res i a tots en general us vull dir que sense els vostres consells, a tots els nivells, no m'hagués sentit segura en aquest

incert món experimental i vés a saber on estaria ara! A la **Magda**, la quarentona filipina més MQMF que conec i que ja m'agradaria estar a mi com ella d'aquí uns anys, que les seves nenes no li provoquin massa maldecaps i que ens segueixi donant consells inestimables sobre la vida en general (marital, maternal, experimental). Que la **Sílvia** (àlies *Wt*) ens porti molts d'aquests pastissos tan requetebons que només ella sap fer, i que de pas m'ensenyi a renegar en veu alta, que em fa falta (però carinyosament, eeeehhh?!) Gràcies al **Lluís** (àlies *Androide 1*) no em perdo cap dels ocells que em passen per davant, però més que això, li agraeixo que sempre m'hagi ajudat en tots els meus dubtes (eeehhh Lluís, et puc fer una pregunta tècnica?) amb una paciència de sant que molts voldríem tenir! Sense l'**Anna** ara per ara no només no sabia clonar, sinó que m'hagués perdut una bona pila d'SNPs i xerrades interessantíssimes al cau de la unitat de Genòmica. Tampoc m'oblido de la **Virgínia**, que acaba d'arribar i ja s'ha fet un bon lloc a la comunitat dels moleculars descalços. Tu no t'escoltis massa els consells de les mames-bruixa del lab, que a vegades fan por i tot! Aquí també vull donar les gràcies al **Fredy**, que em va acollir quan vaig arribar al lab i no sabia fer res de res i amb qui vaig aprendre a degustar una bona cervesa com cal (de barril, de fruites, de 12 °C i un molt però que molt llarg alcohòlic etcètera).

Al **Pedro Jares**, cap de la unitat de Genòmica i posseïdor d'una ment brillantíssima, vull agrair-li el fet que sempre ha estat allà quan l'he necessitat (tot i que crec que l'he deixat mig sord de tant cridar per telèfon); i que mai li ha faltat el bon humor i sortides rocambolesques a qualsevol problema experimental. M'has ensenyat no només a ser una bona científica (o almenys ho has intentat), sinó també millor persona... Mai trobaré ningú que imiti Torrente tan bé com tu :P.

I què puc dir de l'**Elies**, cap del grup i director de la meva tesi? No només li estic profundament agraïda per haver-me donat l'oportunitat d'entrar al seu laboratori, que no és poc, sinó també per haver-me escoltat tots i cadascun dels cops que ho he necessitat i a qualsevol hora (creieu-me si us dic que és un gran mèrit, tenint en compte que la seva agenda està sempre ben atapeïda), haver confiat en mi des d'un bon principi (i amb elevades dosis de paciència), haver finançat tots els congressos i jornades a què hem pogut assistir (i sense queixar-se ni una mica, és més, ens ha esperonat sempre a estimar el coneixement en totes les seves vessants) i, sobretot, perquè mai m'ha deixat de demostrar la seva gran vàlua com a persona i com a professional (actuant molts cops com un autèntic segon pare), esdevenint un exemple per a mi. Mai et podré arribar a agrair prou que hagi alimentat de la manera que ho has fet aquesta petita llavor científica que hi havia dins meu i haver-me mostrat la llum

quan ho veia tot negre, permetent que em superés a mi mateixa davant de cada nou repte.

També dins de l'àmbit de l'Hospital Clínic, i pel que fa al Departament d'Anatomia Patològica, li vull fer arribar a la **Teresa Roch** una abraçada ben càlida per tot el què ens ha arribat a ajudar en els diversos tràmits administratius que s'han hagut de fer i per no perdre mai, però mai, el somriure. De la mateixa manera, agraeixo al **Lluís Colomo**, l'**Olga Balagué** i el **Toni Martínez** tota l'ajuda que m'han donat i les divertides vetllades que hem passat entre congrés i congrés. De la gent de l'Escola d'Hematologia, volia donar especialment les gràcies a la **Dolors Colomer**, la **Neus Villamor** i la **Marta Aymerich** pel que m'han ensenyat i per com de bé m'han tractat sempre i sota qualsevol circumstància. També vull agrair l'ajuda i bons moments que he passat amb les dues **Sandres** i el grup dels apoptòtics (**Mònica**, **Patricia**, **Gaël**, **Roberto** i **Silvia Marcé**), que m'han fet sentir al seu laboratori com si fos al meu. Fora de l'Hospital i del país, aquests agraiments no estarien complets sense l'**Andreas Rosenwald** i l'**Elena Hartmann**, els nostres companys col·laboradors de l'Institut de Patologia de Wuerzburg (Alemanya), els quals m'han tractat com si fos a casa meva els cops que hi he anat a treballar, i que han estat un suport inqüestionable dels nostres treballs. Amb ells he passat molts moment amens i entranyables difícils d'oblidar.

