

**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**

(...) Recomano als biòlegs que, sense oblidar mai el nivell molecular, vagin de tant en tant a donar-se cops de cap al tronc d'un arbre i li demanin que els inspiri per tal de poder entendre millor el que passa al món. *(Ramón Margalef)*

DISCUSSIÓ

Les **neoplàsies limfoides** 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 a la gran complexitat cel·lular i funcional existent en les poblacions limfocitàries d'origen, així com a la varietat de mecanismes patogènics que poden participar en el seu desenvolupament i progressió ^{1,2}. Un tumor s'origina quan una cèl·lula adquireix una alteració genètica que li confereix certs avantatges evolutius pel que fa al seu creixement i supervivència dins del teixit. A partir d'aquest punt es poden anar acumulant altres aberracions que contribueixin al desenvolupament del tumor, provocant-se una situació d'instabilitat genètica que desencadena el desajust dels processos reguladors de l'homeòstasi cel·lular.

Aquesta homeòstasi implica un equilibri bàsic entre les vies que controlen la proliferació cel·lular i l'apoptosi. La proliferació cel·lular consisteix en l'augment de continguts de la cèl·lula per donar lloc a dues cèl·lules filles idèntiques. La taxa de divisió depèn del tipus cel·lular i les necessitats fisiològiques de l'organisme, i es tracta d'un procés altament regulat, ja que alteracions que produeixen l'augment de la proliferació poden desencadenar un càncer ¹. El limfoma de cèl·lules del mantell (MCL) és el paradigma del tipus de limfoma no-Hodgkin (NHL) amb alteracions en els mecanismes implicats en la proliferació ^{39,40}. Es caracteritza per adquirir l'alteració cromosòmica primària t(11;14)(q13;32), que provoca la sobreexpressió de la ciclina D1 (CCND1) i la consegüent desregulació del cicle cel·lular. També es poden trobar alteracions genètiques secundàries que afectin altres factors implicats en la maquinària del cicle, com és el cas de les delecions dels gens p16^{INK4a} o Rb, així com amplificacions genòmiques del locus de CDK4 ^{37,39,97}. L'alteració del cicle cel·lular provoca l'augment de la proliferació dels limfòcits B tumorals, esdevenint un factor predictor de la supervivència en MCL ^{81,100,205}. Així mateix s'ha descobert recentment el que es coneix com a *signatura de proliferació cel·lular*, és a dir, un conjunt de gens amb canvis coordinats de la seva expressió gènica que estan implicats en la proliferació. Aquesta signatura sembla integrar diversos esdeveniments oncogènics que defineixen subgrups pronòstic ben diferenciats en MCL ⁴⁸.

El comportament clínic dels MCL pot esdevenir bastant heterogeni, tot i que les teràpies que s'apliquen actualment són relativament homogènies. Depenent de la desició del pacient, aquest tipus de limfoma pot tractar-se amb immunoteràpia únicament o bé combinada amb un transplantament de cèl·lules mare ²⁰⁶. De totes maneres, donat que la supervivència dels pacients amb MCL varia entre uns quants mesos i més de deu anys, es podrien desenvolupar aproximacions terapèutiques

adaptades al malalt en un futur proper. Aquestes estratègies requeriran que es desenvolupin tests d'aplicació clínica que siguin precisos en el moment del diagnòstic, i que puguin predir el curs clínic de la malaltia de manera acurada. En la cerca de predictors clínics, histològics i moleculars del pronòstic de MCL, s'han identificat certs factors que semblen correlacionar-se amb pitjor pronòstic i un comportament més agressiu de la malaltia³⁹. Concretament la variant blastoide de MCL^{98,99}, les delecions del locus INK4a/ARF^{92,93,95}, la inactivació de p53⁸⁵⁻⁸⁷, l'alteració de l'expressió de MDM2^{88,89} i les mutacions puntuals i delecions genòmiques del locus de CCND1²⁰⁷ s'associen amb una menor supervivència. Pel que fa al nivell d'expressió del mRNA, l'augment de l'expressió de c-MYC s'ha descrit en pacients de MCL amb mal pronòstic²⁰⁸.