Pel que fa als meus amics més íntims, la meva vida no hauria estat ni de bon tros tan plena ni divertida sense vosaltres: **Anna** (el meu coixinet d'alegries i llàgrimes durant molts anys i panys... i que durí!), **Ignasi** (per tants emails compartits, tardes de tèi i de complicitat), **Xor** (una amistat indestructible com el metall! *Up the irons!*) i **Edin** (àlies *Minstrelboy*, bard de tertúlies inspirades en les muses i un cafè de mitja tarda). També vull esmentar aquí tota la colla Biosyner (**Patri**, **Carlos** i **J+**), l'**Èlia**, la **Maria Antònia**, la **Merche**, el **Julià**, el **David Álvarez**, el **Karel** i la colla **Chopi** (especialment a la Carol i la seva E.Coli de pelutx, que s'ha convertit en la meva mascota preferida) que tot i que no ens veiem tan sovint, sapiguen que us duc ben a prop del cor. Una menció especial mereix l'**Anna Maria**, la meva bruixeta particular, que ha omplert de màgia la meva vida i m'ha fet creure en mi quan ni jo mateixa hi creia.

A la meva família política, que ja forma part de mi, els hi agraeixo tot el que m'han donat i m'estan donant. **Cati**, **Rafa**, **Òscar**: sou persones excepcionals!

Per als meus estimats **pares**, que sempre han estat al peu del canó, només us puc dir que res, res de tot això hagués estat possible sense vosaltres. Us ho dec TOT.

I a l'**Alberto**, la meva inspiració, la meva força, el meu somni, la meva alegria constant: t'estimo.

Barcelona, divendres 23 de juliol 2007

ÍNDEX

Financiació i articles generats durant la tesi, 17

Breu resum de la tesi, 19

ABREVIATURES **23**

INTRODUCCIÓ **27**

1. LES NEOPLÀSIES LIMFOIDES: ORIGEN, DESENVOLUPAMENT I CLASSIFICACIÓ, 29

La classificació de les neoplàsies limfoides, 30

Els Limfomes No Hodgkin de cèl·lules B, 33

La leucèmia limfàtica crònica de cèl·lules B (CLL), 35

El limfoma de cèl·lules del mantell (MCL), 38

El limfoma fol·licular (FL), 41

El limfoma difús de cèl·lules grans B (DLBCL), 42

2. MECANISMES ONCOGÈNICS QUE PARTICIPEN EN LA PATOGÈNESI DELS LIMFOMES NO HODGKIN, 43

Proliferació en NHL: Anàlisi de l'expressió gènica en el Limfoma de Cèl·lules del Mantell, 45

Proliferació i cicle cel·lular, 45

Regulació del cicle cel·lular, 47

Les alteracions del cicle cel·lular en els NHL de cèl·lules B, 49

Desregulació del cicle cel·lular en MCL, 51

La proliferació en MCL i els marcadors de supervivència, 54

Apoptosi en NHL: Estudi dels receptors de mort de TRAIL en el Limfoma de Cèl·lules del Mantell, la Leucèmia Limfàtica Crònica i altres NHL, 56

L'apoptosi o mort cel·lular programada, 56

Paper de l'apoptosi en la limfomagènesi de les cèl·lules B, 57

Les alteracions de l'apoptosi en els NHL de cèl·lules B, 59

Els receptors de mort i l'apoptosi lligada a TRAIL, 61

Les alteracions dels receptors de TRAIL i càncer, 64

Anàlisi global dels mecanismes implicats en la patogènesi dels NHL: Estudi de la progressió de la Leucèmia Limfàtica Crònica, 66