El millor predictor de la supervivència dels pacients de MCL que s'ha trobat fins a ara sembla ser la signatura de proliferació cel·lular comentada anteriorment⁴⁸. Els tests clínics basats en la tecnologia dels microarrays només es poden aplicar en teixit tumoral fresc i congelat, dificultant el seu ús en procediments de diagnòstic de rutina. Per això la immunohistoquímica de Ki67, que es duu a terme en teixits en FFPE, s'ha fet servir des de fa molts anys com a bon marcador de l'activitat proliferativa de les cèl·lules tumorals en la rutina diagnòstica. De fet l'índex Ki67 és capaç de definir grups de risc dins dels pacients de MCL, com ja s'ha descrit en diversos estudis^{81,100,205}. El principal inconvenient de la tècnica és que la majoria dels projectes publicats al respecte provenen de diferents laboratoris. En un estudi multicèntric molt recent de marcadors immunohistoquímics s'ha vist que el marcatge i quantificació de l'índex Ki67 variava molt en els diferents centres que participaven a l'estudi¹⁰³. A més existeixen evidències de què una mesura quantitativa dels nivells d'expressió de gens associats a la proliferació pot esdevenir un predictor de la supervivència en MCL millor que les tècniques immunohistoquímiques, les quals són, majoritàriament, semiquantitatives⁴⁸.

En aquest treball presentem un test molecular quantitatiu per predir el curs clínic dels pacients de MCL en el moment del diagnòstic. Aquest predictor es basa en la mesura de l'expressió gènica de només cinc gens, i és aplicable en la majoria de casos de MCL en què hi hagi teixit en FFPE disponible. El model de cinc gens inclou RAN, MYC, TNFRSF10B, POLE2 i SLC29A2, i prediu la supervivència de manera més precisa que qualsevol altra combinació de menys gens (entre 1 i 4) o que l'índex Ki67. L'adició de fins a 2 gens més al model tampoc en millora la capacitat predictiva. L'alta expressió de RAN, MYC, POLE2 i SLC29A2 es relaciona amb pitjor pronòstic, mentre

que l'augment de l'expressió de TNFRSF10B correlaciona amb un curs clínic millor. Sembla ser que la validesa del model no es veu afectada pel tipus de tractament que han rebut els pacients, ja que tots els paràmetres biològics i clínics (excepte l'edat) presenten la mateixa distribució entre els diferents grups de tractament. De totes maneres, el model manté la seva capacitat pronòstica si es té en compte aquest fet.

RAN és una petita proteïna d'unió a GTP que pertany a la superfamília de RAS, essent necessària per la translocació del RNA i les proteïnes a través del complex del porus nuclear, així com pel control de la síntesi del DNA i la progressió del cicle cel·lular^{209,210}. És un membre de la signatura de proliferació basada en l'expressió gènica, i una expressió alta es relacionava amb pitjor pronòstic⁴⁸. MYC és un factor de transcripció que juga un paper clau en la progressió del cicle cel·lular i els processos apoptòtics⁸⁰. La desregulació de MYC per mutació, sobreexpressió o reordenaments cromosòmics és freqüent en les neoplàsies hematològiques²¹¹. MYC s'ha trobat altament expressat en MCL^{212,213}, i l'augment d'expressió s'associa amb pitjor pronòstic²⁰⁸. TNFRSF10B és un membre de la superfamília de receptors TNF que media el senyal apoptòtic a través de la seva activació per la citoquina TRAIL. Mutacions inactivants de TNFRSF10B s'han trobat en diferents tipus de tumors sòlids i alguns tipus de NHL¹²⁸. POLE2 és la subunitat epsilon B de la DNA polimerasa i, per aquest raó, està implicada en la replicació del DNA, la reparació, recombinació i les funcions de control del cicle cel·lular^{214,215}. Com RAN, POLE2 també estava inclòs en la signatura de proliferació basada en l'expressió gènica⁴⁸. SLC29A2 és un membre de la família dels transportadors de nucleòsids SLC29, els quals transporten una gran diversitat de nucleòsids de purina i pirimidina²¹⁶. Curiosament els canvis d'expressió d'aquest gen poden afectar les taxes d'importació cel·lular d'anàlegs de nucleòsids en les cèl·lules de MCL i afectar la resposta terapèutica de determinats agents anticancerígens^{217,218}.

Una característica important del model proposat és la seva aplicabilitat a mostres tumorals en FFPE. Els àcids nucleics del material en FFPE estan normalment molt degradats a causa del procés de fixació amb formol²¹⁹. A més, la fixació química modifica l'estructura del RNA, impedit la seva posterior aplicació en tècniques moleculars com la qPCR²²⁰. Tot i això diversos estudis han demostrat que el mRNA de teixits en FFPE es pot extreure²²¹⁻²²³ i analitzar per qPCR^{203,224}. En la nostra sèrie de pacients, l'èxit de l'amplificació per qPCR del mRNA derivat de teixit en FFPE va dependre de la mida curta dels amplicons (òptimament fins a 80 pb). Fent servir els assaigs optimitzats de qPCR vam ser capaços d'amplificar RNA de gairebé el 75% de

les mostres examinades. És més, la taxa d'èxit entre els casos més recents va augmentar fins el 86%, situant-se el model en el rang d'eficiència de la tècnica de Ki67, com s'ha vist en un estudi molt recent¹⁰³. Tot i que el model de cinc gens derivat d'aquesta anàlisi d'una sèrie llarga de mostres congelades de MCL es va validar clarament en la sèrie de teixits en FFPE, s'ha de tenir en compte que els assaigs de qPCR dissenyats pels gens RAN i MYC en teixit en FFPE necessiten millorar-se abans d'aplicar-se a la rutina diagnòstica o en la presa de decisions terapèutiques en futurs assaigs clínics. Per aquesta raó en un futur proper s'analitzaran sèries llargues de pacients de MCL inclosos en assaigs clínics duts a terme pel Consorci Europeu del Limfoma de Cèl·lules del Mantell, per validar el valor pronòstic de la signatura de proliferació en el context de les aproximacions terapèutiques actuals.

En conclusió, hem desenvolupat un test molecular capaç de predir la supervivència dels pacients de MCL en el moment del diagnòstic. Aquest test es basa en la mesura quantitativa dels nivells d'expressió de cinc gens, i es pot aplicar a MCL en què hi hagi teixit en FFPE disponible. El model sembla ser més objectiu i tenir una capacitat predictiva superior que les mesures immunohistoquímiques de l'índex Ki67, i es podria aplicar mitjançant plataformes tècniques automatitzades. Amb aquest predictor seria possible analitzar sèries llargues de pacients de MCL amb teixit inclòs en FFPE des de fa molt temps. D'aquesta manera es podria validar el valor pronòstic de la signatura de proliferació en el context dels tractaments actuals i, possiblement, donar peu a una teràpia més individualitzada dels pacients d'aquest tipus de limfoma.

Així com les alteracions del cicle cel·lular són clau pel desenvolupament del MCL, les vies de resposta al dany del DNA també es troben freqüentment alterades en aquest tipus de limfoma, com és el cas dels gens p53 i ATM³⁹. L'alteració d'ambdues vies contribueix a l'augment de la proliferació dels limfòcits B tumorals. Mentre que se sap que l'activació de p53 juga un paper fonamental en la resposta davant l'estrès cel·lular que pot provocar dany al DNA, i desencadena l'aturada del cicle cel·lular o actua sobre l'apoptosi; no s'han estudiat tan bé altres membres implicats en aquesta via i especialment en MCL. Aquest és el cas de MDM2, gen que codifica per una fosfoproteïna que actua com a reguladora negativa de p53. P53 i MDM2 s'autoregulen entre ells, ja que l'activació de p53 indueix la transcripció de MDM2, que al seu torn media la degradació de p53 al proteasoma⁷⁶. Per aquesta raó MDM2 s'ha considerat un oncogen, trobant-se'n augment d'expressió en tot un conjunt de tumors humans, com ara els osteosarcomes²²⁵. La sobreexpressió de MDM2 també s'ha associat amb els nivells de progressió tumoral, i esdevé predictor de la supervivència en tumors

sòlids, com ara en càncer de mama ²²⁶; i en certes neoplàsies hematològiques ⁸⁸⁻⁹¹. Concretament, l'expressió proteïca de MDM2 es va trobar relacionada amb mal pronòstic en limfoma fol·licular (FL), limfoma de la zona marginal (MZL) i MCL ^{88,89}. En MCL, certs casos presenten augment de l'expressió de MDM2 ^{48,88,91}, però només en alguns d'ells s'observen els corresponents guanys o amplificacions del seu locus genòmic ^{88,91}. Així doncs es desconeixen altres causes que podrien desencadenar l'augment de l'expressió de MDM2 en tumors humans. Recentment s'ha descobert un polimorfisme al segon promotor del gen MDM2 (un canvi d'una timina per una guanina al nucleòtid 309). Aquest polimorfisme SNP309 sembla augmentar l'afinitat del factor de transcripció Sp1 pel promotor de MDM2, desencadenant l'expressió del gen i la regulació negativa de la via de p53 ⁷⁷. Diferents treballs han trobat que la presència de l'SNP309 sembla associar-se amb un augment del risc i/o acceleració de la formació de diversos tipus de tumors malignes ²²⁷.