El curs clínic de la CLL i els seus sistemes de classificació, 66

Factors pronòstics en la progressió de la CLL, 67

OBJECTIUS 71

MATERIAL I MÈTODES 75

1. TÈCNiques D'ANÀLISI DEL DESENVOLUPAMENT I PROGRESSIÓ TUMORALS, 77

Estudi citogenètic de les alteracions cromosòmiques, 77

Hibridació genòmica comparada (CGH), 77

Determinació de la presència d'alteracions genètiques al DNA, 80

Cromatografia de líquids desnaturalitzant d'alt rendiment (DHPLC), 80

Anàlisi dels perfils d'expressió gènica (mRNA), 82

PCR quantitativa a temps real (qPCR), 82

Microarrays d'expressió gènica, 86

2. RESUM DE PROTOCOLS, 95

1. Manipulació de material biològic, 95

Aïllament de limfòcits en sang perifèrica, 95

Congelació de cèl·lules, 95

Descongelació de cèl·lules, 96

Inclusió de material biològic en bloc congelat, 97

Inclusió de material biològic en FFPE, 97

Purificació de la població de cèl·lules tumorals, 98

Detecció de l'expressió de ZAP-70 en cèl·lules B, 98

2. Extracció d'àcids nucleics, 99

Obtenció d'àcid desoxiribonucleic (DNA), 99

Extracció de DNA pel mètode del fenol/cloroform, 99
Extracció de DNA per Kit comercial, 101
Extracció de DNA per TRIzol i purificació, 102
 Purificació mitjançant precipitació per sals i etanol, 103
 Purificació a partir de columnes cromatogràfiques Bio-Spin®, 103
Extracció de DNA de FFPE, 103

Obtenció d'àcid ribonucleic (RNA), 104

Extracció de RNA per TRIzol, 105
Extracció de RNA de FFPE, 106

3. Manipulació de l'àcid desoxiribonucleic (DNA), 107

Estudi citogenètic de les alteracions cromosòmiques: CGH, 107

Reacció en cadena de la polimerasa (PCR), 110

Condicions de PCR, 112
 Programes de temperatures, 114

Tècniques de detecció de canvis nucleotídics, 116

Creació per PCR de seqüències amb canvis de nucleòtid com a control positiu, 116

Purificació de productes amplificats per PCR, 118

Purificació directa de productes de PCR, 119
 Purificació per retall de bandes, 119

Seqüenciació directa, 120

Detecció de polimorfismes conformacionals de cadena única (SSCP), 121

Cromatografia de líquids desnaturalitzant d'alt rendiment (DHPLC), 124

PCR quantitativa a temps real per determinar la dosi gènica, 125

4. Manipulació de l'àcid ribonucleic (mRNA), 128

PCR quantitativa a temps real per estudiar l'expressió gènica, 128

Creació de cDNA (Retrotranscripció o transcripció reversa), 129

SuperScript™ III First Strand Kit, 129
 High Capacity cDNA Archive Kit, 130

Microarrays d'expressió gènica, 132

RESULTATS **139**

TREBALL 1: Proliferació en NHL

Un model de cinc gens pot predir la supervivència del limfoma de cèl·lules del mantell i aplicar-se en teixit fixat amb formol i inclòs en parafina, 141

L'augment de l'expressió de MDM2 s'associa amb menor supervivència en el limfoma de cèl·lules del mantell, però no es relaciona amb la presència del SNP309, 175

TREBALL 2: Apoptosi en NHL

Els canvis polimòrfics però no els mutacionals dels receptors de TRAIL DR4 i DR5 són freqüents en el limfoma de cèl·lules del mantell i altres neoplàsies limfoides de cèl·lula B, 179

TREBALL 3: La progressió en Leucèmia Limfàtica Crònica

Evolució del perfil genòmic i d'expressió en la progressió clínica primerenca de la leucèmia limfàtica crònica, 193

DISCUSSIÓ **215**

CONCLUSIONS **229**

BIBLIOGRAFIA **233**

APÈNDIX **253**

Glossari, 255

Índex de taules, 265

Índex de figures, 266

Resum dels articles en col·laboració, 267

Aquesta tesi ha estat financada per:

- Beca predoctoral de Formació de Personal Investigador SAF2002-3261, Ministerio de Educación y Ciencia.
- CYCIT SAF 05/5855, Ministerio de Educación y Ciencia.
- Red de Genómica del Cáncer 03/10, Red de estudio de Neoplasias linfoides 03/179, y RD06/0020; Instituto Nacional de Salud Carlos III-Ministerio de Salud.
- European Grant N° 503351 (European Mantle Cell Lymphoma Network).
- Lymphoma Research Fundation (LRF), USA.