En el present treball demostrem que l'augment d'expressió del gen MDM2 s'associa amb una disminució de la supervivència en el limfoma de cèl·lules del mantell, com ja s'havia observat prèviament en altres tipus de tumors humans ²²⁸. Aquest fet, conjuntament amb la presència d'alteracions de p53, sembla indicar que les alteracions de la via de resposta al dany al DNA juguen un paper important en la patogènesi del MCL. Tot seguit es va passar a analitzar si aquest augment d'expressió estava relacionat amb canvis en el nombre de còpies del gen. Tres casos tenien guanys d'un al·lel de MDM2, relacionats amb un augment de la seva expressió; però tot i això, diversos pacients amb alta expressió del gen no presentaven les corresponents alteracions del seu locus genòmic. Per aquesta raó es va decidir estudiar la influència del SNP309 sobre l'expressió gènica de MDM2 en base a les observacions descrites prèviament ⁷⁷. La presència del SNP309 no s'associava amb l'expressió de MDM2; ni tampoc amb altres criteris biològics i clínics dels casos, com ara el diagnòstic, el tipus histològic, els índexs de proliferació cel·lular o la supervivència dels pacients. Tot i això, es va veure que l'al·lel G del polimorfisme era present en 9 de les 10 dones incloses a l'estudi. Diversos treballs han suggerit que l'SNP309 podria accelerar la formació de tumors en dones, associant-se als nivells hormonals ²²⁷. En els casos inclosos en aquest estudi no es va observar aquesta tendència, fet que es podria explicar perquè el MCL afecta sobretot homes (relació home:dona, >2:1) amb una mitjana d'edat de >60 anys. També es va analitzar l'estat de p53 en un conjunt dels casos. La mutació del gen s'associava amb mal pronòstic, com ja s'ha descrit prèviament ⁸⁶; però no es va trobar correlació entre la presència del SNP309 o l'expressió gènica de MDM2 amb l'estat de p53.

En conclusió, hem observat que a part de les alteracions de p53, alts nivells d'expressió de MDM2 s'associen directament amb una menor supervivència en MCL. Aquest fet destaca la importància de la via de resposta al dany al DNA en la patogènesi del MCL. Els guanys genòmics del locus de MDM2 poden explicar la sobreexpressió del gen en alguns casos, mentre que la presència del SNP309 no és rellevant. El SNP309 s'observa en proporcions similars en població normal i MCL, però la presència de com a mínim un al·lel G sembla trobar-se més freqüentment en dones que en homes afectats de MCL. Tampoc es correlaciona la presència del SNP309 amb altres paràmetres biològics o clínics que caracteritzen la malaltia.

La desregulació dels mecanismes implicats en la mort cel·lular programada o apoptosi també juga un paper clau en els processos de tumorigènesi. Entre els diversos factors que participen en l'apoptosi trobem la via extrínseca o de receptors de mort, que esdevé especialment rellevant en els primers punts de control del desenvolupament i maduració dels limfòcits B. TNFRSF10A/TRAIL-R1/DR4 i TNFRSF10B/TRAIL-R2/DR5 són dos receptors de mort als quals s'uneix la citoquina TRAIL. El locus genòmic de TNFRSF10A i TNFRSF10B es troba a 8p21-22^{229,230}, una regió cromosòmica que es troba freqüentment delecionada en diferents tumors humans, suggerint la presència d'un gen supressor de tumors en aquesta zona. Les mutacions inactivants de TNFRSF10A i TNFRSF10B s'han associat, a més, amb pèrdua d'heterozigotitat en alguns tumors, indicant que aquests gens poden ser dianes potencials de les delecions de 8p^{127,231}. De fet s'han trobat mutacions de dits gens en carcinomes de cap i coll, carcinomes de pulmó de cèl·lula petita, mama, càncer gàstric i NHL. La majoria d'aquestes mutacions es van detectar als dominis de mort i en seqüències intròniques d'aquests gens; consistint sobretot en alteracions nucleotídiques de canvi de sentit, i menys freqüentment, mutacions silencioses, sense sentit o microdelecions^{126-131,231-233}.

En el present estudi es van detectar tres canvis de nucleòtid en el domini extracel·lular de TNFRSF10A, en dos MCL i una CLL. En els dos MCL, aquests canvis es trobaven a la posició +1 de la seqüència consens del lloc donador d'*splicing* de l'intró 3 en un cas, i a la posició +6 del mateix intró en l'altre. Pel que fa al pacient amb CLL, es tractava d'una mutació silenciosa al codó 155. Tots tres canvis estaven presents en heterozigosi i també a la línia germinal dels pacients, i no es van detectar en cap de les mostres que pertanyien a la població normal. Aquests canvis en les zones d'*splicing* no es van associar amb la presència de trànscrips anòmals, suggerint que potser són polimorfismes rars sense significat funcional aparent. Sis tumors, 3 CLL i 3

MCL, van adquirir deleccions del cromosoma 8p, però cap d'aquests casos tenia mutacions en el domini extracel·lular de TNFRSF10A. L'absència de mutacions en aquest estudi contrasta amb treballs previs en NHL coreans en què el 7% dels tumors presentaven mutacions, potencialment inactivants, al domini de mort de TNFRSF10A i TNFRSF10B¹²⁸. Aquestes diferències podrien explicar-se, en part, pels tipus de tumors estudiats, ja que l'estudi coreà incloïa 3 MCL, 7 CLL i 4 FL, mentre que les mutacions es van detectar en 5 dels 46 (11%) DLBCL, 2 dels 23 (9%) limfomes MALT i 1 dels 14 (7%) limfomes de cèl·lula T perifèrica. Aquesta diferència en la incidència de mutacions dels receptors de TRAIL entre les poblacions occidentals i coreanes també s'ha observat en tumors sòlids. Les mutacions de TNFRSF10A o TNFRSF10B es van trobar en l'11% de càncers de pulmó que no són de cèl·lula petita i en el 30% dels carcinomes de mama metastàsics de la població coreana. Pel que fa a la població occidental, només es van trobar en el 3% de carcinomes de cap i coll, i en cap de les sèries llargues de càncers de pulmó que no són de cèl·lula petita ni els de mama, suggerint que els patrons mutacionals de TNFRSF10A i TNFRSF10B varien segons la població d'estudi^{127,130,131,231,234}.

Tot i que no es van trobar mutacions inactivants de TNFRSF10A i TNFRSF10B en la present sèrie de tumors, es van detectar dos canvis polimòrfics en els dominis de mort i d'unió a lligand de TNFRSF10A. Aquests polimorfismes eren més freqüents en les neoplàsies limfoides incloses a l'estudi que en la població normal. El polimorfisme A1322G, localitzat al domini de mort de TNFRSF10A, es va trobar en el 37.5% i el 34.8% dels pacients amb CLL i MCL, respectivament; en comparació amb al 17.6% present en població normal. Aquestes diferències eren estadísticament significatives un cop ajustades les variables d'edat i sexe respecte la població normal, suggerint l'associació d'aquest polimorfisme amb un augment del risc a desenvolupar aquests tumors. Els FL i DLBCL estudiats presentaven una freqüència al·lèlica del polimorfisme similar a la dels casos control. Experiments de transfecció en línies cel·lulars de càncer d'ovari i de bufeta van demostrar que aquest canvi de nucleòtid podia actuar com a dominant negatiu en els processos de mort cel·lular mediat per TNFRSF10A, ja que fa que les cèl·lules siguin més resistents a l'efecte de TRAIL¹³⁴. Tot i que la presència del polimorfisme, per si sola, no pot justificar una resistència completa als efectes de TRAIL; aquest efecte de dominant negatiu observat *in vitro* podria explicar la seva predominància en heterozigosi, i suggerir una contribució a la resistència apoptòtica que pugui facilitar el desenvolupament tumoral de CLL i MCL^{131,134}.