I ha generat els articles següents:

- **Fernandez V**, Jares P, Bea S, Salaverria I, Guino E, de Sanjose S, Colomer D, Ott G, Montserrat E, Campo E. *Frequent polymorphic changes but not mutations of TRAIL receptors DR4 and DR5 in mantle cell lymphoma and other B-cell lymphoid neoplasms*. Haematologica. 2004 Nov;89(11):1322-31 (Journal impact factor 2006: 5.032).
- Tort F, Hernández S, Beà S, Camacho E, **Fernandez V**, Esteller M, Fraga MF, Burek C, Rosenwald A, Hernández L and Campo E. *Checkpoint kinase 1 (CHK1) protein and mRNA expression is downregulated in aggressive variants of human lymphoid neoplasms*. Leukemia. 2005 Jan;19(1):112-7 (Journal impact factor 2006: 6.146).
- **Fernandez V**, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. *Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways*. J Clin Oncol. 2005 Sep 10;23(26):6364-9 (Journal impact factor 2006: 13.598).
- Pinyol M, Salaverria I, Bea S, **Fernandez V**, Colomo L, Campo E, Jares P. *Unbalanced expression of licensing DNA replication factors occurs in a subset of mantle cell lymphomas with genomic instability*. Int J Cancer 2006 Oct 11: 119(12): 2768-2774 (Journal impact factor 2006: 4.7).

- Hartmann E, **Fernandez V**, Stoecklein H, Hernández L, Campo E, Rosenwald A. *Increased MDM2 expression is associated with inferior survival in mantle cell lymphoma, but not related to the MDM2 SNP309*, Haematologica, 92:574-575 (Journal impact factor 2006: 5.032).

- Hartmann E, **Fernandez V**, Moreno V, Valls J, Hernandez L, Bosch F, Müller-Hermelink HK, Ott G, Rosenwald A, Campo E. *A five-gene model to predict survival in mantle cell lymphoma and its application to formalin-fixed paraffin-embedded tissue*. J Clin Oncol, under revision (Journal impact factor 2006: 13.598).

- **Fernandez V**, Jares P, Salaverria I, Giné E, Beà S, Aymerich M, Colomer D, Villamor N, Bosch F, Montserrat E, Campo E. *Gene expression profile and genomic changes in disease progression of early-stage chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, accepted (Journal impact factor 2006: 5.032).

BREU RESUM DE LA TESI

Introducció

Les **neoplàsies limfoïdes** agrupen un conjunt de malalties que, tot i compartir certes característiques comunes, presenten una gran heterogeneïtat en la seva biologia i manifestacions clíniques. Aquest fet és degut bàsicament a la gran complexitat cel·lular i funcional existent en les poblacions limfocitàries d'origen. En la present tesi s'han estudiat els mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament i progressió de diferents entitats que s'inclouen dins del grup dels Limfomes No-Hodgkin de cèl·lula B (NHL, de l'anglès *Non-Hodgkin Lymphoma*), especialment el limfoma de cèl·lules del mantell (MCL, de l'anglès *Mantle Cell Lymphoma*) i la leucèmia limfàtica crònica (CLL, de l'anglès *Chronic Lymphocytic Leukemia*), els quals són limfomes de cèl·lula B petita.

Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat analitzar les alteracions genètiques que poden afectar l'homeòstasi cel·lular i conduir al desenvolupament dels NHL. En el primer treball s'han estudiat gens implicats en la proliferació cel·lular del MCL, els quals poden tenir un possible paper en la predicció de la supervivència dels pacients i esdevenir d'utilitat en la rutina diagnòstica. El segon treball s'ha centrat en les vies d'apoptosi i, concretament, en la presència d'alteracions genètiques en els receptors de mort TNFRSF10A i TNFRSF10B; per tal d'analitzar la seva participació en la patogènesi del MCL i CLL, així com en el limfoma fol·licular (FL, de l'anglès *Follicular Lymphoma*) i el limfoma difús de cèl·lules grans (DLBCL, de l'anglès *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*). El tercer i últim treball presentat estudia el conjunt de canvis a nivell global que poden conduir a la progressió clínica d'una neoplàsia limfoïde, com és el cas de la CLL.

Material i mètodes

En aquest treball s'han emprat una gran diversitat de tècniques experimentals, de les que destaquen la hibridació genòmica comparada (CGH, de l'anglès *Comparative*

Genomic Hybridization) per estudiar les alteracions cromosòmiques dels tumors, la reacció en cadena de la polimerasa (PCR, de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*) i la cromatografia líquida desnaturalitzant (DHPLC, de l'anglès *Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) per determinar l'adquisició d'alteracions en el material genètic a nivell de DNA; així com la PCR quantitativa a temps real (qPCR) i la realització de microarrays d'oligonucleòtids d'alta densitat per analitzar l'expressió gènica a nivell de mRNA.

Resultats i conclusions

L'estudi de gens implicats en la proliferació de MCL ha permès la construcció d'un model predictor de la supervivència dels pacients basat en l'expressió dels cinc gens *RAN*, *MYC*, *TNFRSF10B*, *POLE2* i *SLC29A2*. Aquest model es pot aplicar tant en material congelat com en teixits biològics fixats amb formol i inclosos en parafina (FFPE, de l'anglès *Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded tissue*), podent ésser útil en la presa de decisions terapèutiques. A més, aquest predictor és més acurat i objectiu que les mesures immunohistoquímiques de l'índex proliferatiu Ki67. Per altra banda s'ha estudiat el gen *MDM2*, implicat en les vies de resposta al dany del DNA, les quals es troben freqüentment alterades en MCL. S'ha observat que, a part de les alteracions del gen *p53*, l'augment de l'expressió gènica de *MDM2* es correlaciona directament amb una disminució de la supervivència en MCL. En alguns casos aquest augment de l'expressió pot donar-se per guany del locus genòmic del gen, mentre que la presència del SNP309 al seu promotor no es relaciona amb els canvis d'expressió.

La desregulació dels mecanismes implicats en la mort cel·lular programada o apoptosi també juga un paper clau en els processos de tumorigènesi. S'ha observat que els receptors de mort *TNFRSF10A* i *TNFRSF10B* es troben poc mutats en neoplàsies limfoides, indicant que la seva alteració no és rellevant per explicar la resistència a l'apoptosi observada en aquests tipus de limfomes. Tot i això, la presència del polimorfisme A1322G al domini de mort de *TNFRSF10A* s'associa amb un augment de risc a patir MCL i CLL; mentre que la presència del polimorfisme C626G al domini d'unió a lligand de *TNFRSF10A* sembla jugar un paper protector en MCL; suggerint un possible paper de dits polimorfismes en la resistència a la mort mediada per TRAIL.

Finalment, l'estudi global de les alteracions que participen en els fenòmens de progressió clínica primerenca de la CLL ha permès determinar la modulació de

l'expressió d'un petit grup de gens (58) que participen en diferents vies cel·lulars. Destaca un subconjunt de gens que actuen en la inhibició de l'adhesió i motilitat cel·lulars, els quals presenten una disminució coordinada de la seva expressió. També s'ha observat que la progressió clínica de les CLL s'associa, en alguns casos, amb la inactivació de certs gens supressors de tumors i l'adquisició d'alteracions cromosòmiques.

En conclusió, el desenvolupament dels NHL és un procés dinàmic i molt complex en què participen diferents factors que s'interrelacionen entre ells; i el conjunt de totes aquestes circumstàncies determinarà les característiques de la neoplàsia i el seu comportament biològic, així com la resposta al tractament.

ABREVIATURES

Les abreviatures del present treball s'han basat en la traducció anglesa del terme, per evitar confusions en la lectura de literatura relacionada amb el tema.