Per altra banda s'ha associat la presència en homozigosi dels polimorfismes G422A i C626G, localitzats al domini d'unió a lligand de TNFRSF10A, amb un major risc de patir diferents tipus de tumors sòlids. El polimorfisme G422A s'ha associat amb càncer gàstric, de pulmó i de cap i coll; mentre que C626G s'associa amb els càncers de pulmó i de cap i coll ¹³². Curiosament C626G semblava tenir un efecte protector en els pacients de càncer de bufeta. El domini extracel·lular de TNFRSF10A no s'havia examinat en estudis anteriors de NHL i, per tant, no es disposava d'informació prèvia sobre la distribució d'aquests polimorfismes en les neoplàsies limfoides ¹²⁸. En el present estudi la freqüència al·lèlica de G422A era similar en tots els tipus de limfomes analitzats i la població normal. Tot i això la variant C626G s'associava significativament amb un efecte protector en MCL. En carcinomes de bufeta, aquest efecte protector s'associava amb pacients joves i fumadors, suggerint una associació entre el desenvolupament del tumor, el polimorfisme de TNFRSF10A i l'exposició ambiental ¹³³. Els factors de risc epidemiològics en MCL no s'han estudiat del tot bé i per tant no es coneix la possible relació d'aquesta associació amb una exposició ambiental dels pacients. Les variants homozigotes GG i AA dels polimorfismes 626 i 422 cosegregen en el 44-48% dels pacients amb carcinoma de cap i coll, pulmó i gàstric ¹³². La freqüència de ser heterozigot per ambdós al·lèls també es va trobar significativament augmentada en pacients de MCL respecte els controls, suggerint que aquesta associació es pot donar en diferents tipus de tumors. No es coneix l'efecte funcional dels polimorfismes G422A i C626G, però la seva localització en les regions flanquejants del domini d'unió a lligand suggereix que aquests canvis de la seqüència poden alterar la capacitat d'unió del lligand al receptor i, en conseqüència, alterar-ne la capacitat de senyalització apoptòtica.

S'ha vist que la citoquina TRAIL indueix l'apoptosi de forma selectiva en cèl·lules tumorals però no en cèl·lules normals, podent tenir una important aplicació terapèutica ^{235,236}. De totes maneres la sensibilitat dels diferents tumors a l'apoptosi induïda per TRAIL és variable. Les cèl·lules primàries de CLL i altres tipus de neoplàsies limfoides poden ser resistents a l'efecte de TRAIL ^{237,238}. Les causes d'aquesta resistència poden ser molt complexes i implicar diferents factors, com ara la variabilitat dels nivells d'expressió del receptor i d'altres elements senyalitzadors de la via dels receptors de mort ²³⁷. La poca freqüència de mutacions inactivants dels gens TNFRSF10A i TNFRSF10B en neoplàsies limfoides, incloent 6 casos amb delecions de 8p, indica que aquestes alteracions no són rellevants per explicar la resistència a l'apoptosi mediada per TRAIL observada en certs tipus de limfomes. Tot i això la relativa alta freqüència de diversos polimorfismes de TNFRSF10A amb un possible

efecte funcional en MCL i CLL suggereix que poden jugar un paper en la resistència a TRAIL en aquests tipus de neoplàsies. A més, la diferència significativa de la freqüència de dits polimorfismes en tumors comparada amb la de la població normal suggereix que també podrien actuar com a moduladors genètics del desenvolupament de determinats desordres limfoproliferatius.

A més de les alteracions dels mecanismes implicats en la proliferació cel·lular i l'apoptosi, altres vies cel·lulars poden contribuir al desenvolupament d'un càncer. Així doncs, la tumorigènesi esdevé un procés dinàmic i molt complex en què participen diferents factors que s'interrelacionen entre ells. Per aquesta raó es va decidir estudiar un tipus de neoplàsia limfoide, la CLL, des d'un punt de vista més global, per intentar determinar la integració dels diversos factors que podrien estar implicats tant en la seva patogènesi com en els fenòmens de progressió clínica primerenca. Vam seleccionar 16 pacients d'aquesta malaltia en què hi haguessin mostres seqüencials de sang perifèrica, obtingudes en un estadi primerenc de la malaltia en què el pacient no necessitava tractament, i en l'estadi de progressió clínica però just abans de què s'iniciés el tractament. Tots els pacients tenien un estadi inicial Binet A, mentre que les mostres pogressades es trobaven a l'estadi B (10 pacients) o C (6 pacients). També vam seleccionar 3 pacients de CLL amb evolució estable de la malaltia, és a dir, que no presentaven progressió, per poder-ne fer la comparació. Tot i que les mostres seqüencials dels pacients tenien un gran nombre de cèl·lules tumorals, vam purificar la població limfocitària per obtenir-ne una proporció de més del 98% i evitar el possible efecte esbiaixador de la presència de cèl·lules normals a la mostra, especialment determinant per l'anàlisi de l'expressió gènica per microarrays ¹⁹³.

Totes les mostres seqüencials estaven relacionades clonalment i 15 dels 16 pacients no presentaven mutacions en el gen de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgV_H); mentre que 12 dels casos expressaven alts nivells de la proteïna ZAP-70. Dos dels 3 casos sense mutacions en les IgV_H i baixa expressió de ZAP-70 tenien una deleció de 17p i una pèrdua de 11q, respectivament, fet que sembla ser comú en pacients de CLL que presenten discordància entre l'estat mutacional de les IgV_H i l'expressió de ZAP-70 ²³⁹. Per altra banda, els 3 pacients amb malaltia estable tampoc presentaven mutacions a IgV_H i tenien alts nivells d'expressió de ZAP-70.

També es va examinar la possible evolució cariotípica dels casos mitjançant CGH; així com la inactivació de p53 i p16^{INK4a}, dos gens supressors de tumors implicats freqüentment en la progressió de les neoplàsies limfoides ^{93,95}; i les modificacions dels

patrons d'expressió globals a partir de microarrays d'oligonucleòtids. Es van detectar alteracions cromosòmiques en 9 de les 16 mostres inicials (56%). L'alteració genètica més freqüent d'aquest grup de pacients era la trisomia 12 (27%), mentre que la pèrdua de 13q només es va trobar en 1 cas (6%). La diferent distribució de les alteracions genètiques en aquest grup de pacients comparada amb altres sèries de CLL es podria explicar pel propi estat mutacional de les IgV_H dels casos, ja que la trisomia del cromosoma 12 i les pèrdues de 13q s'han associat predominantment amb CLL no mutades i CLL mutades, respectivament^{239,240}. Les alteracions cromosòmiques de les mostres inicials també es van trobar en les mostres progressades del mateix pacient en tots els casos excepte 2 (13%), en què CLL sense alteracions genètiques inicials van adquirir noves aberracions cariotípiques durant la progressió. Un pacient va desenvolupar guanys de les regions 5q21-23 i 11pter-p14, mentre que l'altre va adquirir trisomia 12. Els guanys de 5q i 11p són poc freqüents en CLL però s'han trobat en casos amb cariotips complexos²⁴¹⁻²⁴³, i els guanys d'11p també s'han identificat com a alteracions genètiques úniques en alguns casos^{243,244}. De totes maneres, l'associació d'aquestes alteracions amb la progressió de la malaltia no s'havia observat abans. La trisomia 12 és una aberració genètica molt freqüent que s'arriba a detectar en el 15% de CLL en diferents estadis clínics, i no sembla associar-se amb pitjor pronòstic¹⁵¹. En alguns estudis s'ha vist que els clons de CLL que duen aquesta alteració s'associen amb una tendència a la progressió clínica^{34,245,246} i a la transformació a síndrome de Richter^{34,245,247}. Precisament el pacient que va adquirir una trisomia del cromosoma 12 com a única alteració durant la progressió de la malaltia va transformar-se en un limfoma de cèl·lules grans (síndrome de Richter) al cap de 35 mesos. S'ha observat l'evolució clonal de les aberracions genètiques en CLL en certs estudis, normalment associada amb una progressió avançada de la malaltia i una disminució de la supervivència^{34,151,248}. Les observacions del present estudi indiquen que un increment moderat del nombre d'alteracions cromosòmiques pot ocórrer en fases primerenques de la progressió clínica de les CLL.