ABC	De l'anglès <i>Activated B-Cell like</i>
B2M	β 2-microglobulina
CLL	Leucèmia limfàtica crònica (de l'anglès <i>Chronic Lymphocytic Leukemia</i>)
BCR	Receptor de cèl·lules B (de l'anglès <i>B-Cell Receptor</i>)
CCND1	Ciclina D1
CDK	Cinasa depenent de ciclins (de l'anglès <i>Cyclin Dependent Kinase</i>)
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari (de l'anglès <i>Complementary DeoxyriboNucleic Acid</i>)
CGH	Hibridació Genòmica Comparada (de l'anglès <i>Comparative Genomic Hybridization</i>)
CKI	Proteïnes inhibidores de complexos ciclina-CDK (de l'anglès <i>CDK inhibitor</i>)
cRNA	Àcid ribonucleic complementari (de l'anglès <i>Complementary Ribonucleic Acid</i>)
C_T	Cicle llindar (de l'anglès <i>Threshold Cycle</i>)
DHPLC	Cromatografia de líquids desnaturalitzant d'alt rendiment (de l'anglès <i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>)
DLBCL	Limfoma difús de cèl·lules grans B (de l'anglès <i>Diffuse Large B-Cell Lymphoma</i>)
DNA	Àcid desoxiribonucleic (de l'anglès <i>DeoxyriboNucleic Acid</i>)
ΔR_n	Valors d'intensitat de fluorescència dels cicles de qPCR
EST	De l'anglès <i>Expressed Sequence Tag</i>
FasL	Lligand de Fas (de l'anglès <i>Fas ligand</i>)
FFPE	Teixit biològic fixat amb formol i inclòs en parafina (de l'anglès <i>Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded tissue</i>)
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (de l'anglès <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
FL	Limfoma fol·licular (de l'anglès <i>Follicular Lymphoma</i>)
GCB	De l'anglès <i>Germinal Center B-cell like</i>
IgH	Immunoglobulina
IgV_H	Regió variable del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines
MCL	Limfoma de cèl·lules del mantell (de l'anglès <i>Mantle Cell Lymphoma</i>)
mRNA	Àcid ribonucleic missatger (de l'anglès <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>)
NHL	Limfoma no Hodgkin (de l'anglès <i>Non-Hodgkin's Lymphoma</i>)

PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pb	Parell de bases
Rb	Gen/proteïna Retinoblastoma
qPCR	PCR quantitativa a temps real
REAL	Classificació revisada de neoplàsies limfoides europeoamericana (de l'anglès <i>Revised European American classification of Lymphoid neoplasms</i>)
RNA	Àcid ribonucleic (de l'anglès <i>Ribonucleic Acid</i>)
rpm	Revolucions per minut
RS	Síndrome de Richter (de l'anglès <i>Richter Syndrome</i>)
RT-PCR	PCR de transcripció reversa (de l'anglès <i>reverse transcription PCR</i>)
SNP	Polimorfisme d'un únic nucleòtid (de l'anglès <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSCP	Polimorfismes conformacionals de cadena única (de l'anglès <i>Single-Strand Conformational Polymorphism</i>)
TA	Temperatura ambient
TNF	Factor de Necrosi Tumoral (de l'anglès <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRAIL	Lligand inductor d'apoptosi relacionat amb TNF (de l'anglès <i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>)
TNFRSF10A TRAIL-R1/DR4	Receptor pel factor TRAIL 1, receptor de mort 4 (de l'anglès <i>Death Receptor 4</i>)
TNFRSF10B TRAIL-R2/DR5	Receptor pel factor TRAIL 2, receptor de mort 5 (de l'anglès <i>Death Receptor 5</i>)
TNFRSF10C TRAIL-R3/DcR1	Receptor pel factor TRAIL 3, receptor defectiu 1 (de l'anglès <i>DeCoy Receptor 1</i>)
TNFRSF10D TRAIL-R4/DcR2	Receptor pel factor TRAIL 4, receptor defectiu 2 (de l'anglès <i>DeCoy Receptor 2</i>)
WHO	Organització mundial de la salut (de l'anglès <i>World Health Organization</i>)