En aquesta sèrie de pacients se'n van trobar dos amb una inactivació dels dos gens supressors de tumors p53 i p16^{INK4a} en el moment de la progressió tumoral. Delecions del cromosoma 17p ocorren en el 10-15% de CLL amb poca resposta al tractament i disminució de la supervivència^{29,249}. Aquestes delecions s'associen amb mutacions de p53 de l'altre al·lel no deleccionat, conduïnt a la inactivació del gen. Les alteracions de p53 són més freqüents en els estadis avançats de la malaltia i en casos resistents al tractament, però també es poden detectar en una petita proporció de pacients amb CLL en els estadis primerencs¹⁵¹. En aquest estudi es va trobar que una delecio de

17p no s'associava amb mutació de l'altre al·lel de p53 en la mostra inicial del pacient; però el mateix cas va adquirir una mutació a l'exó 6 de dit gen durant la progressió de la malaltia. Aquest fet és consistent amb la noció que la inactivació de p53 en CLL pot donar-se durant les fases primerenques de la progressió. Un altre pacient tenia una deleció homozigota de p16^{INK4a} en ambdues mostres seqüencials. Aquesta alteració genètica s'associava amb una pèrdua de 9p detectada per CGH, mentre que un altre cas també amb pèrdua de 9p tenia el gen p16^{INK4a} normal; confirmant observacions prèvies que indicaven que les pèrdues de 9p en CLL no sempre s'associen amb alteracions de p16^{INK4a} ³⁴. Les delecions de 9p i del gen diana p16^{INK4a}, tot i que són relativament freqüents en NHL agressius ^{92,93,250}, semblaven no participar en la patogènesi de la CLL ¹⁵¹. Tot i això el nostre grup va detectar pèrdues de 9p i delecions homozigotes de p16^{INK4a} en la transformació de la CLL a síndrome de Richter ³⁴. La detecció d'aquestes alteracions en el diagnòstic de la CLL en fases primerenques de la malaltia en dos pacients amb progressió clínica relativament ràpida suggereix que la pèrdua de 9p pot estar implicada en l'evolució dels pacients de CLL. El fet que només un dels dos pacients tingués una deleció homozigota de p16^{INK4a} és semblant al que ja s'havia observat en la síndrome de Richter ²⁵¹ i suggereix que les pèrdues de 9p poden afectar altres gens diana determinants per a la progressió de les CLL.

Estudis previs d'expressió gènica en CLL van ser capaços de distingir entre dos subgrups de la malaltia, basats en l'estadi mutacional de les IgV_H. Les diferències d'expressió gènica entre casos de CLL mutats i no mutats es va restringir només a l'1% dels gens transcrits, donant peu a la idea de què la CLL és una malaltia única amb dos subtipus que tenen diferent comportament biològic i clínic ^{150,156,162,252}. Un estudi previ d'expressió gènica que comparava mostres tumorals de pacients de CLL estables i amb progressió no va trobar gens individuals relacionats amb la clínica ¹⁶³. En el present estudi, l'anàlisi no supervisada de les dades tampoc va ser capaç de diferenciar entre les mostres inicials i progressades de cada pacient, indicant que les variacions individuals dels perfils d'expressió gènica eren més grans que les diferències relacionades amb el comportament de la malaltia. Tot i això, la comparació supervisada entre mostres inicials i progressades d'aquests mateixos pacients va permetre identificar un grup de 58 gens diferencialment expressats. La seva anàlisi funcional suggeria la participació de diferents vies en la progressió de la malaltia, com ara les que controlen el cicle i creixement cel·lulars, la regulació del flux dels ions i del calci, i l'adhesió i motilitat cel·lulars. De fet 6 dels 17 (35%) gens amb funció coneguda en què disminueix l'expressió són reguladors negatius de diverses vies implicades en

l'adhesió i motilitat cel·lulars. Aquestes troballes són concordants amb estudis experimentals molt recents que suggereixen que la progressió de les CLL s'associa amb un augment de la capacitat de resposta als senyals migratoris, i que els tumors ZAP-70 positius són més sensibles que els negatius respecte aquests senyals^{253,254}.

En resum, aquests resultats indiquen que la progressió clínica de les CLL en les fases primerenques de la malaltia s'associa amb evolució cariotípica, la inactivació de gens supressors de tumors i la modulació de l'expressió d'un petit grup de gens que participen en diferents vies cel·lulars. Dins dels gens diferencialment expressats s'inclou un conjunt amb disminució de l'expressió que té funcions inhibidores de l'adhesió i motilitat cel·lulars, podent facilitar-se la disseminació de les cèl·lules tumorals i la progressió de la malaltia.